

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

THYCIANA RODRIGUES RIBEIRO

**ESTUDO DO PERFIL DE PEPTÍDEOS SALIVARES DE CRIANÇAS COM CÁRIE  
DA PRIMEIRA INFÂNCIA: UMA VISÃO DA SALIVA COMO MEIO  
DIAGNÓSTICO**

FORTALEZA

2009

THYCIANA RODRIGUES RIBEIRO

ESTUDO DO PERFIL DE PEPTÍDEOS SALIVARES DE CRIANÇAS COM CÁRIE DA  
PRIMEIRA INFÂNCIA: UMA VISÃO DA SALIVA COMO MEIO DIAGNÓSTICO

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

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles

Fortaleza

2009

R372e      Ribeiro, Thyciana Rodrigues  
Estudo do perfil de peptídeos salivares de crianças com cárie da primeira infância : uma visão da saliva como meio diagnóstico / Thyciana Rodrigues Ribeiro . – Fortaleza, 2009. 120 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza-Ce, 2009

1.Cárie Dentária 2. Peptídeos 3. Saliva 4. Streptococcus mutans I. Fonteles, Cristiane Sá Roriz (orient.) II. Título

CDD: 617.67

THYCIANA RODRIGUES RIBEIRO

ESTUDO DO PERFIL DE PEPTÍDEOS SALIVARES DE CRIANÇAS COM CÁRIE DA  
PRIMEIRA INFÂNCIA. UMA VISÃO DA SALIVA COMO MEIO DIAGNÓSTICO

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dra. Anya Pimentel Gomes Fernandes Vieira  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus,  
à minha mãe Lúcia e ao meu pai Silvio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela minha vida, por tudo o que tenho e sou; pela minha força de vontade e determinação, elementos essenciais na minha caminhada.

Ao meu pai Silvio e a minha mãe Lúcia, exemplos de dignidade e honestidade, por todo amor, carinho e união da nossa família, pilares da minha educação e formação moral. Agradeço por serem as duas pessoas mais importantes da minha vida.

À toda a minha família que se fez presente em algum momento da minha vida, certamente trazendo alguma contribuição, principalmente à minha tia Silvia Fernandes, que desde o início foi uma grande incentivadora para a minha carreira acadêmica.

À minha orientadora, professora Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles, por todos os ensinamentos desde o segundo semestre da graduação, essenciais para meu crescimento científico, profissional e pessoal. Pelo exemplo de força, caráter, determinação e superação; e por ter estado presente em todos os momentos deste mestrado, sempre tendo soluções para tornar possível o que parecia ser impossível.

À professora Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, pela ajuda e facilidade de acesso ao Laboratório de Anaeróbios do departamento de Patologia e Medicina Legal da faculdade de Medicina da UFC, durante a etapa de análise microbiológica.

Ao professor Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho, pela importante contribuição e orientação no início da análise dos peptídeos através do HPLC, por ter me recebido no laboratório sob sua coordenação na Universidade Estadual do Ceará para que essa etapa pudesse ser realizada e, também, por aceitar o convite para fazer parte da banca avaliadora da presente dissertação.

À professora Dra. Karen Gregso, da Indiana University Purdue University Indianapolis (IUPUI), por ter viabilizado meu acesso ao Laboratório de Materiais Dentários dessa universidade.

Ao professor Dr. Karl Dria, do departamento de Química da Indiana University Purdue University Indianapolis pela atenção e auxílio essenciais para o processamento das amostras de saliva na análise dos peptídeos.

Ao professor Dr. Manassés Fonteles pela importante colaboração neste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Lima Santiago, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, pelo apoio, exemplo de competência e pela atenção sempre prestada.

Às professoras Dra. Cláudia Ferreira Santos e Dra. Andréa Silva Aguiar, pelo auxílio em diferentes momentos deste estudo.

Ao professor Dr. André Jalles pela realização da análise estatística desse estudo.

Ao professor Dr. Masatoshi Ando, da Indiana University Purdue University Indianapolis, pela atenção e pelo apoio durante o período em que o estudo foi realizado em Indianápolis.

À professora Dra. Anya Pimentel Gomes Fernandes Vieira por ter aceito o convite para compor a banca examinadora do presente trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

Aos funcionários Olavo, do setor de microbiologia da UFC; Silvia, do laboratório de Farmacologia Metabólica e Fisiologia Celular da UFC; Rosinha, do laboratório de Neurofarmacologia da UECE e Júnior, do setor de Importação da UFC pelo importante auxílio prestado em diferentes etapas deste estudo.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Odontologia, Lúcia e Germano pela ajuda e atenção. Ao bibliotecário Nonato Ribeiro, da Universidade Federal do Ceará, pela atenção com as padronizações bibliográficas.

A todos os colegas de mestrado pela convivência e momentos compartilhados. À Dra. Dijane, Dra. Catarina, Ramille, Jorgeana e ao Luciano pelo companheirismo do nosso grupo de pesquisa e pela amizade.

Às amigas da graduação Karla Shangela, Juliana Ximenes, Tatiana Maria, Tereza Castro e Priscila Rolim, que auxiliaram com empenho e dedicação os procedimentos realizados na Clínica de Odontopediatria da UFC.

À Michele Baffi Diniz pela amizade construída e companheirismo, muito importantes durante a última etapa do estudo, realizada em Indianápolis. À Silvia Franklin pela importante atenção e pelo apoio e incentivo prestados no mesmo período, mesmo à distância.

À todos os meus amigos e colegas por contribuírem com meu desenvolvimento pessoal.

À professora Josy pela realização da revisão gramatical, com tamanha dedicação e eficiência.

À FUNCAP pelo apoio financeiro e manutenção da bolsa de auxílio.

Àqueles que injustamente não foram citados mas que certamente contribuíram muito para a realização desse trabalho.

“Ele transformou a tempestade em leve brisa e as  
ondas emudeceram.”

Salmos 107: 29

## RESUMO

Este trabalho buscou estudar o perfil de peptídeos salivares de crianças com cárie da primeira infância, relacionando-o com níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM) salivares e experiência de cárie. Cento e seis crianças, na faixa etária de 10 a 71 meses de idade, participaram do estudo, sendo 48 com experiência de cárie e 58 sem cárie da primeira infância. Duas amostras de saliva total foram coletadas de todos os participantes. A primeira amostra era composta de saliva não estimulada, utilizada para análise dos peptídeos. Após coletada, essa saliva foi centrifugada, o sobrenadante retirado, liofilizado, dividido em pools com cárie, sem cárie e em amostras individuais e armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise em aparelho de LC-MS (Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massa). A busca por peptídeos foi baseada em massas conhecidas de peptídeos existentes em bancos de dados. Saliva estimulada representou a segunda coleta, utilizada para o cultivo dos EGM (UFC/mL) em meio ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). Anamnese e exame dentário foram realizados para cálculo do índice ceo-s e ceo-d. Os dados foram analisados por meio de modelo logístico binário. Resultados foram considerados significantes quando  $p\text{-valor} < 0,05$ . Os cromatogramas obtidos a partir dos pools de crianças com/sem cárie apresentaram diferenças em relação aos picos apresentados. A identificação das massas moleculares sugeriram a presença de nove peptídeos. Regressão logística mostrou que 3 peptídeos se relacionaram com experiência de cárie. PRP IB-4 associou-se a um aumento de experiência de cárie ( $p=0,035$ );  $\alpha$ -defensina 3 ( $p=0,019$ ) e  $\beta$ -defensina 3 ( $p=0,034$ ) associaram-se à redução de experiência de cárie. Em adição, aumento na idade ( $p=0,020$ ) e aumento na contagem de EGM ( $p=0,036$ ) ocasionaram um aumento na experiência de cárie, mas sexo não se relacionou com cárie dentária ( $p=0,877$ ). A partir desses resultados, pôde-se concluir que a presença de peptídeos específicos na saliva de crianças com e sem cárie dentária predis põem a um maior ou menor risco à essa doença.

Palavras-chave: Cárie dentária. Peptídeos. Saliva. Streptococcus mutans.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to find a relation between salivary peptides, caries experience and mutans streptococci (MS) levels in saliva of caries free (CF) and caries susceptible (CS) children in early childhood. One hundred and six 10 – 71 month-old children participated in the study. Fifty-eight children were CF and 48 who had experienced dental caries formed the CS group. Two samples of whole saliva were collected from all participants. Unstimulated whole saliva was collected, subsequently centrifuged. Supernatants were lyophilized, divided into two pools (CF and CS) and individual samples, and stored at -20°C for posterior analysis using LC-MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) to study the peptide profile. Identification of salivary peptides was based on theoretical molecular masses available from online databases. 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/dmft scores were calculated. Data was analysed by using logistic regression. The chromatograms from CF and CS pools of saliva had different peak patterns. The identification of molecular masses suggested the presence of 9 peptides. Three of them were significantly related with caries experience. The presence of HNP-3 ( $\alpha$ -defensin 3) ( $p = 0.019$ ) and HBD-3 ( $\beta$ -defensin 3) ( $p = 0.034$ ) reduced the chances of experiencing early childhood caries (ECC). The presence of PRP IB-4 significantly increased caries experience ( $p = 0.035$ ). In addition, age ( $p = 0.020$ ) and MS counts ( $p = 0.036$ ) increased caries experience, however gender was not associated with dental caries ( $p = 0.877$ ). Our results suggest that presence of specific peptides in saliva of CF or CS children in early childhood predisposes to a higher or lower risk of caries experience.

Key-words: Dental caries. Peptides. Saliva. Streptococcus mutans.

## LISTA DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1  | Diagrama de Keyes.....  | 22 |
| FIGURA 2  | Cárie severa da primeira infância .....   | 23 |
| FIGURA 3  | Localização das glândulas salivares .....   | 36 |
| FIGURA 4  | Principais funções da saliva.....   | 41 |
| FIGURA 5  | Representação das estruturas das $\alpha$ e $\beta$ -defensinas humanas .....   | 52 |
| FIGURA 6  | Tratamento odontológico realizado em um dos participantes do estudo.....  | 66 |
| FIGURA 7  | Coleta de saliva realizada na clínica de Odontopediatria da UFC.....  | 67 |
| FIGURA 8  | Acessórios utilizados durante a coleta de saliva.....   | 68 |
| FIGURA 9  | Procedimentos realizados antes da liofilização .....  | 68 |
| FIGURA 10 | Procedimentos feitos durante a preparação do meio de cultura .....  | 69 |
| FIGURA 11 | Desenho esquemático dos procedimentos de diluição .....   | 71 |
| FIGURA 12 | Placa de Petri semeada.....   | 71 |
| FIGURA 13 | Separação das amostras de saliva .....  | 73 |
| FIGURA 14 | Amostras de saliva antes e depois da ressuspensão.....  | 74 |
| FIGURA 15 | Sistema LC/MS utilizado.....  | 74 |
| FIGURA 16 | Cromatograma representativo do pool com cárie.....  | 82 |
| FIGURA 17 | Cromatograma representativo do pool sem cárie .....   | 82 |
| FIGURA 18 | Identificação no MS. Peptídeos das proteínas ricas em prolina IB-4.....   | 87 |
| FIGURA 19 | Identificação no MS. Peptídeos da alfa defensina 3 .....  | 87 |
| FIGURA 20 | Identificação no MS. Peptídeos da beta defensina humana 3.....  | 87 |
| FIGURA 21 | Cromatograma de criança com experiência de cárie .....  | 88 |
| FIGURA 22 | Cromatograma de criança sem experiência de cárie.....   | 88 |
| QUADRO 1  | Trabalhos científicos mostrando diferentes tipos de peptídeos encontrados na saliva.....  | 58 |
| GRÁFICO 1 | Representação gráfica da relação tridimensional entre idade, presença/ausência da $\alpha$ -defensina 3 (1744 $m/z$ ) e presença/ausência e cárie ..... | 86 |

## LISTA DE TABELAS

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Distribuição das crianças com cárie (ceo-d, ceo-s e CPI-s) por idade, sexo e contagem de EGM, segundo a AAPD .....  | 77 |
| 2. | Distribuição das crianças sem cárie (ceo-d, ceo-s e CPI-s) por idade, sexo e contagem de EGM, segundo a AAPD .....  | 78 |
| 3  | Distribuição da amostra de crianças com e sem cárie em função do gênero e da severidade da doença .....   | 79 |
| 4  | Distribuição de crianças (n = 96) segundo o número de superfícies cariadas, obturadas e perdidas devido à cárie, e os diferentes níveis de contaminação por EGM ..... | 79 |
| 5  | Distribuição dos níveis de contaminação por EGM em relação à idade .....  | 80 |
| 6  | Distribuição dos pacientes com idade, ceo-s, contagem de EGM em relação ao tipo de amamentação, duração da amamentação e escolaridade do responsável .....            | 81 |
| 7  | Regressão logística da probabilidade de cárie considerando todas as variáveis .....   | 84 |
| 8  | Regressão logística da probabilidade de cárie considerando idade, EGM, sexo e os peptídeos PRP IB-4, $\alpha$ -defensina 3 e $\beta$ -defensina 3 .....               | 85 |
| 9  | Relação entre presença/ausência de cada peptídeo e presença/ausência de cárie de 106 crianças .....   | 85 |
| 10 | Relação entre presença/ausência de cárie e presença/ausência dos peptídeos $\alpha$ -defensina 3 (1744) e $\beta$ -defensina 3 (2580) .....                           | 86 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|       |  |
|-------|--|
| AAPD  | Academia Americana de Odontologia Pediátrica   |
| AIDS  | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida   |
| ATP   | Adenosina Trifosfato   |
| CAS   | Lesões de Cáries Anteriores Superiores   |
| Ceo-d | Número de Dentes Decíduos Cariados, Extraídos devido à Cárie ou Obturados                |
| Ceo-s | Número de Superfícies de Dentes Decíduos Cariadas, Extraídas devido à Cárie ou Obturadas |
| CFF   | Lesões de Cáries de Fóssulas e Fissuras  |
| CP    | Crianças Prematuras  |
| CPI   | Cárie da Primeira Infância   |
| CPOD  | Número de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos ou Obturados                             |
| CSI   | Índice de Severidade de Cárie  |
| CN    | Crianças não Prematuras  |
| EGM   | Estreptococos do Grupo Mutans  |
| EUA   | Estados Unidos da América  |
| FDA   | Administração Norte Americana de Comidas e Drogas  |
| hBD3  | Alfa-defensina 3 humana  |
| HE    | Hipoplasia de Esmalte  |
| HIV   | Vírus da Imunodeficiência Humana   |
| HNP   | Alfa defensina   |
| HPLC  | Cromatografia Líquida de Alta Pressão  |
| ICC   | Indivíduos com Experiência de Cárie  |
| IL-1  | Interleucina 1   |
| ISC   | Crianças Livres de Cárie   |
| IUPUI | Indiana University Purdue University Indianapolis  |
| KDa   | Quilo Dalton   |
| LC/MS | Cromatografia Líquida associada ao Espectrômetro de Massa                                |
| Ln    | Logaritmo natural  |
| LPS   | Lipopolissacarídeo   |
| MSB   | Meio Ágar Mitis Salivarius Bacitracina   |
| $m/z$ | Massa por Carga  |

|               |  |
|---------------|--|
| ng            | Nanograma                                    |
| PAs           | Peptídeos Antimicrobianos                    |
| PRPs          | Peptídeos Ricos em Prolina                   |
| PCC           | Pool de Pacientes com Cárie                  |
| RCP-TR        | Polimerase Transcriptase Reversa             |
| PSC           | Pool de Pacientes sem Cárie                  |
| TFA           | Ácido Trifluoroacético                       |
| UFC/ml        | Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro |
| $\alpha$      | Alfa   |
| $\beta$       | Beta   |
| $\mu\text{L}$ | Microlitros                                  |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                   | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                         | <b>19</b> |
| <b>2.1 Cárie Dentária .....</b>                             | <b>19</b> |
| 2.1.1 Epidemiologia.....                                    | 19        |
| 2.1.2 Etiologia .....                                       | 21        |
| <b>2.2 Cárie da Primeira Infância.....</b>                  | <b>22</b> |
| 2.2.1 Problemas Decorrentes .....                           | 23        |
| 2.2.2 Fatores Associados à CPI .....                        | 24        |
| 2.2.2.1 Carboidratos Fermentáveis .....                     | 24        |
| 2.2.2.2 Dente e Hospedeiro Suscetível .....                 | 26        |
| 2.2.2.3 Fatores Comportamentais, Ambientais e Sociais ..... | 27        |
| 2.2.2.4 Microorganismos .....                               | 28        |
| 2.2.2.5 Estreotococos do Grupo Mutans .....                 | 29        |
| <b>2.3 Saliva.....</b>                                      | <b>36</b> |
| 2.3.1 Composição .....                                      | 37        |
| 2.3.2 Funções .....   | 41        |
| 2.3.3 Xerostomia .....                                      | 44        |
| 2.3.4 Uso da Saliva como Meio Diagnóstico .....             | 46        |
| 2.3.4.1 Testes Atualmente Disponíveis .....                 | 47        |
| 2.3.4.2 Relevância .....                                    | 48        |
| <b>2.4 Peptídeos Antimicrobianos .....</b>                  | <b>49</b> |
| 2.4.1 Características Comuns .....                          | 49        |
| 2.4.2 Presença de PAs em Diversos Seres Multicelulares..... | 50        |
| 2.4.3 Sítios de Localização em Seres Humanos .....          | 51        |
| 2.4.4 Relação com Doenças.....                              | 53        |
| 2.4.5 Importância de Estudos sobre PAs .....                | 54        |
| <b>2.5 Peptídeos antimicrobianos da cavidade oral.....</b>  | <b>55</b> |
| 2.5.1 Presença nos Tecidos Orais e no Sulco Ggengival.....  | 55        |
| 2.5.2 Presença na Saliva .....                              | 57        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                    | <b>63</b> |
| <b>3.1 Objetivo Geral .....</b>                             | <b>63</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....              | <b>63</b>  |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                  | <b>64</b>  |
| <b>4.1 Protocolo Clínico</b> .....                  | <b>64</b>  |
| 4.1.1 Desenho .....                                 | 64         |
| 4.1.2 Examinadores .....                            | 64         |
| 4.1.3 Amostra .....                                 | 64         |
| 4.1.4 Critérios de Inclusão dos Participantes.....  | 65         |
| 4.1.5 Critérios de Exclusão dos Participantes ..... | 65         |
| 4.1.6 Entrada do Voluntário no Estudo .....         | 65         |
| 4.1.7 Exame Dentário .....                          | 66         |
| 4.1.8 Coleta de Saliva.....                         | 67         |
| <b>4.2 Protocolo Analítico</b> .....                | <b>68</b>  |
| 4.2.1 Transporte e Armazenagem da Saliva.....       | 68         |
| 4.2.2 Análise Microbiológica .....                  | 69         |
| 4.2.3 Preparo do Meio de Cultura .....              | 69         |
| 4.2.4 Preparo da Solução Salina .....               | 70         |
| 4.2.5 Processamento das Amostras.....               | 70         |
| 4.2.6 Testes Bioquímicos .....                      | 72         |
| <b>4.3 Análise dos Peptídeos</b> .....              | <b>72</b>  |
| 4.3.1 Preparo da Amostra .....                      | 72         |
| 4.3.2 Processamento das Amostras em LC/MS.....      | 73         |
| 4.3.3 Identificação dos Peptídeos .....             | 75         |
| <b>4.4 Análise Estatística</b> .....                | <b>75</b>  |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....                          | <b>76</b>  |
| <b>5.1 Avaliação dos Peptídeos</b> .....            | <b>82</b>  |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....                            | <b>89</b>  |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....                           | <b>97</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                            | <b>98</b>  |
| <b>APÊNDICES</b> .....                              | <b>114</b> |
| <b>ANEXO</b> .....                                  | <b>119</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica, infecto-contagiosa, que se manifesta clinicamente por meio da descalcificação das estruturas dentárias, assumindo na criança um aspecto agudo, conhecido como cárie da primeira infância (CPI), relacionada diretamente ao índice de estreptococos do grupo mutans (EGM) existentes na cavidade oral logo após a erupção da primeira unidade dentária (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998). Etiologicamente, essa doença é semelhante aos outros tipos de cáries dentárias, mas biologicamente pode diferir em alguns aspectos, já que a flora bacteriana e a defesa imunológica ainda não estão completamente desenvolvidas em crianças jovens e as superfícies de seus dentes erupcionados ainda estão imaturas (SEOW, 1998), gerando uma doença clinicamente caracterizada pelo aparecimento súbito, pela rápida disseminação e progressão, manifestada clinicamente como cárie rampante (MC DONALD *et al.*, 2005).

Segundo a Academia Americana de Odontologia Pediátrica (2009) (AAPD – American Academy of Pediatric Dentistry), CPI refere-se à presença de uma ou mais superfícies cariadas (cavidades ou não cavidades), ausentes (devido à cárie) ou restauradas, em qualquer dente decíduo, de criança com idade igual ou inferior a 71 meses. No Brasil, quase 27% das crianças de 18 a 36 meses apresentam pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie dentária, chegando a uma proporção de 60% nas crianças com idade de 5 anos. De uma forma geral esses índices são considerados altos. Em média, uma criança brasileira de 3 anos ou menos já possui, pelo menos, um dente com experiência de cárie dentária. Aos 5 anos, esta média aumenta para quase 3 dentes afetados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Intimamente relacionada à atividade de cárie, encontra-se a saliva, uma secreção exócrina complexa, de importância na manutenção da homeostase da cavidade bucal (DIAZ-ARNOLD *et al.*, 2002). Suas funções em relação ao fluxo salivar e à composição molecular são bem específicas: capacidade tamponante, ação mecânica de limpeza, caráter antibacteriano e ação mineralizadora (AMERONGEN *et al.*, 2004; DOWD, 1999; LENANDER-LUMIRAKI *et al.*, 2000; TARABAY *et al.*, 1997). Portanto, indivíduos que apresentam xerostomia frequentemente possuem uma elevada prevalência de cárie e doença periodontal (NEDERFORS, 2000).

Nos últimos 10 anos, o uso da saliva como meio diagnóstico tem avançado exponencialmente, por tratar-se de um fluido que pode ser coletado de forma não invasiva e

usado para medir e monitorar o risco de cárie (STRECKFUS *et al.*, 2002). A colonização por estreptococos do grupo mutans (EGM) geralmente está relacionada à alta incidência de cárie durante a primeira infância, dessa forma a contagem de EGM permite a identificação de crianças com alto risco à CPI (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). A predição do risco a novas cáries tem sido de grande interesse, tornando-se importante o desenvolvimento de uma nova estratégia preventiva para a doença, especialmente significativa para crianças saudáveis e crianças portadoras de necessidades especiais (TAO *et al.*, 2005). Para o Brasil, um país subdesenvolvido, é relevante o fato de que os procedimentos preventivos podem se concentrar mais eficientemente nos grupos de alto risco e não serem aplicados desnecessariamente nos grupos de baixo risco, reduzindo o custo das estratégias de prevenção (JORDAN *et al.*, 1987; VAN HOUTE, 1993). Contudo, o melhor preditor de risco à cárie ainda é a experiência prévia dessa doença, pois existem crianças altamente contaminadas com EGM, mas que não desenvolvem lesões de cárie (BOWDEN, 1997).

Nesse cenário, a saliva exerce uma importante função protetora. Nela existem quantidades apreciáveis de proteínas, peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres. Em 1978, El Shobaki *et al.* relataram a presença de 16 aminoácidos na saliva de crianças na faixa etária entre 6 a 36 meses de idade: leucina, fenilalanina, lisina, valina, treonina, metionina, triptofano, alanina, glutamina, ácido aspártico, serina, glicina, tirosina, asparagina, cisteína e ácido glutâmico. Posteriormente, foram encontrados altos índices de arginina e lisina em indivíduos adultos livres de cárie (VAN WUYCKHUYSE *et al.*, 1995). Mais recentemente, verificou-se uma associação entre aminoácidos livres, experiência de cárie e níveis de EGM em saliva, onde a presença de prolina aumentou o risco à cárie, enquanto com a presença de glicina observou-se uma redução do risco à doença em crianças com cárie (FONTELES *et al.*, 2009).

Em relação aos peptídeos, muitos têm sido descobertos baseado em sua habilidade de matar ou inibir a proliferação de microorganismos patogênicos. Peptídeos antimicrobianos são bem conhecidos em plantas, insetos e animais, nos quais são a primeira linha de defesa contra patógenos invasores (MURAKAMI *et al.*, 2002). Peptídeos também já foram utilizados para avaliar resposta de glândulas salivares em ratos com diabetes (YAMAMOTO *et al.*, 1997). Nos seres humanos, principalmente em adultos, alguns peptídeos com atividade antibacteriana foram identificados, incluindo histatinas, defensinas e a única catelicidina humana LL37 (MATHEWS *et al.*, 1999; MURAKAMI *et al.*, 2002; AYAD *et al.*, 2000).

Tao *et al.* (2005) estudaram peptídeos salivares em crianças e encontraram três peptídeos antimicrobianos relacionados à prevalência de cárie dentária, que são beta-

defensina-3 humana (hBD-3), catelicidina LL37 e alfa-defensina HNP1-3, havendo dois peptídeos, LL37 e hBD-3, que não estavam relacionados com experiência de cárie. Em adição, níveis de HNP1-3 foram maiores em crianças sem cárie do que em crianças com cárie.

Os aminoácidos e os peptídeos de baixo peso molecular são permutáveis com o fluido da placa, sendo tanto substratos metabólicos da microflora da placa quanto produto das vias metabólicas desses microorganismos (PERINPANAYAGAM *et al.*, 1995), podendo refletir a atividade bacteriana e suscetibilidade à cárie. O estudo dos peptídeos salivares é de grande relevância, podendo levar ao desenvolvimento de um teste simples para avaliar risco de cárie, além de permitir a utilização desses peptídeos de forma terapêutica no futuro. Nenhuma pesquisa avaliou simultaneamente peptídeos salivares, experiência de cárie e índice de EGM; permanecendo por ser verificada a existência dessa correlação, fato ainda inédito na ciência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cárie Dentária

O termo cárie dentária é utilizado para descrever os resultados – sinais e sintomas – de uma dissolução química localizada na superfície do dente, causada por eventos metabólicos no biofilme que cobre a área afetada. A destruição pode afetar esmalte, dentina e cimento, as lesões podem se manifestar clinicamente com variedade de forma e coloração (FEJERSKOV; KIDD, 2008).

#### 2.1.1. Epidemiologia

Na segunda metade do século XX, a Associação Internacional de Odontologia preparou um estudo sobre o período de 1950 a 1963 (FDI, 1964), com dois objetivos principais nessa pesquisa: verificar o status da cárie dentária (puramente epidemiológico) e verificar o efeito de inibição do flúor da água de abastecimento contra a cárie.

Historicamente, a cárie dentária tem mostrado uma maior prevalência em países desenvolvidos quando comparados com os países subdesenvolvidos; fato justificado pela dieta com a presença de alto consumo de carboidratos refinados em países ricos ao contrário da dieta proveniente da agricultura de subsistência de países pobres (FEJERSKOV; KIDD, 2008). Esse padrão histórico, no entanto, sofreu mudanças. Segundo Behbehani e Scheutz (2004), o Kuwait por exemplo apresentava o índice CPOD, entendido como a proporção de indivíduos com dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados na idade de 12 anos em 1982 de 2,0, passando para 2,6 em 1993. No mesmo país, houve uma elevação no CPOD na idade de 6 anos de 0,2 em 1993 para 4,6 em 2000.

Um estudo feito com 528 crianças da Guatemala indicou que a prevalência de cárie na dentição decídua dessa população foi duas vezes maior do que em crianças brancas dos Estados Unidos, enquanto na dentição permanente não houve diferença. A experiência de cárie foi significativamente maior em meninos. Até os 4 anos de idade, o ataque de cáries foi maior no segmento anterior da cavidade oral (INFANTE; GILLESPIE, 1976).

Nos Estados Unidos, segundo o levantamento nacional de saúde e nutrição (National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES) em 2007, que publicou dados de dois períodos nesse país (1988-1994 e 1999-2004), mostrou que embora a cárie

dentária tenha sofrido um declínio significativo entre as crianças em idade escolar (6 a 12 anos), essa doença infecto-contagiosa tem permanecido como a mais prevalente doença crônica da infância. Na faixa etária de 2 a 11 anos, a cárie na dentição decídua cresceu de 40% em 1988-1994 para 42% em 1999-2004. Na idade compreendida de 2 a 5 anos, houve um crescimento de 24% para 28% no mesmo período. E, ainda na faixa etária de 2 a 4 anos, a prevalência de cárie aumentou de 18% para 24%. Curiosamente, na dentição permanente na população de 12 a 19 anos, a prevalência de cárie passou de 68% em 1988-1994 para 59% em 1999-2004.

No Brasil, o maior levantamento epidemiológico de âmbito nacional na área de saúde bucal foi realizado no período de 2002 a 2003. Foi possível, dessa forma, ter uma visão ampla do cenário nacional da saúde bucal. Dentre as crianças de 18 a 36 meses, 26,85% apresentaram pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie dentária, sendo que a proporção chegou a 59,37% entre crianças de 5 anos de idade. Quanto à cárie dentária na dentição permanente, 68,92% das crianças brasileiras de 12 anos e 88,94% dos adolescentes de 15 a 19 anos apresentaram pelo menos um dente permanente com experiência de cárie. Nos adultos ocorreu um efeito cumulativo, com uma tendência de crescimento na prevalência em função da idade, por exemplo, na faixa etária de 35 a 44 anos e de 65 a 74 anos, observou-se uma prevalência de cárie de 99,48%. Diversidades regionais também foram percebidas. Na faixa etária de 18 a 36 meses, idades de 5 e 12 anos e na faixa etária de 15 a 19 anos, os percentuais de CPOD/ceo-d=0 (ceo-d é entendido como dentes decíduos cariados, extraídos devido à cárie e obturados) foram sempre inferiores nas regiões Norte e Nordeste quando comparados com os das regiões Sul e Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Observa-se uma tendência ao crescimento da prevalência da cárie no Brasil, semelhante ao observado no mundo, que tem sido acompanhada por um fenômeno conhecido como polarização, caracterizado pela concentração de maiores frequências da doença em pequenos grupos populacionais (CARDOSO *et al.*, 2003; MALTZ; SILVA, 2001; TRAEBERT *et al.*, 2001). Desta feita, faz-se importante a identificação de grupos de alto risco à cárie para que os procedimentos preventivos possam se concentrar mais eficientemente, ao invés de serem aplicados desnecessariamente em crianças de baixo risco (JORDAN *et al.*, 1987; VAN HOUTE, 1993).

### 2.1.2. Etiologia

Por volta do século XVIII, os antigos babilônios atribuíam as cáries à “beliscada dos vermes de dente”. Segundo Galeno, considerado autoridade suprema em medicina após o segundo século, a cárie tinha início nas porções internas do dente, em consequência de condições anormais no sangue, isto é, os humores do corpo alteravam a estrutura interna dos dentes causando a cárie. Hunter, em 1778, propôs uma teoria admitindo que a cárie tinha origem na polpa dentária, sendo, na realidade um efeito secundário à inflamação da polpa (BURNETT; SCHIRP; SCHUSTER, 1978). Depois de várias explicações formuladas para a etiologia da cárie dentária, Miller (1890) formulou o conceito que mais tarde ficou conhecido como teoria químico-parasitária da cárie, segundo o qual a cárie tinha duas causas principais: ação dos ácidos e ação dos germes. A destruição do esmalte e da dentina seria consequência primariamente de um processo de desmineralização, sendo o agente desmineralizante um ácido oriundo da fermentação microbiana dos carboidratos provenientes da dieta.

Segundo Keyes (1968), existiam 2 visões em relação à etiologia e à prevenção das cáries. A primeira abordava a lise do esmalte por ácidos produzidos pela interação carboidrato-bactéria, sendo o tratamento da cárie proporcionado pelo aumento da resistência à desmineralização ou pela redução da produção de ácidos. A segunda visão propunha que a cárie era consequência patológica de doenças microbianas invasivas, podendo esse ataque do esmalte por microorganismos acidogênicos ser prevenido com algum tipo de cobertura ou tratamento com flúor.

Pesquisas com ratos que desenvolveram cárie dentária, quando infectados por bactéria específica, demonstraram a transmissibilidade desta infecção de animal para animal enquanto outros estudos demonstraram o papel fundamental dos açúcares na dieta (KEYES, 1960; FITZGERALD; KEYES, 1960). No estudo de Keyes (1960), a transmissão interindividual da microbiota cariogênica podia ser interrompida por uma dieta contendo penicilina originando “proles não infectadas”, que permaneciam livres de cáries mesmo com uma dieta cariogênica. Todavia, quando esses animais “resistentes” entravam em contato com animais “suscetíveis” ou com a placa bacteriana ou com fezes desses animais, tornavam-se eles próprios cárie-suscetíveis desenvolvendo lesões.

Em resumo, é necessária a presença simultânea de três fatores etiológicos principais para a ocorrência da CPI (Figura 2), são eles: carboidratos fermentáveis, dente e hospedeiro suscetível e microorganismos cariogênicos (KEYES; JORDAN, 1963); além de

fatores comportamentais, ambientais (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002) e sociais (O’SULLIVAN; TINANOFF, 1993).

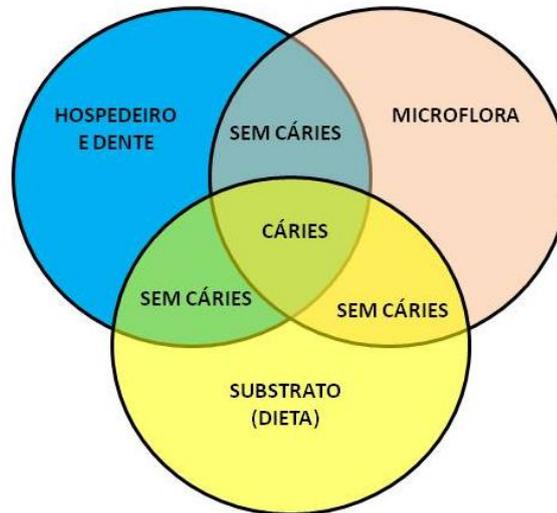


Figura 1: Diagrama de Keyes - Três círculos sobrepostos retratando a possível relação do grupo de fatores responsáveis pela atividade de cárie. Existem inúmeras variáveis em cada parâmetro. Adaptado: Keyes, Jordan, 1963.

Nas crianças, a cárie pode estar relacionada com inapropriados hábitos de amamentação (TINANOFF; O’SULLIVAN, 1997). Em 1978, a Academia Americana de Odontologia Pediátrica (AAPD) numa declaração conjunta com a Academia Americana de Pediatria criou o termo “cárie de mamadeira” para definir uma severa forma de cárie relacionada com o uso de mamadeira. Depois de duas décadas, reconhecendo que essa distinta apresentação clínica não estava associada exclusivamente com pobres práticas de alimentação e que a cárie era uma doença infecciosa, a AAPD adotou o termo “cárie da primeira infância” por melhor refletir sua etiologia multifatorial (AAPD, 2008).

## 2.2. Cárie da Primeira Infância

O termo Cárie da Primeira Infância refere-se à presença de uma ou mais superfícies cariadas (cavidades ou não), perdidas (devido à cárie) ou restauradas em qualquer dente decíduo de criança com idade menor ou igual a 71 meses (AAPD, 2008). Essa condição é considerada severa em indivíduos com menos de 3 anos de idade, apresentando qualquer sinal de cárie em superfície lisa recebendo o nome de Cárie Severa da Primeira Infância (CPI-s). Em adição, crianças de 3 a 5 anos de idade, apresentando 1 ou mais superfícies lisas cavidades, perdidas (devido à cárie) ou restauradas em dente súpero-anterior, ou a presença de

um número de superfícies cariadas, perdidas ou restauradas  $\geq 4$  (para 3 anos de idade),  $\geq 5$  (para 4 anos de idade),  $\geq 6$  (para 5 anos de idade) constitui CPI-s (AAPD, 2008).

CPI caracteriza-se clinicamente por afetar principalmente os dentes anteriores superiores, seguido pelo envolvimento dos primeiros molares. Os incisivos inferiores geralmente não são afetados por causa da posição de proteção ocupada pela língua contra o desafio cariogênico (HOROWITZ, 1998; KELLY; BRUERD, 1987; MC DONALD *et al.*, 2005; MILNES, 1996; RIPA, 1988; PETTI; CAIRELLA; TARSITANI, 2000).



Figura 2: Cárie severa da primeira infância em criança de três anos de idade.  
Fonte: Guedes Pinto, 1998.

### 2.2.1. Problemas decorrentes

A CPI é uma condição passível de prevenção que pode causar nas crianças dor, infecção, abscessos, dificuldade de mastigação, desnutrição, distúrbios gastrointestinais e baixa auto-estima (ACS *et al.*, 1992). Além disso, leva a ocorrência de cáries na dentição permanente, maloclusão, problemas fonoaudiológicos, retardo no crescimento e ostracismo social (GREENWELL *et al.*, 1990; KASTE *et al.*, 1992; RIPA, 1988). A dor de dente decorrente geralmente permanece por várias semanas, afetando as atividades regulares da criança, como comer, dormir e brincar (VARGAS; RONZIO, 2006). É necessária intervenção profissional imediata para prevenir destruição dentária subsequente, além de outros problemas de saúde generalizados (AAPD, 2008).

Extração dentária é um tratamento comum e às vezes necessário para as cáries avançadas. Perda prematura dos primeiros molares decíduos frequentemente resulta em problemas ortodônticos futuros. Quando a população afetada possui baixo poder aquisitivo, a situação se agrava, uma vez que a família não dispõe dos meios necessários ao provimento da

assistência odontológica necessária por falta de condições financeiras (GRINDEFJORD; DAHLLOF; MODEER, 1995; JOHNSEN *et al.*, 1986; O'SULLIVAN; TINANOFF, 1996).

O tratamento da CPI requer considerações especiais devido à imaturidade emocional das crianças afetadas. Na maioria dos casos, o tratamento dentário deve ser feito sob anestesia geral ou sedação (BANKEL *et al.*, 2006). Normalmente, os odontopediatras são os únicos profissionais capacitados para realização desses procedimentos (VARGAS; RONZIO, 2006). O resultado dessas peculiaridades é o alto custo do tratamento (TINANOFF; O'SULLIVAN, 1997). Todos esses fatores fazem da criança um importante público-alvo para a prevenção (BANKEL *et al.*, 2006).

### 2.2.2. Fatores associados à CPI

Embora a etiologia da CPI seja similar a outros tipos de cárie dentária como oclusais ou de superfície lisa (KRASSE, 1965), a biologia pode diferir em alguns aspectos, já que a flora bacteriana e o sistema imunológico das crianças estão em processo de desenvolvimento. Em adição, as superfícies dentárias estão recém-erupcionadas e imaturas, podendo mostrar defeitos hipoplásicos. Portanto, a CPI possui fatores de risco especialmente voltados para as crianças (SEOW, 1998).

Existem fatores específicos relacionados à CPI. Os dentes decíduos, neste tipo de cárie, assumem uma significância especial porque a progressão das lesões para o interior da dentina é rápida devido à fina espessura do esmalte nos incisivos decíduos (~0,5mm comparado a mais de 1mm em incisivos permanentes) (RIPA, 1988). Em relação à amamentação, durante a sucção, o bico do peito ou da mamadeira é colocado contra o palato, momento em que a língua é estendida sobre os incisivos inferiores; dessa forma o leite materno ou proveniente de mamadeira entra em contato com todos os dentes, com exceção dos incisivos inferiores que estão fisicamente protegidos pela língua (RIPA, 1988). Este último leva ao padrão comumente encontrado na CPI, caracterizado pelos 4 incisivos superiores sendo mais afetados, enquanto os 4 incisivos inferiores permanecem hígidos (MC DONALD *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.1. Carboidratos Fermentáveis

Hábitos dietéticos são importantes fatores de risco à cárie dentária. O primeiro contato da criança com a comida e o gradual estabelecimento do padrão de alimentação

durante a infância formam uma base importante para o futuro desenvolvimento de hábitos alimentares e de outros hábitos relacionados à saúde (BANKEL *et al.*, 2006).

Os principais açúcares associados com as cáries nas crianças são sacarose, glicose e frutose (SEOW, 1998). O carboidrato mais importante na formação da placa dental e na etiologia da cárie é o dissacarídeo sacarose, mais conhecido como açúcar da cana (BURNETT; SCHIRP; SCHUSTER, 1978; GUSTAFSSON *et al.*, 1954). A molécula de sacarose está constituída de glicose e frutose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000), substratos facilmente convertidos em ácidos orgânicos pelo metabolismo glicolítico (anaeróbico) das bactérias acidogênicas da placa. A sacarose sofre ação de uma enzima (dextranosucrase) sintetizada pelo estreptococos do grupo mutans, sendo convertida em dextrano, que é um importante fator na formação e manutenção da placa dental. Pode também ser convertida em levano, outro constituinte importante da placa. Logo após a formação da placa, a sacarose prontamente penetra, sendo convertida em dextrano, levano ou outro glucano, ou passa a constituir um substrato para a microbiota da placa. Os ácidos orgânicos resultantes do metabolismo anaeróbico na via glicolítica ficam concentrados na placa bacteriana, penetram nos diversos tegumentos e , finalmente atingem o esmalte, causando a dissolução do seu componente inorgânico e a lesão cariosa (BURNETT; SCHIRP; SCHUSTER, 1978). Estudos *in vitro* sugerem que a frutose e a glicose são tão cariogênicas quanto a sacarose na capacidade desses açúcares em causar queda no nível do pH (NEFF, 1967) e desmineralização do esmalte (KOULOURIDES, 1976).

Vários estudos publicados sugerem que crianças com cárie da primeira infância têm alta freqüência de consumo de açúcar, não somente por fluidos dados em mamadeiras (HALLETT; O'ROURKE, 2006; HALLONSTEN *et al.*, 1995; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998), mas também por alimentos de consistência sólida contendo açúcar (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002). As práticas de amamentação estão associadas com o padrão e severidade de cárie. Segundo Hallett e Rourke (2006), crianças que utilizaram mamadeira apresentaram um padrão de CPI anterior de 37-42% comparado com um padrão de 27% das crianças que não utilizaram mamadeira ( $p=0,04$ ). Além disso, também foi verificado que o padrão anterior de cáries era significativamente maior em crianças postas para dormir com mamadeira (44%), ou que a tomavam durante o dia (50%), quando comparado a crianças que não tinham esses hábitos.

Hallonsten *et al.* (1995) verificaram que a média de ceo-s (número de superfícies dentárias cariadas, extraídas devido à cárie ou obturadas na dentição decídua) era de 5,3 em

grupo de crianças com cárie que tomavam mamadeira, sendo de 4,9 no grupo de crianças com cárie, mas que não tinham o hábito de tomar mamadeira.

Bankel *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de identificar fatores relacionados com a CPI em crianças suecas de 2 e 3 anos de idade, no qual foi avaliado o consumo de produtos contendo sacarose. Seus resultados demonstraram que 38% das crianças que ingeriam produtos contendo açúcar mais de 28 vezes por semana tinham cáries; comparado a 8% das que ingeriam numa frequência menor. Foi encontrada CPI em 42% das crianças que tomavam mamadeira durante a noite e em 29% das que comiam ou bebiam produtos contendo açúcar à noite.

A maioria das fórmulas contendo leite são sintetizadas para simular o leite humano (SEOW, 1998). Erickson *et al.* (1998), utilizando métodos *in vitro*, relataram que algumas dessas fórmulas mais comuns têm o mesmo potencial cariogênico da sacarose. Em contraste, os resultados de Bowen *et al.* (1997), usando ratos, sugeriram que as fórmulas testadas contendo leite causavam menos cáries quando comparadas com a água contendo sacarose. Mattos-Graner *et al.* (1998), em estudo com crianças de 1 a 2,5 anos de idade de Piracicaba para avaliar a relação entre prevalência de cárie e fatores clínicos, microbiológicos e fatores da dieta verificou que das crianças com cárie que tomavam mamadeira, 5,6% tomavam somente leite, 11,5% leite com açúcar e 30,4% uma mistura de leite, açúcar e cereais. Ressaltando dessa forma a maior cariogenicidade da fórmula contendo leite.

#### 2.2.2.2. Dente e hospedeiro suscetível

Logo após a erupção, a superfície de esmalte recém exposta sofre o estágio final da maturação pós eruptiva e endurecimento, quando íons como o fluoreto são incorporados (CURY, 2002). Estudos epidemiológicos sugerem que esse período compreendido após a erupção e antes do final da maturação é quando o dente está mais suscetível às cáries (CARLOS; GITTELSON, 1965). Em várias crianças, a combinação de esmalte imaturo recém erupcionado em um ambiente de flora cariogênica com ingestão frequente de carboidratos fermentáveis proporciona ao dente suscetibilidade às cáries (SEOW, 1998).

Em adição à falta de maturação, a presença de desenvolvimento de defeitos na estrutura do esmalte pode aumentar o risco à cárie (SEOW, 1998). Defeitos de desenvolvimento do esmalte podem manifestar-se como perda parcial ou total do esmalte (amelogênese imperfeita) ou como uma mudança na translucência (opacidade) (NEVILLE *et al.*, 2009).

A hipoplasia de esmalte é explicada morfológicamente como um subdesenvolvimento primário do dente, o qual geralmente apresenta fóssulas e fissuras profundas, coalescentes e fragmentárias, particularmente nos primeiros e segundos molares decíduos. Essas fóssulas e fissuras promovem sítios propícios para que bactérias cariogênicas possam aderir e colonizar, permitindo que a bactéria fique retida na base do defeito em contato com a dentina exposta. Conseqüentemente o processo de cárie dentária nessas superfícies alteradas pode acontecer mais rapidamente que nas superfícies de dentes hígidos (LI; NAVIA; BIAN, 1996). Li *et al.* (1996) fizeram um estudo para verificar experiência de cárie na dentição decídua de crianças com 3 a 5 anos de idade em relação à presença ou ausência de hipoplasia de esmalte (HE); tendo sido encontrado como resultado uma forte associação entre HE e experiência de cárie na população estudada. Nesse estudo, das crianças que possuíam HE, 92,8% tinham cáries e 7,2% estavam livres de cáries. Enquanto dentre as crianças sem HE, 79% possuíam lesões cariosas e 21% não tinham cáries.

Deficiências nutricionais têm um impacto importante no desenvolvimento do dente e na suscetibilidades às doenças orais, uma vez que o baixo peso ao nascer e a prematuridade estão significativamente associados com o desenvolvimento de hipoplasia de esmalte (LI; NAVIA; CAUFIELD, 1994). Todavia, essa relação não é encontrada em todos os estudos. Na dissertação de mestrado de Mota (2008), foram examinadas 120 crianças desnutridas, com idade média de 41 meses, das quais 75 não apresentaram lesões de cárie (62,5%), enquanto 45 apresentaram essa doença (37,5%).

#### 2.2.2.3. Fatores comportamentais, ambientais e sociais

Ramos-Gomez *et al.* (2002), objetivando buscar uma associação entre fatores bacterianos, comportamentais e ambientais com a CPI em população de crianças espanholas e afro-americanas com menos de 60 meses de idade, verificaram que não havia diferença estatisticamente significativa na dieta, nos padrões de amamentação, no nível de educação dos pais, na renda familiar e em relação ao país de origem em crianças com e sem cárie. Foi encontrada relação significativa entre CPI e perda de seguro dental da criança. Indivíduos infantis sem seguro dental encontravam-se duas vezes mais propícios a terem CPI do que crianças com seguro (público ou privado).

Contrastando com alguns dados acima, Bankel *et al.* (2006), identificaram em população infantil na faixa etária de 2 a 3 anos de idade de Göteborg, que quando a mãe possui menos que 10 anos de educação escolar, 63% dos filhos têm cáries comparado a 12%

de crianças acometidas pela CPI, cujas mães tiveram uma longa educação. Hallett e O'Rourke (2006) realizaram um estudo com crianças de 4 a 5 anos de idade da Austrália, no qual foi verificado que, quanto menor o nível educacional da mãe, maior a prevalência de CPI-s. Também foi constatado que renda familiar anual menor que US\$20.000 (vinte mil dólares) está significativamente associada com CPI anterior e com CPI-s.

Em um estudo realizado com crianças de 3 e 4 anos de idade de Connecticut (EUA), com o objetivo de avaliar fatores sociais e biológicos que contribuem com cáries nos dentes anteriores superiores, ao explorar diferenças entre crianças com padrão anterior de lesões de cárie em relação àquelas com padrão anterior e posterior, foram encontradas diferenças nas respostas dos pais em relação aos seguintes questionamentos: frequência de ingestão de sorvete, convicção dos pais em evitar as cáries dos filhos e deles próprios (O'SULLIVAN; TINANOFF, 1993).

#### 2.2.2.4. Microorganismos

Várias espécies microbianas da cavidade oral têm a capacidade de produzir cárie em ratos e cricetos gnotobióticos mantidos em regime de dieta rica em sacarose; tais como: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacilos casei*, *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii* (BURNETT; SCHIRP; SCHUSTER, 1978). Em 1986, Loesche verificou que a cárie dentária é uma infecção específica e que os principais patógenos envolvidos são os EGM. Vários estudos relacionando microorganismos envolvidos no processo patológico da cárie foram realizados na tentativa de explicar esse complexo processo.

Em relação ao risco de cárie, as atenções voltaram-se para a contagem de lactobacilos e EGM, devido à associação positiva desses microorganismos com as cáries humanas e à proximidade dessa relação com consumo de carboidratos. Sendo assim, a contagem de lactobacilos e EGM serve não somente como um preditor do risco de cárie, mas também como um indicador do consumo de carboidratos, que é outro fator de risco à cárie (VAN HOUTE, 1993).

#### 2.2.2.5. Estreptococos do grupo mutans

Vários estudos mostram que o principal microorganismo envolvido com a cárie são os estreptococos do grupo mutans, uma vez que crianças altamente infectadas por esse

microorganismo desenvolvem mais cáries do que aquelas que o possuem em baixo nível (ALALUUSUA, *et al.*, 1996; ALALUUSUA; RENKONEN, 1983; BOUE; ARMAU; TIRABAY, 1987; DOUGLASS; O’SULLIVAN; TINANOFF, 1996; ERSIN *et al.*, 2006; FUJIWARA *et al.*, 1991; GRANATH *et al.*, 1993; GRINDEFJORD *et al.*, 1991; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002; O’SULLIVAN; TINANOFF, 1993; THIBODEAU; O’SULLIVAN, 1999; ZICKERT; EMILSON; KRASSE, 1983; ZOITPOULOS *et al.*, 1996). Embora a microflora oral de bebês seja consideravelmente diferente da que está presente em adultos ou crianças mais velhas, o grande nível de infecção por EGM pode indicar alto risco de cárie não somente em adultos e crianças mais velhas (MC CARTHY; SNYDER; PARKER, 1965), mas também em crianças durante a primeira infância (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983; VAN HOUTE; GIBBS; BUTERA, 1982). O sorotipo mais freqüente é o “c”, sendo isolado tanto nas crianças quanto nas mães (ALALUUSUA *et al.*, 1996).

A capacidade cariogênica do EGM depende de sua capacidade de produzir (acidogênica) e de tolerar (acidúrica) grandes quantidades de ácido lático. Três mecanismos desse grupo de bactérias contribuem para a proliferação e produção de ácidos. Primeiro, a maioria dos outros estreptococos são homofermentativos (produzem somente ácido lático), que, em termos de rendimento de energia, significa que eles são limitados à produção de 2 mols de ATP por mol de glicose metabolizada (SIMMONDS; TOMPKINS; GEORGE, 2000). Em contraste, os EGM são heterofermentativos (produzem tanto ácido lático quanto outros ácidos), podendo mudar a concentração relativa de enzimas na sua via glicolítica para produzir produtos ácidos mistos resultando numa produção de energia de 2 a 3 mols de ATP produzidos por mol de glicose metabolizada. Segundo, quando o pH declina, é extremamente difícil para uma bactéria manter a produção de energia. Os EGM conseguem manter o processo glicolítico em pH tão baixo quanto 5.0, que é um nível no qual outros microorganismos da placa, com exceção dos lactobacilos, são inibidos. Terceiro, como outras poucas bactérias da placa, o EGM estoca carboidrato não metabolizado na forma de polissacarídeos intracelulares, ou seja, quando as fontes externas tornam-se limitadas, a célula pode metabolizar os carboidratos de reserva e continuar crescendo e produzindo ácidos (SIMMONDS; TOMPKINS; GEORGE, 2000).

O interesse em pesquisar os EGM levou à criação de um método de isolamento preciso. Dessa forma Gold, Jordan e VanHoute (1973) desenvolveram um meio seletivo para esses microorganismos, no qual o ágar mitis salivarius foi utilizado como meio-base, após a descoberta de que este meio, seletivo para estreptococos orais, 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. Concentração de 20% inibia *S. sanguis* e *S. Mitis*, mas não o *S. salivarius*. 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. Dessa forma, a concentração de sacarose a 20% e 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de ágar mitis salivarius foi efetiva na seleção de EGM, passando esse meio a ser denominado ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). Apenas um pequeno grupo 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.

a) Colonização Inicial por Estreptococos do grupo mutans

Foi realizado um estudo longitudinal numa população de crianças de 2, 3 e 4 anos de idade, que residiam em Helsinqui, na qual foi avaliado o estabelecimento inicial, a frequência de isolamento e as mudanças na proporção de EGM na placa de incisivos e molares decíduos e na saliva com referência à experiência de cárie. Verificou-se que as 5 crianças que possuíam maior contaminação por EGM eram os indivíduos mais cárie-ativos e que o estabelecimento precoce de EGM na placa de incisivos decíduos pode indicar ataque de cárie precoce e extensivo na dentição decídua (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983).

Estudos sobre a colonização da cavidade oral pelos EGM têm indicado que as crianças adquirem esse microorganismo no começo da vida, mas não antes que o primeiro dente tenha erupcionado (BERKOWITZ; JORDAN; WHITE, 1975). Carlsson *et al.* (1970) encontrou dados referentes à não detecção de EGM em amostras de saliva de 27 crianças durante o primeiro ano de vida. Berkowitz, Jordan e White (1975) pesquisaram sobre o estabelecimento precoce dos EGM na cavidade oral de 138 crianças com idade de 3 semanas a 14 meses. EGM foram encontrados somente em 40 crianças. Estas, subsequente, tiveram todos os incisivos superiores extraídos aos 18 meses de idade por causa de cárie rampante. Saliva foi obtida de três sujeitos antes e depois da erupção do primeiro incisivo. EGM não foram detectados no período anterior à erupção, entretanto as amostras de placa foram positivas para EGM em espécimes obtidas 10 a 12 semanas após a erupção do primeiro incisivo decíduo.

Ao contrário da crença comum, existe evidência preliminar de que o EGM pode ser encontrado na cavidade oral antes da erupção dos dentes. Comparando crianças prematuras (CP) com crianças que nasceram após gestação de 9 meses (CN), foi observado que as CN tiveram uma maior prevalência de EGM. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que as CP têm menos contato pessoal com suas mães e, portanto menos exposição ao EGM, ou pelo fato de que seus tecidos orais estão menos desenvolvidos em relação às condições ótimas para a colonização por EGM (WAN *et al.*, 2001a). Em um outro estudo, também realizado com crianças pré-dentadas prematuras e CN, foi constatado que a prevalência de EGM foi de 50% nas CP e de 60% nas CN. A média de EGM foi menor nas CP ( $53 \pm 117$  CFU/mL) comparado às CN ( $166 \pm 47$  CFU/mL,  $p < 0.001$ ), entretanto a análise de risco mostrou que não há diferenças para CP e CN (WAN *et al.*, 2001b).

b) Presença de EGM após a erupção do primeiro dente decíduo

A prevalência de cárie e EGM salivar foram pesquisados em 356 crianças de 0 a 2 anos de idade do Japão, nas quais não houve detecção desses microorganismos em crianças com idade inferior a 6 meses. Todas as crianças nas quais foram detectados EGM já possuíam o primeiro dente. A concentração salivar de EGM foi correlacionada significativamente com o número de dentes erupcionados ( $r=0.339$ ,  $P<0.0001$ ). Um grande aumento no número de EGM foi observado com a erupção dos primeiros molares decíduos. As 80 crianças que não tinham cárie, mas possuíam EGM em 1988 mostraram um aumento significativamente maior de cáries do que as 181 crianças que não tinham cáries dentárias nem EGM em 1988 (FUJIWARA *et al.*, 1991).

Em estudo sobre a prevalência de EGM, realizado em 1189 crianças de 1 ano de idade residentes nos subúrbios de Estocolmo, foi feita a coleta bacteriana dos dois terços anteriores do dorso da língua, verificando-se presença de EGM em apenas 6,3% da população estudada. O consumo noturno e total de bebida contendo açúcar e a amamentação por um período maior que 10 meses foram associados à presença de EGM. Os resultados indicaram nessa população um padrão de comportamento predisposto, matematicamente determinado já estabelecido. A colonização precoce por EGM implica no aumento do risco às cáries na dentição decídua, e nesses casos, medidas preventivas precoces devem ser tomadas (GRINDEFJORD *et al.*, 1991).

Mattos-Graner *et al.* (1998), estudando sobre a associação entre prevalência de cárie e variáveis clínicas, microbiológicas e da dieta em crianças brasileiras de 1 a 2 anos e 6

meses de idade, detectaram EGM em 80,3 % das crianças estudadas. Entre essas, 58,5% tiveram 1-50 unidades formadoras de colônia (UFC) de EGM e 21,8% demonstraram mais que 50 UFC de EGM. As crianças que apresentavam mais que 50 UFC de EGM apresentaram significativamente maior número de lesões de cáries do que as que apresentaram níveis menores ( $p < 0.05$ ).

c) “Janela de infectividade”

Fujiwara *et al.* (1991) realizaram estudo com 356 crianças de 0 a 2 anos de idade. EGM foram encontrados em somente 7,3% na população com idade maior ou igual a 6 meses e menor que 1 ano. Aumentando a proporção para 29,7% na idade maior ou igual a 1 ano e 6 meses e menor que 2 anos; e para 43,4% na população com faixa etária maior ou igual a 2 anos e menor que 2 anos e 6 meses.

Posteriormente esses resultados puderam ser explicados pelo estudo de Caufield; Cutter e Dasanayke (1993), que comprovou a ocorrência de maior aquisição de EGM na infância em uma média de idade bem delineada, que vai dos 19 aos 31 meses de idade (média de 26 meses de idade), designada de “janela de infectividade”. Para esse estudo, os autores recrutaram pares de mães e filhos, os quais foram acompanhados desde o nascimento até os 3 e 6 anos de idade; e as mães foram selecionadas no seu terceiro mês de gravidez por terem altos níveis de EGM em saliva não estimulada. Trinta e oito das 46 crianças estudadas adquiriram EGM numa média de idade de 26 meses.

Estudo foi realizado com crianças brasileiras situadas na faixa etária entre 12 e 30 meses de idade, tendo como um dos objetivos investigar as variações da infecção por EGM durante o período de 1 ano de acompanhamento. Como resultados, observou-se que, no grupo que tinha de 12 a 24 meses de idade, houve um aumento na infecção por EGM em 33,9% dos casos, comparado a 16,9% dos casos de diminuição. Porém no grupo com 25 a 30 meses de idade, em 23,8% das crianças ocorreu aumento da infecção contra 38,1% nos quais observou-se redução (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001).

Em contraste com o conceito da “janela da infectividade” para o tempo de colonização dos EGM, Wan *et al.* (2003) encontraram um crescimento constante da categoria de infecção com as idades das crianças e com o aumento do número de dentes erupcionados. A prevalência cumulativa da colonização de EGM em todas as crianças foi 5%, 18%, 49%, 53%, 62%, 68%, 70%, 74,5% e 79% aos 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 meses de idade,

respectivamente. Demonstrando haver um aumento nos níveis de infecção por EGM com um aumento na idade.

d) Colonização por EGM dos 3 aos 5 anos

As cáries dentárias e os microorganismos associados na saliva e placa de crianças afro-caribeanas e caucasianas de 3 a 4 anos de idade foram avaliadas no sul de Londres, sendo verificado que o ceo-d sofreu significativo aumento com a idade e com os grupos étnicos. Tanto para crianças afro-caribeanas quanto para caucasianas, o ceo-d foi significativamente maior naqueles em que foram isolados na saliva EGM e lactobacillus (ZOITOPoulos *et al.*, 1996).

Avaliando associações entre prevalência de cárie e EGM, desenvolveu-se um estudo com 2.728 crianças pré-escolares sul-africanas com idade de 4 ou 5 anos, no qual cerca de 70% das crianças tinham ceo-s (número de superfícies cariadas, extraídas devido à cárie ou obturadas na dentição decídua)  $\leq 6$  e 60% tinham EGM detectáveis em quantidade  $\leq 10^5$  UFC/mL de saliva. Os resultados mostraram que cáries dentárias estavam associadas com EGM ( $p < 0,001$ ) de forma que, quanto menor fosse a contagem de EGM, menor seria o CPOS (número de superfícies cariadas, perdidas e obturadas) (GRANATH *et al.*, 1993).

e) EGM versus Padrão de localização das cáries

O'Sullivan e Tinanoff (1993) fizeram uma pesquisa com uma população de 3 e 4 anos de idade de Connecticut, na qual se realizaram exames clínicos e estimativa dos níveis de EGM obtidos de 481 crianças para definir a prevalência de cárie e padrões de lesões nos dentes anteriores dessa população comparada com níveis de EGM. Quarenta e quatro por cento das crianças tinham cárie. Elas foram categorizadas em ter somente cáries anteriores superiores (CAS), somente cáries posteriores (CP) ou ambos os padrões. CAS foram encontradas em apenas 16% da população. Das crianças com padrão anterior, 87% também possuíam padrão posterior. A percentagem de crianças que eram levadas com mamadeira para a cama, nas quais foram encontrados EGM, mas não tinham CAS, foi de 79%.

Três anos depois, com o objetivo de acessar a experiência de cáries, níveis de EGM e padrões de cárie em crianças americanas, foi realizado um estudo com 127 crianças de 4 anos de idade do Arizona com coleta de saliva. Foram examinados quatro padrões de cárie: anterior superior, fissuras, posterior proximal e posterior de superfície lisa vestibular/lingual.

O padrão anterior superior teve o menor percentual de superfícies restauradas e o maior percentual de superfícies extraídas. Foram obtidas amostras de EGM salivares de 120 crianças. As médias de ceo-s e ceo-d das crianças categorizadas com alta infecção por (>50CFU) foram significativamente maiores que as classificadas na categoria moderada (1-50CFU) ( $p < 0,05$ ) (DOUGLASS; O'SULLIVAN; TINANOFF, 1996).

f) Associação de fatores ligados à criança e à mãe com EGM

Matee *et al.* (1992) realizaram o primeiro estudo para avaliar prevalência de EGM em crianças com e sem cárie rampante que mamavam no peito. O grupo de estudo compreendia 34 crianças, sendo 17 com cárie rampante e 17 livres de cárie com idade entre 1 e 2,5 anos, provenientes da Tanzânia. Os autores verificaram que EGM e lactobacilli foram isolados da placa dental de todas as crianças com cárie rampante e da maioria daquelas livres de cárie. Foi concluído que a amamentação no peito permitia a colonização e proliferação de EGM e lactobacilos nos dentes de crianças jovens e que a cárie rampante pode ocorrer em crianças que mamam no peito na ausência de mamadeira ou qualquer outra forma de alimentação durante o desmame.

Três mil crianças com 6 a 18 meses de idade foram avaliadas em 46 centros de assistência social para crianças em diferentes partes da Suécia. Dessas, 200 foram selecionadas para um exame mais detalhado, envolvendo investigação da dieta, escovação e hábitos de sucção, uso de flúor e determinação salivar dos níveis de EGM e *Lactobacilli*. 63 de 3000 crianças (2,1%) tinham cáries e 61 (2,0%) ainda eram amamentados. Vinte (19,7%) dessas 61 crianças que ainda eram amamentadas comparado a 51 (1,7%) de 2939 crianças que não eram amamentadas representaram estatística significativa ( $p < 0,01$ ). Em relação à escovação, a maioria das crianças (85%) tinham os dentes escovados diariamente, 34% usavam dentifrícios (27% sem e 7% com flúor). Mais de 39% dos pais afirmaram que as crianças usavam tabletes contendo flúor diariamente. 76% dos indivíduos da pesquisa tinha hábito de sucção digital. Em relação às crianças que eram amamentadas, aquelas que não apresentavam cáries tinham menos EGM ( $10^2$  a  $10^4$  UFC/amostra) e *Lactobacilli* comparado às que apresentavam lesões cariosas ( $10^4$  a  $10^6$  UFC/amostra). Comparando as crianças amamentadas, com presença ou ausência de cárie em relação à contagem microbiológica, não houve diferença no número de EGM e *Lactobacilli* (HALLONSTEN *et al.*, 1995).

Em pesquisa feita com crianças com idade de 18 a 48 meses de uma escola pública de Piracicaba, estado de São Paulo, havia 3 grupos: cáries presentes (CP), cáries de

fóssulas e fissuras (CFF) e livres de cárie. Foi mostrado que os grupos CP e CFF tiveram baixa concentração de polissacarídeos insolúveis e EGM e altas frequências de exposição diária ao açúcar (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002).

Ersin *et al.* (2006) investigaram a relação entre microorganismos relacionados à cárie na saliva e a prevalência de CPI em crianças turcas com idade de 15 a 35 anos e suas associações com características das mães, critérios sócio-econômicos e hábitos de amamentação das crianças. Houve uma relação positiva entre CPI e níveis de EGM, e entre uso prolongado de mamadeira (maior que 12 meses) com leite adoçado e EGM. Não houve relação estatisticamente significativa de contagem de EGM com os seguintes fatores: contagem microbiológica do principal cuidador e CPI, escovação e CPI, renda familiar, duração da amamentação. Foi observada correlação negativa entre educação materna e contagem de EGM nas crianças.

#### g) Risco de cárie e EGM

Contagem do número de EGM em saliva estimulada tem sido utilizada para predição de cárie dental por décadas (IKEDA, SANDHAM, BRADLEY, 1973; LOESCHE *et al.*, 1995). Em estudo com pré-escolares feito por Granath *et al.* (1993) foi verificado que a baixa contagem de EGM é mais indicativa de menor número de cáries do que altas contagens indicando alta incidência da doença. Além disso o baixo poder preditivo do número de EGM, principalmente em indivíduos com cáries, mostra ser necessário uma reavaliação desse fator de risco (GRANATH *et al.*, 1993).

Em estudo realizado com 20 pré-escolares de Piracicaba, estado de São Paulo, foi verificado uma maior concentração de EGM em placa dentária de crianças com cárie da primeira infância e com cárie de fóssulas e fissuras do que em crianças livres de cárie (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002). Porém, Mattos-Graner *et al.* (2000) haviam mostrado que a incidência de cárie nas crianças estava mais dependente da capacidade dos EGM sintetizarem glucanos insolúveis do que do número dessa bactéria na placa.

Foi investigada a distribuição quantitativa de EGM em população rural de 307 crianças com idade estimada de 12 anos do Sudão com baixa prevalência de cárie. Cáries em dentes permanentes foi diagnosticada em 12% das crianças com média de CPOD de 0,17. EGM foram encontrados em 96% das crianças e altas contagens foram obtidas em 45% . Concluindo-se que EGM pode ser encontrado em população humana com prevalência de cárie extremamente baixa (CARLSSON *et al.*, 1987).

Está bem estabelecido que o melhor preditor de risco à cárie é a experiência prévia de cárie (BOWDEN, 1999), uma vez que crianças altamente contaminadas por EGM, podem ou não desenvolver a doença cárie (BEIGHTON, 2005). Nesse cenário, a saliva exerce uma importante função protetora (LENANDER-LUMIRAKI; LOIMARANTA, 2000).

### 2.3. Saliva

A saliva é uma mistura complexa de fluidos, com contribuições das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) (Figura 3), glândulas acessórias ou menores e fluido do sulco gengival (EDGAR, 1992). A função dessas glândulas salivares é mediada pelo receptor muscarínico  $M_3$ . A produção da saliva ocorre em resposta a impulsos nervosos aferentes enviados ao núcleo salivar, localizado próximo à junção da medula e pons. Esses núcleos são excitados por estímulos gustatórios e táteis da língua e da mucosa oral, assim como por outros estímulos corticais como odor, ansiedade e depressão. Em resposta, os centros salivares enviam impulsos por meio de nervos do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático para as glândulas salivares, fazendo com que ocorra a excreção de saliva (BAUM, 1987).

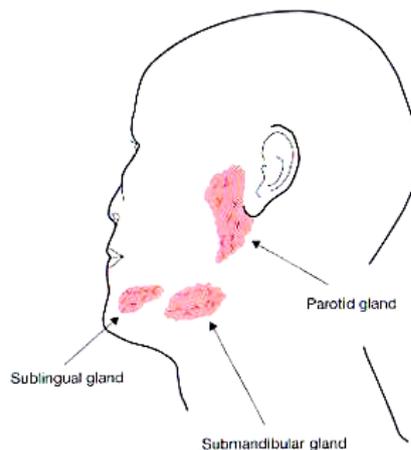


Figura 3: Localização das glândulas salivares maiores, a parótida, a submandibular e a sublingual em humanos. Fonte: Fejerskov; Kidd, 2008.

Glantz *et al.* (1989) sugeriram que a saliva deve ser melhor classificada como um tecido fluido do que como uma solução. Em seguida, foi proposto um modelo de estrutura para a saliva. De acordo com esse modelo, a saliva seria composta por 4 níveis de organização: (a) uma fase contínua composta de eletrócitos em água, (b) uma estrutura em

vários níveis parecendo uma rede, (c) proteínas solúveis em água, micelas salivares e/ou outras estruturas globulares salivares observadas no interior dos filamentos da rede de saliva e (d) material lipóide e células bacterianas e epiteliais (GLANTZ, 1997).

O volume diário de saliva produzido varia de 500 a 1500mL (HUMPHREY; WILLIAMSOM, 2001) e a média de volume presente na cavidade bucal é aproximadamente 1mL (LAGERLOF; DAWES, 1984). O padrão de secreção segue o ritmo circadiano, diminuindo durante o sono e aumentando quando se está acordado (DAWES, 1987).

### 2.3.1. Composição

A saliva é composta em sua maior parte por água (99%) (BAUM, 1987). Íons inorgânicos como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4^+$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{F}^-$  mantêm o balanço osmótico e proporcionam capacidade tampão e remineralizadora. Outros componentes incluem albumina, amônia, amilase, creatinina, cistatinas, esterases, glicose, gustina, histatinas imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), iodo, calicreína, lactoferrina, lactoperoxidase, calicreína dihidrogeno láctica, lisozima, mucinas, nitrogênio, Proteínas ricas em prolina, ribonucleases, ácido láctico, estaterina, sulfatos, tiocianato e uréia (FOX, 1989, HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; TENOVUO, 1998). Sua composição varia em resposta a diferentes estímulos (DAWES, 1990). O mais importante é o fluxo (LAGERLOF; OLIVERBY, 1994). Quando comidas aquosas são consumidas ocorre aumento do fluxo de secreção serosa com a finalidade de melhorar a digestão do bolo alimentar (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002).

Dos constituintes inorgânicos, os maiores íons (sódio, potássio, cloreto e bicarbonato) são os principais contribuintes para a osmolaridade da saliva, que é aproximadamente a metade do plasma. Bicarbonato é o principal tampão na saliva. Tiocianato relaciona-se com função antibacteriana da sialoperoxidase. O conteúdo de fluoreto é aproximadamente similar ao do plasma, mas é bem elevado naqueles que bebem água fluoretada ou usam dentifrícios fluoretados, tendo uma importante ação anti-cáries (EDGAR, 1992).

Dos constituintes orgânicos, as proteínas compreendem aproximadamente 200mg por 100mL, aproximadamente 3% da concentração de proteínas do plasma. Elas incluem enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antibacterianos, glicoproteínas mucosas (mucinas), traços de albumina, certos polipeptídeos e oligopeptídeos de importância na saúde oral (EDGAR, 1992).

#### a) Enzimas

A amilase é a principal enzima encontrada na saliva. Em estudo feito com 10 crianças de 1, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 dias de vida, foi observada secreção elevada de saliva entre os 90 e 180 dias de idade precedendo a erupção primária dos dentes. A concentração de amilase salivar no recém-nascido foi baixa. Aos 12 meses, a concentração dessa enzima atingiu valores próximos aos observados em crianças com idade entre 20 e 36 meses bem como em adultos jovens. A secreção da amilase salivar foi elevada a partir dos 60 dias de vida, podendo este fato ser responsável pela relativa tolerância ao amido do lactente pequeno (COLLARES; BRASIL; KAWAZAKI, 1979).

O sistema peroxidase humano é composto por duas enzimas: peroxidase salivar, que é produzida nas células acinares e mieloperoxidase, a qual se origina dos leucócitos gengivais (PRUITT, 1987). As principais funções do sistema são atividade antimicrobiana e proteção das proteínas do hospedeiro e das células contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio (TENOVUO; PRUITT, 1984). A atividade da peroxidase salivar em crianças pré-dentadas é alta. Ação da mieloperoxidase aumenta com a idade (HYYPÄ, 1989).

#### b) Imunoglobulinas

A imunoglobulina predominante é a IgA, aproximadamente 2mg/100mL de saliva, sendo seguida por IgG (1 – 5mg/100mL) e por IgM (0 – 2mg/100mL), que está presente em baixa quantidade, possivelmente surgindo do sulco gengival (EDGAR, 1992). IgA age agregando bactéria (KRASSE; GAHNBERG, 1983). Essa imunoglobulina também é direcionada contra moléculas bacterianas específicas, como as adesinas, ou contra enzimas como as glicosiltransferases (SMITH; TAUBMAN; EBERSOLE, 1979). Em estudo realizado com 33 crianças (pré-dentadas e dentadas) e 24 adultos, com média de idade entre 21 e 31 anos, foi observado que os níveis de IgA salivares totais foram significativamente maiores em adultos do que em crianças. Em relação a IgM, não foi encontrada diferença entre os grupos. Os níveis de IgG foram significativamente elevados entre crianças dentadas quando comparados a crianças pré-dentadas, e também foram altos entre o grupo de adultos estudados (HYYPÄ, 1989).

### c) Proteínas antibacterianas

Lisozima presente em saliva total é proveniente das glândulas salivares maiores e menores, fluido do sulco gengival e leucócitos salivares. O conceito clássico da ação dessa enzima está baseado na sua habilidade de hidrolizar ligações  $\beta(1-4)$  entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina da camada de peptidoglicano da parede das células bacterianas gram-positivas. Em adição, lisozima é uma proteína catiônica forte que pode ativar enzimas autolíticas bacterianas, podendo destruir componentes da parede celular (LAIBLE; GERMAINE, 1982).

Lactoferrina é uma proteína com efeito antimicrobiano atribuído a sua alta afinidade por ferro e à consequente privação desse metal essencial aos microorganismos. No seu estado livre de ferro, lactoferrina pode ligar-se diretamente à superfície de células bacterianas, levando à aglutinação de, por exemplo, EGM (ARNOLD; COLE; MCGHEE, 1977). Em contrapartida, a sialoperoxidase oxida o íon tiocianato salivar ( $\text{SCN}^-$ ) para hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), uma potente substância antibacteriana, utilizando peróxido de hidrogênio produzido pelas bactérias orais como oxidante (EDGAR, 1992).

### d) Glicoproteínas

O maior grupo das glicoproteínas consiste de duas classes de glicoproteínas mucosas (MG1 e MG2) encontradas na saliva submandibular e sublingual e do grupo de proteínas ricas em prolina encontradas na saliva da parótida (EDGAR, 1992).

Proteínas ricas em prolina (PRPs) também podem ser encontradas em alta concentração em secreções submandibulares. Essas PRPs representam aproximadamente 70% do total de proteínas secretadas. Elas podem ser divididas em ácidas, básicas e glicosiladas. As ácidas caracterizam-se pela abundância de prolina, ácido glutâmico/glutamina e glicina (HAY *et al.*, 1988).

### e) Outros polipeptídeos

Estaterina é um polipeptídeo de 43 resíduos. É a única proteína salivar que inibe a precipitação espontânea do sal de fosfato de cálcio da saliva supersaturada. O fragmento amino-terminal de 18 resíduos inibe o crescimento de cristais e parcialmente inibe precipitação espontânea. O peptídeo amino-terminal de 6 resíduos mostra uma quádrupla

inibição para o crescimento de cristais quando comparado com estaterina intacta, mas tem inibição mínima contra precipitação espontânea (HAY; MORENO; SCHLESINGER, 1979).

Cistatinas participam do processamento proteolítico, tendo sido isoladas formas de 121 resíduos de saliva total. Várias cistatinas salivares são fosforiladas e também se ligam a hidroxiapatita, inibindo o crescimento de cristais de sais de fosfato de cálcio, embora sua atividade seja aproximadamente um décimo comparada às estaterinas (SHOMERS *et al.*, 1982).

f) Associação de componentes salivares com doenças orais e com idade

Tenovuo *et al.* (1987) realizaram uma pesquisa procurando relacionar fatores antimicrobianos da saliva com a saúde oral. Três grupos de indivíduos foram estudados: crianças pré-dentadas (n=20, idade de 2 a 6 meses) e dentadas (n=16, idade de 1 a 3,8 anos) e adultos jovens (50 recrutas navais com idade de 19 a 21 anos). Nesse estudo, foi reportado que concentrações salivares de lisozima, peroxidase e hipotiocianato já estavam no mesmo nível dos adultos quando os dentes decíduos erupcionavam, considerando que concentrações de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), lactoferrina, mieloperoxidase e tiocianato foram significativamente mais baixas em crianças que em adultos. Crianças dentadas apresentaram mais IgG, tiocianato e proteínas na saliva total do que crianças pré-dentadas.

Estudo foi realizado com saliva total não estimulada para verificar a composição da saliva em crianças saudáveis relacionando com a idade. Foi coletada saliva de 136 indivíduos divididos em 5 grupos de acordo com a idade: (1) 25 crianças, 7-11 meses de idade; (2) 28 crianças, 2-3 anos de idade; (3) 28 crianças, 6-8 anos de idade; (4) 28 adolescentes, 12-14 anos de idade; (5) 27 adultos, 25-63 anos de idade. As concentrações de Na, K, proteínas totais, IgA e atividade de amilase foram mensuradas. Foi encontrada uma significativa correlação linear ascendente com a idade para concentrações de Na, proteínas totais, IgA e atividade de amilase. Houve diferença significativa entre os grupos com relação às concentrações de K e IgA. Atividade de amilase salivar foi variável, sendo encontrado diferença apenas nos dois primeiros grupos. Concluiu-se que a composição da saliva sofre mudança significativa durante a infância, implicando em um processo de desenvolvimento e maturação das glândulas salivares e indicando a necessidade de controles divididos por idade para o uso clínico da saliva (BEN-ARYEN *et al.*, 1990).

Acreditando serem os estudos transversais controversos, Kirstilä *et al.* (1998) realizaram um estudo longitudinal com acompanhamento de 2 anos a fim de encontrar

associações entre variáveis antimicrobianas salivares, bactéria cariogênica e incremento de cárie. A população estudada era composta de 63 sujeitos, sendo que todos completaram 13 anos de idade durante o primeiro ano do estudo. Durante o período de dois anos, um aumento estatisticamente significativo foi observado no fluxo, tiocianato, níveis de aglutinação, anticorpo IgA anti EGM, lactobacilos e anaeróbios totais, considerando que lisozima, lactoferrina e anticorpos IgG totais e anti EGM declinaram significativamente. Baseado nessas várias análises, pôde-se concluir que IgG total e hipotiocianato tiveram uma relação inversa com os subseqüentes 2 anos de incremento de cáries. Anticorpos IgG anti EGM aumentaram com o desenvolvimento das cáries. EGM e lactobacilos correlacionaram-se positivamente com o nível de cárie no início da pesquisa e com o incremento de cárie. Microflora anaeróbia total foi consistentemente mais abundante entre indivíduos sem cárie.

### 2.3.2. Funções

As principais funções da saliva são auxílio na digestão, lubrificação, reparo de tecido mole, manutenção do balanço ecológico, debridamento, agregação, antibacteriana, manutenção do pH, manutenção da integridade do dente e ainda funções excretoras, balanço hídrico e função hormonal (MANDEL, 1987).

Van Nieuw Amerongen, Bolscher e Veerman (2004) construíram um quadro com as principais funções da saliva, relacionando-o com a composição salivar (Figura 4).

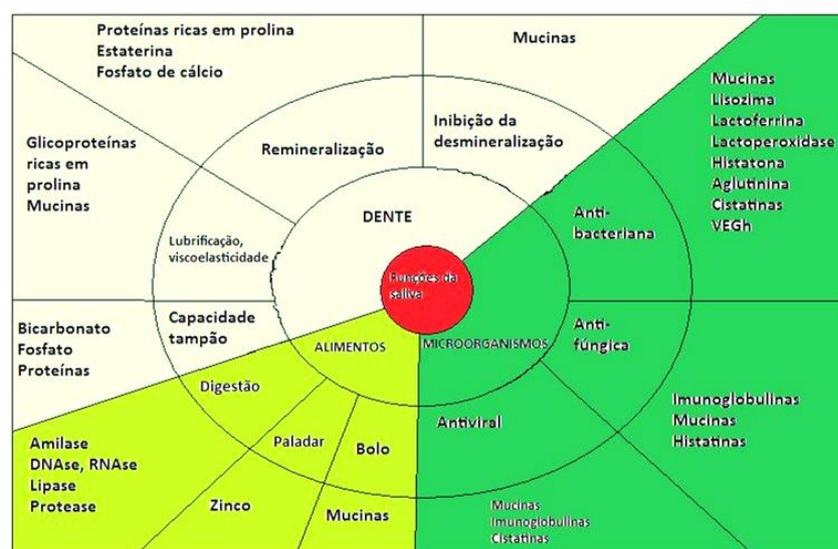


Figura 4: Principais funções da saliva em relação aos seus constituintes  
Adaptado: Van NieuwAmerongen; Bolscher; Veerman, 2004.

#### a) Auxílio na digestão

Embora a amilase seja a maior componente da secreção da parótida e esteja presente em nível apreciável no fluido submandibular, a função da saliva na digestão dos carboidratos é mínima. A única conversão efetiva de amido em maltose que ocorre na cavidade oral são nos sítios retentivos, e isso beneficia primariamente as bactérias da placa. A maior parte da comida é engolida rapidamente, e no estômago, a amilase salivar é minimamente efetiva devido ao baixo pH e à alta atividade proteolítica do suco gástrico (MANDEL, 1987).

A saliva também exerce um papel gastronômico, solubilizando vários componentes da comida e atuando como meio para interação com os receptores das células gustativas. Tem sido proposto que uma proteína salivar ligada ao zinco específica pode ser responsável pelo paladar (HATTON *et al.*, 1985).

#### b) Lubrificação e propriedade demulcente

Uma das mais importantes funções da saliva é de lubrificação, que é a habilidade de reduzir a fricção de uma substância entre duas superfícies em movimento, por exemplo, no caso das superfícies orais. Sem a propriedade de lubrificação, ocorreria irritação, destruição do tecido do dente e rápido efeito abrasivo nas superfícies epiteliais. Lubrificação da superfície oral pode ser devido à associação com filmes salivares como película do dente e à presença de um bom lubrificante (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007).

Outro efeito da água contida na saliva é a diluição de substâncias introduzidas na boca e a subsequente remoção por deglutição ou colocação para fora da boca. Comidas sólidas são primeiramente dissolvidas, entrando em ação o paladar e, em seguida, diluídas com o fluxo de saliva dentro da boca. Depois da deglutição do bolo de saliva ou comida, os resíduos de comida são removidos lentamente pelo fluxo de saliva não estimulada (EDGAR, 1992).

#### c) Debridamento e agregação

O fluxo de saliva aumentado pela atividade muscular dos lábios e da língua remove um grande número de potentes bactérias nocivas do dente e das superfícies mucosas. Esse mecanismo de limpeza é similar ao da lágrima no olho, espirro no nariz e tosse e

expectoração para os pulmões (MANDEL, 1987). Estudos experimentais em agregação tem focado atenção nas mucinas de alto peso molecular. A presença de múltiplos complexos de oligossacarídeos e micro heterogeneidade torna viável um grande número de possibilidades para interação com muitas bactérias (TABAK *et al.*, 1982)

#### d) Antibacteriana

Os fatores da defesa inata identificados na saliva têm sido extensivamente estudados *in vitro*. Eles expressam diferentes propriedades antimicrobianas (TENOVUO; LUMIRAKI, 1991, TENOVUO; LUMIRAKI; SOUKKA, 1991). Os principais constituintes da defesa inata oral são sistema peroxidase, lisozima, lactoferrina e histatinas. *In vitro*, já foi estabelecido que essas proteínas: (1) limitam crescimento de fungos ou bactérias, (2) interferem com a captação de glicose pela bactéria e com o metabolismo da glicose e (3) promovem agregação e, portanto eliminação da bactéria. Deve ser enfatizado que, em adição à ação antimicrobiana dos sistemas da peroxidase salivar e mieloperoxidase (MÄNSTRÖM *et al.*, 1987), um dos principais propósitos desse sistema é eliminar  $H_2O_2$ , que é altamente tóxico para as células dos mamíferos (HÄNSTROM; JOHANSSON; CARLSSON, 1983).

As imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgA secretora (sIgA) formam a base para defesa salivar específica contra flora oral microbiana, incluindo EGM. A mais abundante imunoglobulina na saliva, assim como em outras secreções humanas, é a sIgA dimérica, que é produzida pelas células do plasma localizadas nas glândulas salivares. Duas subclasses de IgA estão presentes na saliva: IgA1 forma o maior componente das imunoglobulinas, embora a quantidade relativa de IgA2 seja maior em saliva do que em outras secreções (TAPPUNI; CHALLACOMBRE, 1994).

#### e) Manutenção do pH e capacidade tampão

Saliva é efetiva em ajudar a manter pH relativamente neutro na cavidade oral, na placa bacteriana e no esôfago (MANDEL, 1987). A capacidade tampão da saliva estimulada e não-estimulada envolve três sistemas: bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), fosfato e sistema de proteínas-tampão. Esses sistemas têm diferentes faixas de pH na capacidade tampão máxima (BARDOW *et al.*, 2000). Os sistemas bicarbonato e fosfato têm valores de pH de 6,1 a 6,3 e 6,8 a 7, respectivamente. Desde que a maior parte da capacidade tampão salivar, durante a ingestão de comida e mastigação, é devido ao sistema bicarbonato (baseada no equilíbrio

$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ), a cavidade oral providencia suficiente fluxo salivar com componentes neutralizantes (BIRKHED; HEINTZE, 1989). O fosfato e o sistema tampão de proteínas têm uma contribuição menor para a capacidade tampão total, relativamente ao sistema bicarbonato. O sistema fosfato é, a princípio, análogo ao sistema bicarbonato, mas sem a importante capacidade tampão-fase, e ele é relativamente independente da secreção salivar (LENANDER-LUMIRAKI; LOIMARANTA, 2000).

#### f) Manutenção da integridade do dente

Em adição ao fato de ajudar a manter o pH, a saliva auxilia a proteger o dente de várias maneiras. Essa função protetora começa imediatamente após a erupção do dente na cavidade bucal. Embora a coroa esteja totalmente formada quando erupciona, ela está cristalograficamente incompleta. Interação com saliva proporciona uma maturação pós-eruptiva via difusão de íons como cálcio, fósforo, magnésio e fluoreto, assim como outros componentes para a superfície de esmalte. Essa maturação aumenta a dureza da superfície, diminui permeabilidade e tem demonstrado experimentalmente resistência às cáries (SHAW; WOLLMAN, 1958).

#### 2.3.3. Xerostomia

Xerostomia é definida por Fox *et al.* (1985) como percepção de boca seca. Segundo Nederfors (2000), boca seca não deve ser considerada um problema trivial na população, desde que constitua um fenômeno com muitos aspectos relativos à função oral e à qualidade de vida. Nenhum consenso global foi alcançado em relação à terminologia de boca seca, criando um problema substancial para pesquisa, educação, diagnóstico e terapia. Esse autor diferencia três aspectos: xerostomia, hipossalivação e saliva com composição alterada, concluindo que esses aspectos da hipofunção das glândulas salivares são entidades separadas, que estão relacionadas em vários aspectos, constituindo não apenas uma preocupação dental, mas também, médica e social.

Xerostomia pode resultar de várias causas como redução da hidratação dos tecidos moles orais. Uma redução no fluxo salivar está associada com marcado crescimento na incidência de cáries (DANIELS; FOX, 1992). Provavelmente, o mais trágico efeito no fluxo salivar levando à xerostomia é o efeito terapêutico da radiação de cabeça e pescoço (GARG; MALO, 1997). Radiação aplicada à glândula salivar pode levar a uma significativa redução do

fluxo salivar. Pacientes tratados contra câncer de cabeça e pescoço sempre se submetem à radiação danosa contra as glândulas salivares, resultando em redução da secreção. O dano mais extenso ocorre nos elementos secretores chamadas unidades acinares, que são mais afetadas pela radiação que os ductos (DANIELS; FOX, 1992).

Certas doenças também podem estar relacionadas à xerostomia, como a diabetes melito, mas a principal enfermidade associada é a síndrome de Sjögren, que é uma doença autoimune caracterizada por inflamação das glândulas com infiltração de linfócitos (DANIEL; FOX, 1992).

O uso de drogas é a fonte mais comum de xerostomia. Como várias drogas causam esse problema, a combinação do uso aumenta esse sintoma. Várias classes estão associadas com xerostomia. Elas reduzem a estimulação de certos receptores nas glândulas ou afetam o nível de hidratação dos tecidos moles orais. Drogas que afetam direta ou indiretamente os receptores nas glândulas incluem antimuscarínicos, anticolinérgicos, primeira geração de antagonistas de receptores de histamina ( $H_1$ ), antidepressivos tricíclicos e agentes anti-hipertensivos centrais (HUNTER; WILSON, 1995). Um estudo mostrou mudanças na composição de proteínas, mas não do total de proteínas por causa do tratamento com propanolol. Ao mesmo tempo, a incidência de cárie aumentou (WATSON *et al.*, 1990).

Dawes (1987) relaciona xerostomia com dois fatores. O primeiro é absorção de água pela mucosa oral, já que a saliva humana é sempre hipotônica com relação ao fluido intersticial, há sempre o potencial para absorção de água pela mucosa. De fato existe evidência de que possa ocorrer essa absorção, porém ainda permanecem incertezas de como ocorre. O segundo é evaporação de água da cavidade oral, para a qual tem sido dada pouca atenção, porém está bem definido que nos cachorros ocorre evaporação de água da língua como substituto para evaporação de doce. Fatores contribuintes para a evaporação incluem volume respiratório por minuto, percentagem de ar inspirado que passa pela boca e temperatura e umidade relativa do ar.

Para compensar a sensação seca da cavidade oral, pacientes não devem mascar e devem preferir dieta líquida ou semilíquida rica em carboidratos fermentáveis. Pelo fato de que a redução da mastigação piora a condição, pacientes devem procurar aconselhamento nutricional para limitar os efeitos danosos das modificações na dieta (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002).

#### 2.3.4. Uso da saliva como meio diagnóstico

O uso da saliva como fluido diagnóstico tem se tornado um sucesso na história da pesquisa. Tecnologias disponibilizam a saliva para ser usada com finalidade diagnóstica de doenças e prever sua progressão (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

Para ser pesquisada, a saliva pode ser coletada estimulada ou não estimulada. Dawes (1987) descreveu técnicas para coleta desses dois tipos:

- Saliva não-estimulada: existem diferentes formas de se fazer essa coleta, mas um período de tempo adequado é normalmente 5 minutos. Os sujeitos devem estar sentados confortavelmente, com os olhos abertos e em seguida um dos procedimentos é adotado: (1) o indivíduo curva a cabeça para frente e, depois de engolir a secreção inicial, permite o gotejamento de saliva através do lábio inferior em um cilindro graduado ou em um recipiente pré pesado. O sujeito pode ou não cuspir ao final do período da coleta; (2) mesmo anterior, mas a pessoa cospe depois de 60 minutos; (3) saliva é sugada continuamente do assoalho da boca por meio de um tubo de sucção, e depois acumulada em uma vasilha coletora; (4) swabs pré pesados e absorventes são inseridos na boca e removidos para pesagem no fim do período de coleta.

- Saliva estimulada: a importância de se coletar saliva estimulada está na obtenção de informações a respeito da capacidade secretora das glândulas. Estimulação farmacológica raramente é utilizada. Geralmente emprega-se estimulação gustatória (usualmente com ácido) ou mecânica (através da mastigação de materiais inertes, como parafina ou elásticos).

Estimação de alguns componentes orgânicos da saliva tem se tornado de considerável interesse diagnóstico. Os componentes orgânicos que têm sido estimados não são aqueles especificamente excretados pelas glândulas salivares. A indústria farmacêutica e os pesquisadores, e ainda os endocrinologistas têm percebido que a via de difusão para substâncias lipídio-solúveis para a saliva permite que níveis sanguíneos de cada substância sejam estimados através de análise de saliva. Além disso, as concentrações salivares são proporcionais não ao total de concentração de substâncias no plasma, mas à concentração de substâncias livres, que não estão ligadas. Por exemplo, concentrações salivares podem exceder concentrações sanguíneas, mas a proporcionalidade é mantida (FERGUSON, 1987). As maiores vantagens no uso da saliva para diagnóstico em relação ao sangue são o fácil acesso e o fato de ser uma coleta não-invasiva (FERGUSON, 1987, MALAMUD, 1992, MANDEL, 1990).

#### 2.3.4.1. Testes atualmente disponíveis

Desordens autoimunes podem ser identificadas através de teste salivares, como a síndrome de Sjögren. Um painel de determinantes salivares foi proposto para ser usado clinicamente como diagnóstico dessa síndrome. Esses incluem fluxo, pH, capacidade tampão, lactobacilos e concentração de leveduras. Vários desses testes individuais foram aprovados pela Administração Norte Americana de Comidas e Drogas (FDA). Foi sugerido que esses testes, quando feitos com saliva total, podem fornecer evidência para a presença da síndrome de Sjögren. Benefícios adicionais são o fato de serem não invasivos e poderem ser conduzidos em qualquer consultório médico ou odontológico (SREEBNY; ZHU, 1996).

Na endocrinologia, várias avaliações clínicas da função endócrina requerem um monitoramento temporal dos níveis de esteróides no plasma. Técnicas padrão de amostra de plasma ou urina não necessariamente fornecem amostras em condições ótimas requeridas nesse tipo de monitoramento (QUISSEL, 1993). Níveis salivares de hormônios esteróides refletem seus níveis na forma livre e, portanto ativa, enquanto medições no sangue refletem o nível total (livre e ligado). Conseqüentemente o uso da saliva para monitorar níveis de hormônio esteróide tem crescido (READ, 1989).

Em doenças infecciosas, teste para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um bom exemplo para a utilidade da saliva no diagnóstico de doenças. O desenvolvimento de anticorpos direcionados para a proteína viral específica e o desenvolvimento de tecnologias capazes de mensurar essas proteínas têm facilitado o uso do teste para infecção por HIV (SCULLY, 1997). Também tem existido interesse no uso da saliva para diagnóstico de infecção por *Helicobacter pilory* (KOUNTOURAS, 1998).

Saliva pode ser útil também como teste diagnóstico adjunto para câncer sistêmico, ou o teste salivar pode substituir metodologias diagnósticas atuais. Por exemplo, teste de saliva de baixo custo utilizado juntamente com imagens (como a mamografia) pode aumentar o valor diagnóstico desse teste e reduzir o número de falsos positivos e falsos negativos associados com os exames por imagem (KERLIKOWSKE *et al.*, 1995). Esse fato pode permitir que o diagnóstico de câncer seja feito em um estágio precoce, proporcionando ao paciente mais chances de sobrevivência por causa de várias opções de tratamento (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

Vários estudos utilizam a saliva para detecção de EGM (ALALUUSHUA *et al.*, 1996, BERKOWITZ; JORDAN; WHITE, 1975; FUJIWARA *et al.*, 1991, GRANATH *et al.*, 1993, GRINDEFJORD *et al.*, 1991, MATEE *et al.*, 1992, MATTOS-GRANER *et al.*, 1998,

MATTOS-GRANER *et al.*, 2001, RUDNEY; STAIKOV, 2002, THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996, THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1999, WAN *et al.*, 2003, ZICKERT; EMILSON; KRASSE, 1983, ZOITPOULOS *et al.*, 1996).

Estudo foi realizado com o objetivo de encontrar uma associação entre níveis de EGM salivares e prevalência, incidência e padrão de distribuição de cáries na primeira infância. Foram examinadas 146 crianças com média de idade de 3,8 anos. Saliva foi coletada no início da pesquisa e depois, anualmente por 2 anos. Foi observado que o risco relativo de ter cáries depois de dois anos nas crianças do grupo altamente infectado por EGM (>50 CFU) foi 2 vezes maior do que em crianças com baixo nível de infecção por esse microorganismo (0 CFU). O risco relativo entre todos os grupos foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) (THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996).

Ainda existem testes salivares para monitoramento de drogas e detecção do consumo de drogas ilícitas (SLAVKIN, 1998) e aplicação na área de psiquiatria (YAMADA; YAJIMA; HARANO, 1998). Por exemplo, saliva tem sido usada para monitorar respostas terapêuticas no tratamento da ansiedade através da mensuração de níveis salivares de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (YAMADA; YAJIMA; HARANO, 1998).

#### 2.3.4.2. Relevância

Saliva está sendo cada vez mais usada no diagnóstico e avaliação de doenças. Testes diagnósticos têm surgido para doenças onde há mudanças na composição salivar. Esses exames têm sido de maior utilidade quando a composição salivar reflete a composição do plasma (FERGUSON, 1987). O estudo e o uso do diagnóstico baseado na saliva têm aumentado exponencialmente durante os últimos 10 anos. Testes salivares clínicos mostram serem promissores. Existe, entretanto, uma grande necessidade de pesquisa adicional nessa área antes do valor real clínico da saliva poder ser determinado (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

A saliva tem recebido crescente interesse científico, não apenas pela excreção de vários componentes, mas também pela sua bem documentada relação com doenças sistêmicas virais e bacterianas. A natureza relativamente simples não-invasiva da coleta e sua relação com níveis plasmáticos fazem desse fluido uma atrativa ferramenta diagnóstica (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007).

## 2.4. Peptídeos Antimicrobianos

A imunidade inata é a primeira barreira que os micróbios invasores têm de ultrapassar quando estão entrando no organismo. Essa barreira consiste de elementos como por exemplo continuidade epitelial, secreção de glândula mucosa, movimentos ciliares, baixo pH no trato gastrointestinal e superfície da pele, presença de fagócitos, fatores humorais não-específicos e cascata complemento ativada alternativamente. Os peptídeos antimicrobianos (PAs) são um dos mais importantes elementos do sistema imune inato. Esses peptídeos são comuns entre todos os seres eucariontes, incluindo mamíferos, anfíbios, insetos, plantas e protozoários (GABAY, 1994).

Os PAs têm emergido como promissores agentes contra patógenos antibióticos resistentes. Esses peptídeos de genes codificados são encontrados principalmente em fagócitos e células epiteliais, mostrando atividade direta contra uma vasta gama de microorganismos (ZAIYOU, 2007).

### 2.4.1. Características Comuns

Os PAs compreendem uma família quimicamente e estruturalmente heterogênea. Todavia, três características partilhadas pelos peptídeos antimicrobianos conhecidos podem ser distinguidas (VAN T'HOF *et al.*, 2001):

- Em geral, esses peptídeos são moléculas pequenas, com massa molecular entre 1 e 5 KDa;
- A maioria é cátionica ou contém elementos modificados positivamente, possuindo de 10 a 25 aminoácidos, mas variações maiores também são observadas;
- Em solventes não-polares, eles mostram a tendência de formar estruturas anfipáticas, por exemplo, estruturas com domínios hidrofóbicos e hidrofílicos separados.

Por causa dessas características físico-químicas, esses peptídeos possuem tendência a se associarem com superfícies ou membranas microbianas modificadas negativamente (VAN T'HOF *et al.*, 2001).

As principais propriedades do sistema imune clássico são a alta especificidade e memória. Para os imunologistas, existem dois desafios intelectuais pendentes ligados ao

entendimento dessas duas propriedades. O valor intrínseco atribuído à resolução desses dois problemas é alto. A exigência pela alta especificidade tem necessariamente de ser ligada à propriedade de evitar auto-destruição e prevenir reinfecção imprescindíveis ao valor de sobrevivência do sistema imune. A principal vantagem dos PAs como fatores da imunidade inata é que eles podem funcionar sem alta especificidade e memória. Eles evitam o problema da auto-destruição pela compartimentalização celular ou pela especificidade a um alvo ausente no hospedeiro. Se a auto-destruição pode nesse sentido ser evitada sem um mecanismo complicado, isso é uma vantagem (BOMAN, 1995).

Dessa forma, ao contrário de antibióticos convencionais, como as penicilinas, que os micróbios rapidamente invadem; a aquisição de resistência por microorganismos contra peptídeos antimicrobianos é surpreendentemente improvável (ZASLOFF, 2002). Várias propriedades têm sido atribuídas aos PAs, como atividade antitumoral, indutor de mitose podendo estimular crescimento de fibroblastos e células epiteliais *in vitro*, moléculas sinalizadoras e ainda podem ligar a imunidade inata com a imunidade adaptativa (KAMYSZ; OKROJ; LUKASIAK, 2003), podendo modular outros componentes da imunidade inata, por exemplo, defensinas e PR-39 atuam como fatores quimiotáticos para monócitos e neutrófilos, respectivamente (HUANG; ROSS; BLECHA, 1997, TERRITO *et al.*, 1989).

Os detalhes precisos do mecanismo de ação dos PAs permanece desconhecido (ZAIYOU, 2007). Todavia, geralmente é aceito que os peptídeos modificados positivamente agem diretamente nas membranas modificadas negativamente das células bacterianas causando aumento da permeabilidade da membrana, levando rapidamente à morte celular (EPAND; VOGEL, 1999, FRIEDRICH *et al.*, 2000).

#### 2.4.2. Presença de PAs em diversos seres multicelulares

##### a) Insetos

Depois da descoberta de PAs induzíveis em seda de mariposa (STEINER *et al.*, 1981) e *Drosophila* (KYLSTEIN; SAMAKOVLIS; HULTMARK, 1990), os genes correspondentes foram clonados e sequenciados. Os genes foram expressos em células do sangue, epitélio e corpo de insetos, o qual é um órgão semelhante ao fígado de vertebrados que secreta proteínas e peptídeos diretamente para a hemolinfa animal (ZASLOFF 2002).

## b) Vertebrados

Expressão de peptídeos  $\beta$ -defensinas TAP (DIAMOND *et al.*, 1994) em células epiteliais do trato respiratório bovino e de  $\beta$ -defensina LAP, que é um peptídeo antimicrobiano encontrado na língua (SCHONWETTER; STOLZENBERG; ZASLOFF, 1995), é estimulada por lipopolissacarídeos (LPS), interleucina-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral. Regulação *in vivo* desses peptídeos ocorre na inflamação e após desafio bacteriano agudo (ZASLOFF, 2002).

## c) Plantas

Como animais, plantas também expressam PAs como defensinas e tioninas tanto constitutivamente quanto em resposta à invasão microbiana. O insulto inicial é transmitido por padrão de reconhecimento de alta especificidade, como o sítio nucleotídeo-vinculado mais leucina com Toll e receptores homólogos aos receptores IL-1 (Interleucina 1), análogos aos de mamíferos; em resposta, eles ativam a reação conectada relativamente específica contra organismos para os quais estão voltados, um conceito denominado estratégia de defesa “gene por gene” (DANGL; JONES, 2001).

### 2.4.3. Sítios de localização em seres humanos

Todas as superfícies epiteliais dos seres humanos são protegidas por PAs como  $\alpha$ -defensina humana (LEHER; GANZ, 1996) e  $\beta$ -defensina humana (hBD) (HARDER *et al.*, 1997) como parte da defesa inata. Um dos passos cruciais na defesa imunológica, levando à eliminação de micróbios invasores, é o combate aos microorganismos ingeridos através de proteínas antimicrobianas, incluindo as BPI (proteína com ação bactericida e permeabilidade aumentadas) e lactoferrina, assim como por meio de peptídeos, incluindo defensinas, catelicidinas e indolicidinas (GIROIR *et al.*, 1997, GUDMUNDSSON *et al.*, 1996, LEHRER; GANZ, 1996).

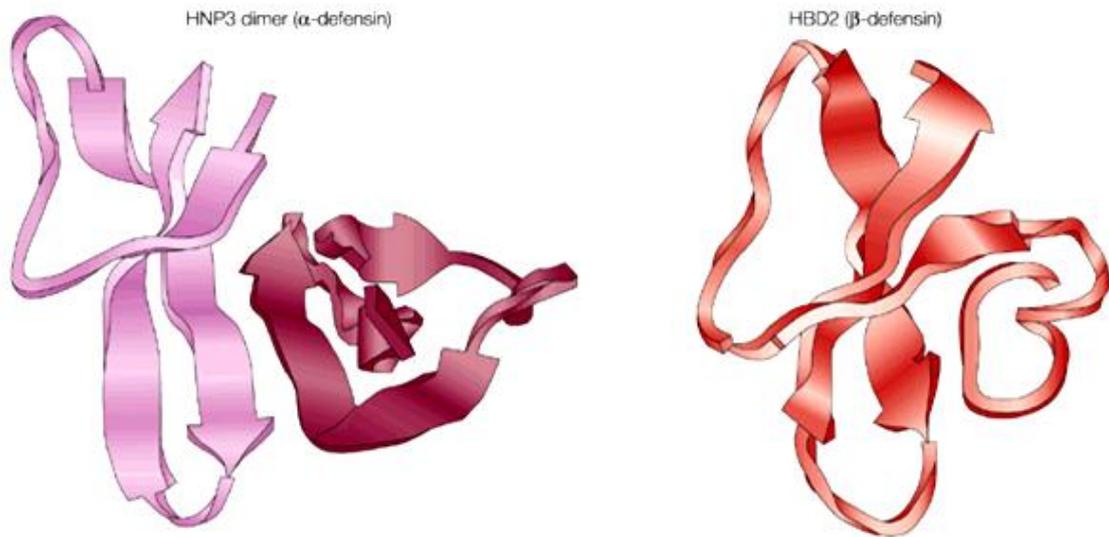


Figura 5: Representação das estruturas das  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas humanas.  
Fonte: Ganz, 2003.

Zhao, Wang e Lehrer (1996) fizeram um estudo para comparar a expressão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas em vários tecidos humanos. RNAm para  $\alpha$ -defensinas HNP1-3, abundante em osso esponjoso foi detectado nos leucócitos de sangue periférico, baço e timo por reação em cadeia de polimerase, que revelou  $\alpha$ -defensinas HD5 e HD6 somente no intestino delgado. Em contraste, o pâncreas e os rins expressaram altos níveis de hBD-1 e baixos níveis dessa  $\beta$ -defensina foram encontrados em vários órgãos (glândulas salivares > traquéia > próstata e placenta > timo, testículo e intestino delgado). O RNAm de hBD-1 foi produzido constitutivamente por células epiteliais normais humanas derivadas da traquéia, brônquios, vias aéreas pequenas e glândulas mamárias.

Em pesquisa realizada para verificar a complexidade da família das defensinas humanas, verificou-se a diversidade desta família, não estando restrita à expressão em leucócitos. Análises de “southern blot” e clone genômico revelaram que numerosas seqüências relacionadas a defensinas estão presentes no genoma humano. Foi caracterizado um gene para uma nova família de defensina humana, designado como defensina humana-5, altamente expresso em células de Paneth no intestino delgado (JONES; BEVINS, 1992).

No trabalho feito por MALLOW *et al.* (1996), também com células de Paneth, a amostra submetida à reação em cadeia de polimerase sugeriu que apenas duas isoformas de defensinas (HD-5 e HD-6) são expressas no intestino delgado, sendo menor que o número encontrado em ratos.

#### 2.4.4. Relação com doenças

Baixa expressão do peptídeo da catelicidina humana LL-37, hBD-2 e hBD-3 em lesões da pele causada por dermatite atópica coincide com a suscetibilidade reforçada para infecções na pele (ONG *et al.*, 2002). Na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), foi verificado que as  $\beta$ -defensinas podem bloquear a replicação do HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana -1) e foi interessante perceber que um polimorfismo em gene de  $\beta$ -defensina tem sido associado com manifestações clínicas da infecção por HIV-1, sugerindo que as  $\beta$ -defensinas humanas exercem importante função na defesa contra HIV (BRAIDA *et al.*, 2004).

Tem sido crescente a incidência e severidade de micoses invasivas e a resistência de patógenos dos fungos contra drogas antifúngicas atualmente disponíveis, levando os cientistas a explorarem as propriedades antifúngicas dos PAs (ZAIYOU, 2007). Nesse sentido, foi demonstrada evidência na função dos PAs na proteção contra fungos em estudo, mostrando que baixos níveis de histatina em saliva de grupo de pacientes com AIDS estavam correlacionados com alta incidência de candidíase oral (MANDEL; FATEHI, 1992).

Outra enfermidade que pode ser citada é a *Acne vulgaris*, que é uma desordem inflamatória crônica das unidades pilo-sebáceas, que afeta amplamente adolescentes e adultos jovens (GUARNA; COULSON; RUBINCHIK, 2006). Os principais eventos no desenvolvimento da lesão inflamatória *Acne vulgaris* envolve colonização e proliferação de *Propionibacterium acnes*, o qual tem mostrado resistência aos antibióticos convencionais. Por causa de sua habilidade em neutralizar endotoxinas e conseqüentemente inibir secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1) pelas células de defesa, peptídeos catiônicos podem ser potenciais candidatos para o tratamento da acne (ZAIYOU, 2007). Vários peptídeos e proteínas antimicrobianas incluindo lisozima, lactoferrina, defensinas e catelicidinas são produzidos pelo epitélio das vias aéreas e células inflamatórias e envolvidos em vários processos como defesa do hospedeiro, estimulação de resposta imune adaptativa e modulação da resposta inflamatória para doença pulmonar (BALS; HIEMSTRA, 2006).

Os PAs também estão relacionados com doença periodontal, que pode ser causada através de infecção por uma variedade de mudanças microbianas relacionada ao rompimento da mucosa oral. Nessa linha de observação, pacientes com neutropenia congênita severa com deficiência de PAs foram associados com ocorrência de infecção e doença periodontal (PUTSEP *et al.*, 2002).

O tratamento contra o câncer utilizando quimioterapia apresenta numerosas limitações, incluindo toxicidade e desenvolvimento de resistência contra várias drogas pelas células cancerosas. Os PAs também têm sido uma classe emergente e promissora de novas drogas naturais com atividade tóxica contra células cancerosas (ZAIYOU, 2007). Dentre várias outras doenças, os PAs ainda podem estar relacionados com o processo inflamatório da aterosclerose. Um aumento do processo de transcrição do peptídeo catelicidina LL-37 em lesões ateroscleróticas humanas comparado a artérias normais foi reportado (EDFELDT *et al.*, 2006).

#### 2.4.5. Importância de estudos sobre PAs

O tipo de atividade biológica dos PAs geralmente depende de sua concentração, por exemplo, em uma concentração mais baixa, eles podem influenciar transdução ou proliferação de sinais e, em uma concentração maior, podem ocasionar lise da célula. Provavelmente essa característica universal dos peptídeos contribui para sua conservação durante a evolução (KAMYSZ; OKROJ; LUKASIAK, 2003).

É necessário observar os peptídeos terapêuticos de maneira diferente da utilizada para os antibióticos convencionais. Uma vez que a maioria dos PAs são simples produtos da tradução de genes, são relativamente simples para produção por métodos de expressão recombinante, evitando problemas associados com proteólise e rápida destruição (VAN T'HOF *et al.*, 2001).

Os PAs possuem funções além das atividades antimicrobianas e representam um alvo atrativo para a produção de futuros agentes terapêuticos. Adicionalmente, ainda existem vários problemas não resolvidos a serem considerados como: técnicas padrão para assessorar atividade desses peptídeos, mecanismos de regulação celular de certas  $\alpha$ -defensinas são pobremente definidos, habilidade para essas futuras medicações atingirem o alvo das doenças permanece como um desafio, nível de tolerância e toxicidade desses peptídeos precisam ser definidos e finalmente o entendimento da expressão dos PAs na saúde e na doença permanece como um desafio na área da pesquisa. Ou seja, pesquisas que envolvem esses assuntos fornecem importantes descobertas na patofisiologia dos PAs nas doenças (ZAIYOU, 2007).

## 2.5. Peptídeos antimicrobianos da cavidade oral

A cavidade oral é um meio ambiente com características intrínsecas. A mucosa oral é uma interface protetora crítica entre o meio externo e interno e serve como barreira para os milhares de microorganismos existentes na boca. Saliva, superfície epitelial e leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) são elementos que contribuem para manter a saúde da cavidade oral e do periodonto. Os PAs estão presentes em cada um desses elementos, contribuindo de maneira importante para o balanço entre saúde e doença como parte da resposta imune inata do hospedeiro (DALE *et al.*, 2006). Diversos peptídeos têm sido relatados no meio oral, tais como os derivados das seguintes proteínas: catelicidinas (ALTMAN *et al.*, 2006, MURAKAMI *et al.*, 2002, TAO *et al.*, 2005, WOO *et al.*, 2003), defensinas (DALE *et al.*, 2001, DUNSCHÉ *et al.*, 2002, MATHEWS *et al.*, 1999, McKAY *et al.*, 1999, MIZUKAWA *et al.*, 1999a, MIZUKAWA *et al.*, 1999b, SAHASRABUDHE *et al.*, 2000, TAO, 2005), proteínas ricas em prolina (PRPs) (AYAD *et al.*, 2000, PERINPANAYAGAM; VANWUYCKHUYSE; TABAK, 1995), histatinas e estaterinas (PERINPANAYAGAM; VANWUYCKHUYSE; TABAK, 1995).

Um dos métodos que tem emergido na caracterização de peptídeos de baixo peso molecular é o LC/MS (Cromatografia líquida de alta pressão acoplada ao espectrômetro de massa) (LINSCHÉID *et al.*, 2009). LC/MS comparativo pode ser feito determinando o volume do pico formado através desse método para cada massa e comparando esses resultados através de vários processamentos de diferentes amostras, que irão prover uma visão quantitativa abrangente de milhares de concentrações de peptídeos entre as amostras. A partir dessa visão geral, uma lista de diferentes peptídeos selecionados pode ser produzida para subsequente fragmentação através do LC-MS/MS com a finalidade de se obter informação sobre sequência de peptídeos selecionados (AMERICA; CORDEWENER, 2008).

### 2.5.1. Presença nos tecidos orais e no sulco gengival

Em estudo realizado para verificar a presença de defensina no sulco gengival, microesferas paramagnéticas revestidas com anticorpos contra defensinas foram utilizadas para recuperar esses peptídeos do sulco gengival. A amostra constava de 20 sítios; defensinas foram encontradas em 100% dos sítios, variando de uma quantidade de 270 a 2000 ng/sítio. As grandes concentrações locais de defensinas, estimadas em mg/mL, provavelmente possuem importantes efeitos na microbiologia do sulco gengival (McKAY *et al.*, 1999)

Dale *et al.* (2001), utilizando anticorpos e hibridização *in situ*, procuraram estudar a presença de PAs no epitélio variado do periodonto e em células epiteliais gengivais cultivadas. No tecido gengival, RNAm para as  $\beta$ -defensinas hBD-1 e hBD-2 foi localizado predominantemente no epitélio estratificado suprabasal, e os peptídeos foram detectados nas camadas epiteliais superiores consistentes com a formação de barreira epitelial estratificada. Nas células epiteliais cultivadas, os peptídeos hBD-1 e hBD-2 foram detectados somente no período da diferenciação, apesar de hBD-2 requerer estimulação por mediadores pró-inflamatórios ou produtos bacterianos para expressão.  $\beta$ -defensinas não foram detectadas no epitélio juncional, em contraste,  $\alpha$ -defensinas e o membro LL-37 da família das catelicidinas foram detectados em neutrófilos polimorfonucleares que migraram através do epitélio juncional.

Dunsche *et al.* (2002) investigaram a expressão de hBD em tecidos por reação em cadeia de polimerase transcriptase-reversa (RCP-TR). Foram examinados queratinócitos (n=3) e fibroblastos (n=3), amostras de tecido, sendo 64 sem inflamação e 40 inflamados e 10 amostras de glândulas salivares. Foi demonstrado a expressão de hBD-3 (61/64), hBD-1 (64/64) e hBD-2 (64/64) em tecidos orais não inflamados. Em contraste, apenas 23, 22 e 24 dos 40 tecidos inflamados mostraram hBD-1, hBD-2 e hBD-3 detectáveis, respectivamente. Nas glândulas salivares, a expressão de RNAm foi constitutiva para hBD-1, freqüente para hBD-2 (9/10) e infreqüente para hBD-3 (4/10). Queratinócitos orais, mas não fibroblastos, continham transcritos para  $\beta$ -defensina sugerindo que hBD-3 também é produzida nos compartimentos epiteliais dos tecidos orais.

Para examinar a expressão do peptídeo LL-37, proveniente da catelicidina, nas glândulas salivares humanas e investigar a regulação da catelicidina em condições inflamatórias, foi realizado um estudo com reação transcriptase-polimerase reversa e imunohistoquímica em 20 tecidos de glândulas salivares. Tendo como resultado a presença desse peptídeo em glândulas salivares normais e com sialoadenite crônica (WOO *et al.*, 2003). Em trabalho realizado por Altman *et al.* (2006), foi comparada a ação do peptídeo derivado de anfíbio K<sub>4</sub>-S4(1-15) contra patógenos orais associados à cárie e periodontite com a atividade dos peptídeos humanos LL-37, anteriormente encontrado em glândulas salivares, e dhvar4a. As espécies cariogênicas *Streptococos do grupo mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus paracasei* e *Actinomyces viscosus* foram resistentes a LL-37 encontrada na cavidade oral. *Porphyromonas gingivalis* foram as espécies mais resistentes aos três peptídeos testados. K<sub>4</sub>-S4(1-15) mostrou maior atividade contra uma bactéria planctônica testada, e esse peptídeo foi bactericida na superfície atacada por EGM assim como em biofilme contendo

EGM in vitro. Contudo, o ataque à superfície aumenta a resistência do EGM ao peptídeo antimicrobiano.

### 2.5.2. Presença na saliva

A saliva humana contém apreciáveis quantidades de aminoácidos livres (FONTELES *et al.*, 2009, VANWUYCKHUYSE, 1995) e peptídeos de baixo peso molecular (MADAPALLIMATTAM; BENNICK, 1990). Espécies desse tamanho estão submetidas a mudanças com a fase aquosa da placa dentária (TATEVOSSIAN, 1990), podendo representar substratos metabólicos potenciais para a microflora da placa. Várias funções têm sido atribuídas aos peptídeos salivares, como: antifúngica contra *Candida albicans* (OPPENHEIM *et al.*, 1988, RAJ; ANTONYRAJ; KARUNAKARAN, 2000), antiviral contra HIV (ZHANG *et al.*, 2002), antibacteriana contra EGM, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* (OUHARA *et al.*, 2005, TANAKA; MIYASAKI; LEHRER, 2000).

Histatinas 1, 3 e 5 da secreção da parótida humana foram isoladas por meio de filtração em Bio-Gel P-2 e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa. Foi determinada a estrutura da amostra, sendo sugerido que histatinas 1 e 3 são derivadas de diferentes genes estruturais, considerando que histatina 5 é um produto proteolítico da histatina 3. Todas as três histatinas demonstraram ação letal contra *Candida albicans* (OPPENHEIM *et al.*, 1988).

A atividade microbicida das defensinas também foi avaliada contra *Candida albicans*, duas bactérias Gram-negativas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*) e duas bactérias Gram-positivas (*Streptococcus gordonii* e *Streptococcus do grupo mutans*). Os peptídeos HNP1 e HNP2 foram potentes contra *Candida albicans*. As bactérias Gram negativas e Gram positivas foram insensíveis para as defensinas humanas. Todavia, a inserção de dois resíduos básicos na arginina, tanto na região N-terminal como na região C-terminal da HNP 2, permitiu o desenvolvimento de atividade antifúngica e antibacteriana (RAJ; ANTONYRAJ; KARUNAKARAN, 2000).

Os linfócitos T CD8 de certos indivíduos infectados por HIV-1 que estão imunologicamente estáveis secretam um fator solúvel denominado CAF, que suprime a replicação de HIV-1. Foi identificado, em uma pesquisa, um grupo de proteínas que são secretadas quando células T CD8 de pacientes estáveis infectados por HIV-1 são estimuladas. Esse grupo é formado pelas  $\alpha$ -defensinas 1, 2 e 3 (ZHANG *et al.*, 2002).

Peptídeos antimicrobianos sintéticos das  $\beta$ -defensinas-1 humanas (hBD1), hBD2, hBD3 e LL-37 foram avaliados quanto à atividade microbiana contra bactéria oral. Foram incluídas no estudo as seguintes bactérias: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus do grupo mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*. Embora os quatro peptídeos estudados tenham apresentado atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas, o nível de atividade antibacteriana foi variável entre as diferentes estirpes e espécies. A atividade antibacteriana de hBD1 foi menor que a dos outros peptídeos. Entre as bactérias testadas no estudo, *F. nucleatum* foi a mais suscetível a hBD3 e LL-37 e *S. mutans* foi a mais suscetível a hBD3 (OUHARA *et al.*, 2005).

Atividade bactericida da LL-37 sintética, que é uma catelicidina, foi testada contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (três estirpes) e *Capnocytophaga* spp. (três estirpes). Todas as estirpes foram sensíveis à LL-37 e exibiram dose 99% efetiva de 7,5 a 11,6  $\mu\text{g/mL}$  (TANAKA; MIYASAKI; LEHRER, 2000).

Diversos PAs foram encontrados na saliva como está demonstrado no quadro 1.

Quadro 1: Trabalhos científicos mostrando diferentes tipos de peptídeos encontrados na saliva

| Seqüência do peptídeo   | Proteína precursora              | Relação com cárie | População  | Bibliografia                        |
|---|----------------------------------|-------------------|------------|-------------------------------------|
| SPPGKPQGPPPPQ, PPPPGKPQGPP, PPGKPQGPPPPQG, PPGKPQGPPPPQG        | Proteína Rica em Prolina (IB-7)  | sim               | 18 adultos | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| SPPGKPQGPPPPQGGNQPQGPPPP PGKPQGPPPPQGGNKPQGPPPP GKPQGP PPQGDNKS | (IB-7)                           | não               | 1 adulto   | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GRPQGPPQGGHQ, PPPPPG, GPPPPQ                                    | Proteína Rica em Prolina (IB-8b) | sim               | 18 adultos | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| GRPQGPPQGGHQGPP PPPPGKPQGPPPPQGGRPQGPP QGQSPQ                   | (IB-8b)                          | não               | 1 adulto   | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GPPPPQGGRPQ   | Proteína Rica em Prolina         | não               | 3 adultos  | HUANG <i>et al.</i> , 2008          |
| PQAPPA, PQQPQAPPAGQPQ   | Proteína Rica em Prolina (IB-4)  | sim               | 18 adultos | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| YPPGPLAPPQPFPGFVPPPPPPYGGP                                      | Proteína Rica em Prolina (P-B)   | sim               | 18 adultos | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| PQQPQAPPAGKPQGP, PPRPAQGQQ                                      | Proteína Rica em Prolina (IB-5)  | sim               | 18 adultos | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |

| Seqüência do peptídeo (continuação)                             | Proteína precursora                | Relação com cárie | População                                | Bibliografia                        |
|---|------------------------------------|-------------------|--|-------------------------------------|
| GQSPQ   | aPRP-1, aPRP-2, aPIF-s, bPRP IB-8b | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| SKSRSA  | bPRP IB-8c                         | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GKSRSPR   | bPRP IB-9                          | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GKSRSPR   | bPRP IB-1                          | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GKSRSPR   | bPRP II-2                          | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| GPPQPPQGPP, GPPGQ   | IB-7                               | sim               | 18 adultos                               | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| GPPG, DRPP  | IB-4                               | sim               | 18 adultos                               | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| SPVLDEVPA   | IB-5                               | sim               | 18 adultos                               | AYAD <i>et al.</i> , 2000           |
| DSHAK, DSHAKR, SHAKR, HEKHHSHRGY, HSHRGY, SNLYYDN, NYLYDN, LYDN | Histatina 3                        | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1995 |
| FGYGYGPY  | Estaterina                         | não               | 1 adulto                                 | PERINPANAYAGAM <i>et al.</i> , 1996 |
| CZQRIKDFLRNLVPRTES, CZNLYRLLDLDPRPTMD                           | Catelicidina LL-37                 | não               | 2 adultos                                | MURAKAMI <i>et al.</i> , 2002       |
| Não seqüenciado   | Catelicidina LL-37                 | não               | 149 crianças entre 11 e 15 anos de idade | TAO <i>et al.</i> , 2005            |
| Não seqüenciado   | Beta defensina humana-1 (hBD-1)    | não               | 8 adultos                                | SAHASRABUDHE <i>et al.</i> , 2000   |
| Não seqüenciado   | hBD-1                              | não               | 5 adultos                                | MATHEWS <i>et al.</i> , 1999        |
| AYRIPAIAGERRYGTIYQGRLWAF  | hBD-1                              | não               | 39 adultos                               | MIZUKAWA <i>et al.</i> , 1999a      |
| AYRIPAIAGERRYGTIYQGRLWAF  | hBD-1                              | não               | 28 adultos                               | MIZUKAWA <i>et al.</i> , 1999b      |
| Não seqüenciado   | hBD-2                              | não               | 5 adultos                                | MATHEWS <i>et al.</i> , 1999        |
| Não seqüenciado   | hBD-3                              | não               | 149 crianças entre 11 e 15 anos de idade | TAO <i>et al.</i> , 2005            |
| Não seqüenciado   | Alfa-defensina HNP1-3              | sim               | 149 crianças entre 11 e 15 anos de idade | TAO <i>et al.</i> , 2005            |

O primeiro estudo existente na literatura relacionando fracionamento de peptídeos de baixo peso molecular em saliva de crianças com cárie foi feito por Kohyama, Shimomura e Sanada (1984). Nesse trabalho, foi obtido saliva total de 48 crianças de 3 a 9 anos de idade, com cáries. Utilizou-se o índice de severidade de cáries (CSI) durante o exame clínico. As amostras de saliva foram purificadas em colunas de Bio Gel P-6 e processadas no HPLC.

Foram encontrados dois picos diferentes entre os grupos com alto CSI e baixo CSI. Esses picos tinham peso molecular entre 1500Da e 4000Da, e encontravam-se em maior concentração nas crianças com alto CSI.

Perinpanayagam *et al.* (1995) caracterizaram e fizeram a análise da seqüência de vários peptídeos de baixo peso molecular, que foram purificados da saliva de parótida humana de 1 indivíduo através de colunas de Bio Gel P-2, processadas no HPLC e caracterizadas com as respectivas seqüência de aminoácidos. Através das seqüências obtidas, os PAs encontrados provavelmente são derivados da proteólise das proteínas histatinas, proteínas ricas em prolina e estaterinas. Como a saliva da parótida é um líquido que não possui microorganismos, muitos dos PAs fracionados dessa secreção parecem ter derivado do processo proteolítico de grandes proteínas.

Posteriormente, a saliva foi utilizada para encontrar relação de PAs com várias doenças orais em um estudo que verificou a presença do peptídeo antimicrobiano HNP-1 em 21 pacientes. Saliva total foi coletada, isolada e purificada por meio de HPLC, a seqüência de aminoácidos foi determinada e o peso molecular da HNP-1 foi mensurado através do espectrômetro de massa. Como resultados, foi mostrado que a concentração de HNP-1 na saliva de pacientes com líquen plano (n=5), leucoplasia (n=4), glossite associada com deficiência de ferro (n=4) foi  $8,3 \pm 4,3\mu\text{g/mL}$ ,  $13,2 \pm 7,9\mu\text{g/mL}$  e  $11,4 \pm 4,9\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Essas concentrações foram significativamente maiores que aquelas de sujeitos saudáveis ( $0,8\mu\text{g/mL}$ ). Em contraste, concentrações salivares de HNP-1 em pacientes com glossodínia (n=4) e desconforto oral (n=4) foi similar àquele de indivíduos saudáveis (Mizukawa *et al.*, 1999a).

No mesmo ano, foi realizado trabalho semelhante, mas em 10 pacientes com inflamação oral, no qual foi verificado que a concentração de HNP-1 era significativamente maior em pacientes com inflamação oral do que em voluntários saudáveis. Em pacientes com inflamação oral, a concentração foi significativamente maior antes do que depois do tratamento. Ainda foi encontrado nessa população uma forte correlação positiva entre a concentração de defensina-1 salivar e a concentração da proteína C-reativa (Mizukawa *et al.*, 1999b).

Mattews *et al.* (1999) analisaram a produção de peptídeo derivado da  $\beta$ -defensina por mucosa oral e glândulas salivares. Nesse estudo, foi caracterizada a expressão de RNAm de hBD-1 e hBD-2 nas glândulas salivares, na língua, gengiva e mucosa bucal e detectado peptídeos de  $\beta$ -defensina em secreções salivares. A expressão de RNAm foi quantificada por ensaios de proteção RNase, sendo detectado RNAm de hBD-1 em gengiva, glândula

parótida, mucosa bucal e língua. Western Blot, cromatografia líquida e espectrômetro de massa foram utilizados para identificar peptídeos de hBD-1 e hBD-2 em saliva humana. A expressão de hBD-1 foi constitutiva, enquanto a expressão de hBD-2 foi induzida por IL-1 $\beta$  e LPS.

Outra pesquisa foi delineada para detectar a expressão e localização do peptídeo de hBD-1 em glândulas salivares e na saliva. Foram feitas biópsias de pacientes com mucocele (n=20), havendo a detecção desse peptídeo por imunohistoquímica e expressão localizada em células ductais e não em células acinares nessas glândulas. O peptídeo estava localizado apicalmente próximo ao lúmen nas células do ducto. Análise de Western-Blot também detectou peptídeo de hBD-1 em saliva total, acidificada, não estimulada de voluntários sadios (SAHASRABUDHE *et al.*, 2000).

PAs de catelicidinas também foram encontrados em glândulas salivares e saliva em pesquisa realizada para examinar a expressão de RNAm e proteínas em ratos e saliva humana (MURAKAMI *et al.*, 2002).

Buscando uma associação dos PAs derivados das Proteínas Ricas em Prolina (PRPs) com a experiência de cárie foi realizado um estudo com 18 adultos, sendo 9 livres de cárie e 9 com cárie. A análise identificou 18 peptídeos que pareciam ser produtos de clivagem proteolítica das PRPs IB-4, IB-5, IB-7, IB8b e P-B. Os peptídeos mais abundantes no grupo sem cárie diferiu daqueles isolados do grupo com cárie. A concentração média de peptídeos de uma possível proteína precursora denominada IB-7 foi encontrada em maior quantidade na saliva coletada de indivíduos sem cárie. Os resultados desse trabalho mostraram que o processo proteolítico de proteínas da saliva da parótida difere entre indivíduos com e sem cárie (AYAD *et al.*, 2000).

Posteriormente foi realizado um estudo com o objetivo de determinar a possível relação entre a prevalência de cárie e as concentrações salivares dos peptídeos hBD-3, catelicidina LL 37 e  $\alpha$ -defensina HNP1-3 (mistura de HNP1, 2, 3). Saliva total foi coletada de 149 crianças com idade entre 11 e 15 anos. Enquanto os níveis de LL-37 e hBD-3 não se correlacionaram com experiência de cárie, a média dos níveis de HNP1-3 foi significativamente maior nas crianças sem cárie do que nas crianças com cárie. Crianças com altos níveis de cárie não possuíam altos níveis de EGM, portanto HNP1-3 não foi correlacionado com EGM salivar. Através de imunohistoquímica, foi localizado HNP1-3 em células do ducto salivar das glândulas submandibulares (TAO *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Huang *et al.* (2008), nove peptídeos ricos em prolina foram sequenciados. O peptídeo GPPPQGGRPQ liga-se à bactéria Gram positiva

*Propionibacterium acnes* e inibe consideravelmente o crescimento bacteriano. Esse , por exibir imunidade inata, pode ser aplicado no tratamento de várias doenças humanas associadas ao *P. acnes*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Estudar o perfil de peptídeos salivares de crianças com e sem cárie da primeira infância.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar perfil qualitativo de peptídeos de saliva total humana de crianças com e sem cárie da primeira infância;
- Avaliar níveis de EGM salivares;
- Avaliar experiência de cárie da população estudada;
- Correlacionar composição dos peptídeos presentes em saliva total humana, níveis de EGM salivares e experiência de cárie.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O projeto dessa pesquisa foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMPEPE) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado em 22/03/07 sob o protocolo nº 53/07, ofício nº 234/07 (Anexo A).

### **4.1. Protocolo clínico**

#### **4.1.1. Desenho**

O desenho consistiu de um estudo observacional transversal.

#### **4.1.2. Examinadores**

A coleta das amostras foi realizada com auxílio de 2 (dois) alunos do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo um único examinador (pesquisadora) responsável pelo exame clínico para detecção de cárie dos participantes cadastrados. Os alunos e a examinadora desconheciam os resultados das análises concernentes a esses indivíduos, pois as amostras foram submetidas à análise contendo apenas um número de identificação. A pesquisadora contou com o auxílio dos alunos bolsistas durante a análise microbiológica e bioquímica das amostras e foi responsável pela contagem dos microorganismos, pela leitura dos testes bioquímicos para identificação dos microorganismos e pela análise dos peptídeos salivares.

#### **4.1.3. Amostra**

Este estudo foi desenvolvido no município de Fortaleza, na Universidade Federal do Ceará (UFC). Um total de 106 voluntários sadios, com (48) e sem (58) cárie da primeira infância, de ambos os sexos, com idade de 10 a 71 meses (média = 45,97; desvio padrão = 15,61), foram selecionados para participação no estudo.

#### 4.1.4. Critérios de inclusão dos participantes

Os seguintes critérios foram adotados no processo de recrutamento dos voluntários:

- Crianças de ambos os sexos;
- Sadias;
- Com idade situada na faixa de 6 a 71 meses;
- Com padrão normal de crescimento e desenvolvimento;
- Ausência de doenças conhecidas;
- Ausência de terapia medicamentosa no período de coleta de material;
- Livres de cárie (ausência de lesões cárias clinicamente detectadas) (Grupo 1);
- Portadoras de cárie da primeira infância (presença de lesões cárias clinicamente detectadas) (Grupo 2).

#### 4.1.5. Critérios de exclusão dos participantes

Foram excluídos do estudo voluntários que se enquadrem nos seguintes critérios:

- Presença de doenças sistêmicas ou congênitas identificadas durante o momento da anamnese;
- Fazendo uso de quaisquer medicamentos;
- Crianças cujos pais ou responsáveis legais se recusaram a assinar o termo de consentimento informado.
- Crianças com comportamento agitado, que choraram durante a coleta de saliva.

#### 4.1.6. Entrada do voluntário no estudo

Para a entrada do voluntário no estudo, foi imprescindível a presença de um dos pais ou responsável legal pela criança para que fosse esclarecido em detalhes a natureza e os objetivos do estudo do qual fosse obtido o consentimento informado por escrito (Apêndice A). Para o responsável pela criança que soubesse ler e escrever, foi solicitado assinatura do termo de consentimento. Para aqueles que não sabiam ler, foi feita leitura verbal do termo de consentimento para solicitação de impressão digital, com subsequente assinatura

de uma testemunha. Houve liberdade para a retirada da criança do estudo a qualquer momento. Não houve ressarcimento em espécie para os pais, responsáveis ou crianças. Foi dado para a criança o direito de ter, livre de custos, tratamento odontológico completo e acompanhamento até o término da pesquisa (Figura 6).

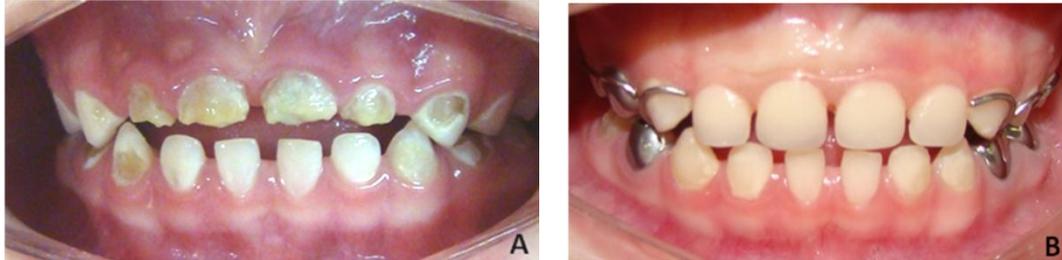


Figura 6: Tratamento odontológico realizado em um dos participantes do estudo.

Nota: A) Situação clínica encontrada durante a coleta de saliva; B) Resultado clínico após tratamento.

Fonte: O autor.

Após devida assinatura do termo de consentimento informado, os voluntários foram submetidos a uma anamnese para obtenção de informações concernentes ao seu estado geral de saúde (Apêndice B).

#### 4.1.7. Exame dentário

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

1. Situação dos tecidos moles intra-orais;
2. Dentes presentes na cavidade oral: decíduos e permanentes;
3. Dentes decíduos presentes na cavidade já com mobilidade fisiológica;
4. Número de dentes:
  - Cariados (cavitados e não cavitados)
  - Restaurados
  - Extraídos devido à cárie
5. Número de superfícies:
  - Cariadas (cavitadas e não cavitadas)
  - Ausentes (devido à cárie)
  - Restauradas

#### 4.1.8. Coleta de saliva

A coleta de saliva (Figura 7) foi realizada na Clínica de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. Após conclusão do exame dentário, duas amostras de saliva foram coletadas de cada participante, entre 8 e 11 horas da manhã para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de três horas de jejum. Foi requerido por parte dos pais que os procedimentos rotineiros de higienização da cavidade oral fossem realizados uma hora antes da coleta. A primeira amostra constituiu-se de saliva não estimulada, ou seja, a criança permaneceu em repouso no colo da mãe por um período de 30 minutos e, logo após, a saliva foi coletada fazendo-se uso de uma pipeta plástica (Figura 8). Uma segunda amostra foi coletada com estímulo. A criança teve que mascar um pedaço de parafina Parafilm “M”<sup>®</sup> Laboratory Film (American National Can, Greenwich, CT) (Figura 8) presa a um pedaço longo de fio dental para evitar a deglutição do material (Figura 8). A mastigação desse material teve por objetivo deslocar os *Streptococcus mutans* dos dentes (JORDAN *et al.*, 1987). Após o período de 60 (sessenta) segundos, o Parafilm “M”<sup>®</sup> Laboratory Film (American National Can, Greenwich, CT) foi retirado da boca da criança, descartado, e a saliva coletada durante o primeiro minuto foi colocada em tubos Eppendorfs<sup>®</sup> (Figura 8) para posterior análise, conforme descrito por Dawes, 1987.



Figura 7: Coleta de saliva realizada na clínica de Odontopediatria da UFC.  
Fonte: O autor



Figura 8: Acessórios utilizados durante a coleta de saliva

Nota: A) pedaço de parafina Parafilm “M”<sup>®</sup> Laboratory Film (American National Can, Greenwich, CT) presa a um pedaço longo de fio dental; B) Tubo Eppendorf<sup>®</sup> e pipeta plástica

Fonte: O autor.



Figura 9: Procedimentos realizados antes da liofilização.

Nota: A) Amostras de saliva colocadas na centrífuga; B) Retirada do sobrenadante com auxílio de micropipeta.

Fonte: O autor.

## 4.2. Protocolo analítico

### 4.2.1. Transporte e armazenagem da saliva

As amostras de saliva foram transportadas em tubos Eppendorfs<sup>®</sup>, sob gelo. Para análise do perfil de peptídeos salivares, foram utilizadas amostras de saliva não estimuladas. Tendo sido centrifugadas (centrífuga Janetzki) a 3000 rpm por 5 minutos a 32°C, sendo retirado 100µL do sobrenadante, que foi liofilizado e armazenado a -20°C até análise (Figura 9).

As amostras de saliva estimuladas foram utilizadas para a análise microbiológica. Esse processamento ocorreu no mesmo dia, no Laboratório de Anaeróbios do Departamento

de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), até no máximo 2 horas após a coleta (RUOFF; WHILEY; BEIGHTON, 2003).

#### 4.2.2. Análise microbiológica

O meio de cultura utilizado para a contagem de EGM foi o ágar mitis salivarius bacitracina (MSB) (Difco, Detroit, Michigan, USA), suplementado com telurito de potássio (Vetec Química fina LTDA, Rio de Janeiro) a 1%, bacitracina (Sigma) a 1% e sacarose (Merck) a 15%. 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; JORDAN; VAN HOUTE, 1973).

#### 4.2.3. Preparo do meio de cultura

Para o preparo do meio MSB, foram utilizados 15g de sacarose, 9g de meio base mitis salivarius e 100mL de água destilada. Esses produtos foram misturados em Erlenmeyer, que posteriormente foi levado ao autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a retirada do frasco de Erlenmeyer do autoclave, esperou-se a temperatura da mistura sofrer uma redução até atingir aproximadamente 45°C, sendo acrescentado, nesse momento, 1mL da solução de telurito de potássio a 1% e 1mL da solução de bacitracina a 1%.

Empregaram-se pipetas estéreis para a separação do meio nas placas de Petri, sendo colocado 10mL do meio em cada placa.

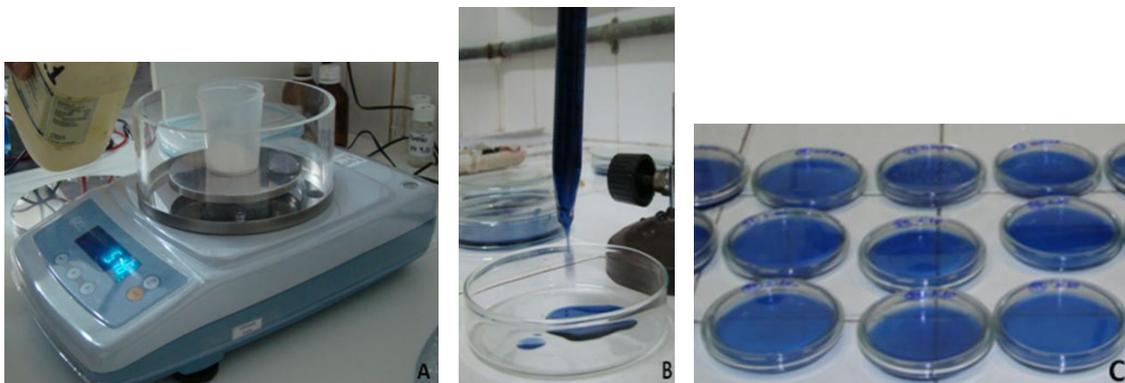


Figura 10: Procedimentos feitos durante a preparação do meio de cultura.

Nota: A) Sacarose sendo pesada na balança; B) Meio sendo espalhado nas placas por meio de pipeta; C) Meio dividido entre algumas placas.

Fonte: O autor.

#### 4.2.4. Preparo da solução salina

Foram utilizados 0,9g de cloreto de sódio e 100mL de água destilada para o preparo da solução salina a 0,9%. A homogeneização dos componentes resultou em uma solução, que foi levada ao autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução salina estéril foi armazenada em tubos de hemólise (0,9mL em cada tubo).

#### 4.2.5. Processamento das amostras

A fim de ser analisada microbiologicamente, a saliva foi diluída para possibilitar a contagem dos *Streptococcus mutans* (Figura 11), sendo utilizadas nesse estudo as diluições 1:100 e 1:1000. Dessa forma, 0,1mL de saliva estimulada de cada tubo Eppendorf® foi transferida assepticamente para o tubo de hemólise contendo 0,9mL de solução salina estéril. A saliva e a solução salina foram misturadas, constituindo uma solução (diluição 1:10). Logo em seguida, retirou-se 0,1mL do tubo de hemólise de concentração 1:10, colocando-se em outro tubo de hemólise de 0,9mL de solução salina, tendo resultado em uma concentração de 1:100. Repetiu-se o processo de diluição para a obtenção da diluição 1:1000. Um volume de 0,1mL de cada diluição utilizada foi cultivado em duplicata no meio MSB, sendo espalhado com a utilização de alça Drigalski previamente flambada. As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica (Biomatic) a 37°C em ambiente de microaerofilia (jarra com vela) por 48 horas. Após esse período, as placas foram submetidas à leitura para a contagem das colônias de *S.mutans* (WESTERGRENN; KRASSE, 1978).

A leitura foi feita por observação visual através da contagem manual na placa de Petri e transformada em UFC/mL de saliva, multiplicando-se o número de colônias encontradas pela respectiva diluição, sendo anotados os valores encontrados em cada placa semeada (Figura 12).

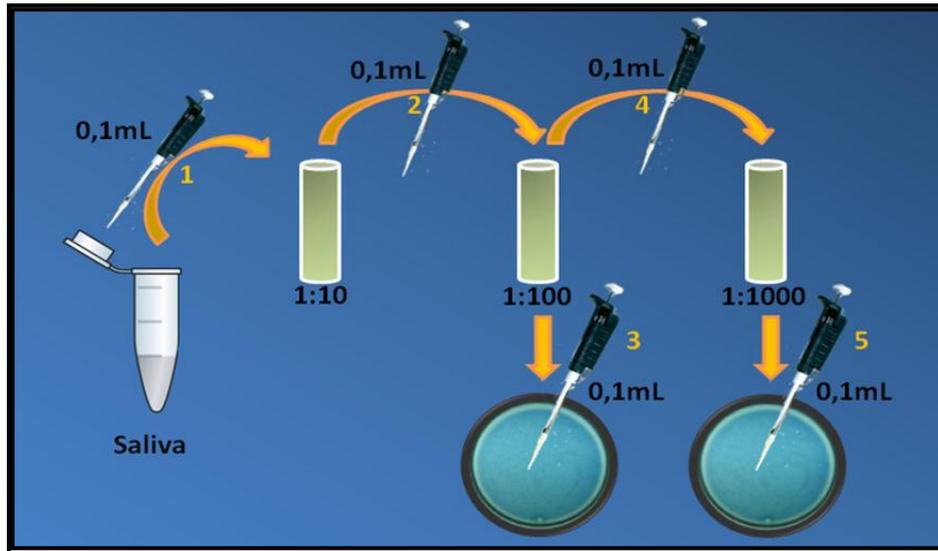


Figura 11: Desenho esquemático dos procedimentos de diluição.

Nota: 1) 0,1mL de saliva é colocada em tubo de hemólise contendo 0,9mL de solução salina, formando a diluição 1:10; 2) 0,1mL da solução de 1:10 é colocada em outro tubo de hemólise, formando a diluição de 1:100; 3) 0,1 mL da solução com diluição de 1:100 é colocada na placa e Petri; 4) 0,1mL da solução de 1:100 é colocada em um terceiro tubo de hemólise, formando a diluição de 1:1000; 5) 0,1mL da solução com diluição de 1:1000 é colocada em uma segunda placa de Petri.

Fonte: O autor.



Figura 12: Placa de Petri semeada, podendo-se visualizar colônias de *Streptococcus mutans*.

Fonte: O autor.

Os EGM apresentam características peculiares em meio de culturas ricos em sacarose. Eles são distinguidos das demais espécies bacterianas por apresentarem colônias com características morfológicas ovaladas, de cor azul, medindo aproximadamente 0,5 a 0,75 $\mu$ m de diâmetro, apresentando bordas irregulares, fortemente aderidas ao meio e, quando observados ao microscópio, são vistos agrupados aos pares ou em cadeia (KONEMAN *et al.*, 2001)

#### 4.2.6. Testes bioquímicos

A série bioquímica para caracterização de espécies de *Streptococcus mutans* utilizou o meio tioglicolato de sódio (Difco), suplementado por carboidratos (manitol) para fermentação e ágar esculina para hidrólise (RUOFF; WHILEY; BEIGHTON, 2003). Esses meios são utilizados como prova bioquímica na identificação das bactérias Gram-positivas.

Retirou-se uma colônia com uma alça bacteriológica previamente flambada e inoculou-se em um tubo de hemólise contendo manitol sólido. O procedimento foi repetido colocando-se outra colônia em um tubo de hemólise contendo esculina. Os tubos foram levados à estufa a 37°C. Após 72 horas de incubação, foi feita a análise do teste, sendo considerado positivo quando ocorreu mudança de cor do manitol de roxo para amarelo, e da esculina, de cinza para preto (MURRAY *et al.*, 2003).

### 4.3. Análise dos peptídeos

#### 4.3.1. Preparo da amostra

Os procedimentos preliminares concernentes à saliva realizados após a centrifugação e obtenção do sobrenadante foram realizados no laboratório de Neurofarmacologia do departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará.

Em cada tubo Eppendorf® contendo saliva não estimulada liofilizada, foram acrescentados 300µL de água bidestilada para ressuspensão do material. A solução foi homogeneizada com auxílio de um agitador Vortex (Fischer Scientific, EUA). Posteriormente a amostra contida em cada tubo foi dividida em três partes. Cem microlitros de cada amostra permaneceram no tubo Eppendorf® para que fossem analisadas individualmente. Das amostras dos voluntários com experiência de cárie, os 200µL restantes foram misturados em um béquer para constituir o pool de pacientes com cárie (PCC). Da mesma forma, os 200µL restantes das amostras dos pacientes livres de cárie foram misturados para compor o pool de pacientes sem cárie (PSC). O conteúdo de cada béquer foi separado em 2 béqueres. Tendo-se obtido, ao final, 4 amostras de pools contidas em 4 béqueres.

Todo o material composto pelo pool de pacientes com cárie (2 béqueres), pool de pacientes sem cárie (2 béqueres) e 106 amostras individuais de pacientes foram novamente liofilizadas. Após a liofilização, o conteúdo de 2 béqueres (1 com PCC e o outro com PSC)

foi dividido em 10 tubos Eppendorfs<sup>®</sup>, cada qual contendo 2mg do conteúdo de pool liofilizado, sendo que 5 tubos continham PCC e 5 tubos estavam com PSC (Figura 13). Todo o material dos pools e das 106 amostras individuais (1 béquer com PCC, 1 béquer com PSC, 5 Eppendorfs<sup>®</sup> com PCC, 5 Eppendorfs<sup>®</sup> com PSC e 106 Eppendorfs<sup>®</sup> com amostras individuais) foram armazenadas em freezer a -20°C.

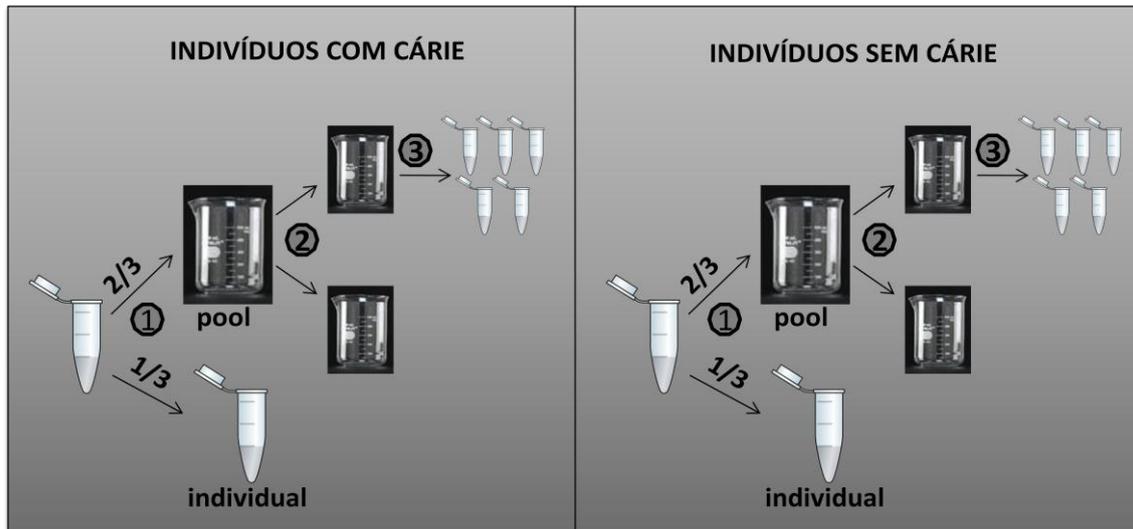


Figura 13: Separação das amostras de saliva.

Nota: 1) A saliva contida em cada Eppendorf<sup>®</sup> foi dividida, sendo que 1/3 permaneceu no tubo para análise e 2/3 foram colocados em um béquer; 2) O conteúdo de 1 béquer foi dividido em dois, sendo 1 armazenado e o outro utilizado; 3) O béquer utilizado teve seu conteúdo dividido em 5 Eppendorfs<sup>®</sup>.

Fonte: O autor.

#### 4.3.2. Processamento das amostras em LC/MS

A análise dos peptídeos foi realizada no departamento de Química e Biologia Química da Indiana University Purdue University Indianapolis (IUPUI).

O conteúdo de saliva liofilizada dos tubos Eppendorfs<sup>®</sup> (106 de amostras individuais, 5 de PCC e 5 de PSC) foram ressuspensos. Sendo acrescentados 50µL de solução de água bidestilada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em cada amostra individual e 100µL da mesma solução em cada pool, por ser este último um material mais concentrado. Por meio de agitador Vortex (Fischer Scientific), as amostras ressuspensas foram homogêneas e colocadas em frascos certificados para LC/MS (Figura 14).

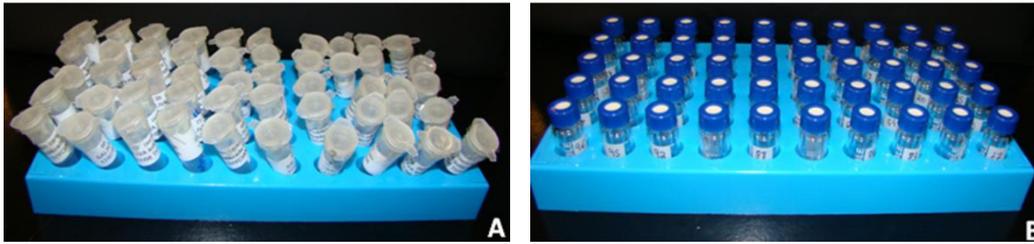


Figura 14: Amostras de saliva antes e depois da ressuspensão.

Nota: A) Amostras de saliva liofilizadas em tubos Eppendorfs®; B) Amostras de saliva após ressuspensão colocadas em frascos certificados para LC/MS.

Fonte: O autor.

Um aparelho de cromatografia líquida de alta pressão acoplado ao espectrômetro de massa (LC/MS) foi utilizado por ser considerado um método de escolha para a caracterização quantitativa de complexas misturas de proteína (LINSCHIED *et al.*, 2009).

O sistema LC/MS era da Agilent Technologies (Agilent 1100 Series LC/MSD; Santa Clara, CA, EUA) com software LC/MSD ChemStation (Figura 15). Foi aplicado um fluxo de 0,6mL/min compatível com a coluna C18 usada (2,1 x 50mm; 3,5µm; Bridge, Irlanda) e com a fonte de elétrons (electrospray) do espectrômetro de massa. A eluição ocorreu com o gradiente do eluente A (água bidestilada – 0,1% de TFA) para o eluente B (acetonitrila – 0,1% de TFA). O gradiente otimizado para a separação foi: 0 - 0,5 minutos, 100%A; 0,5 – 10minutos, 60%B.



Figura 15: Sistema LC/MS utilizado.

Fonte: O autor.

O espectrômetro de massa foi operado no modo íon positivo com voltagem do capilar 4KV, voltagem do cone 180V, temperatura da fonte 350°C, pressão do nebulizador 60PSI. O espectro de massa foi obtido na unidade  $m/z$  (massa por carga), podendo ser identificados compostos de até 3000  $m/z$  ou simplesmente 3000Da (MANN, MENG; FENN, 1989). Para cada corrida, 10µL da amostra foram injetadas pelo LC/MS.

#### 4.3.3. Identificação dos peptídeos

As massas dos peptídeos foram determinadas através da deconvolução do espectro de massa médio, automaticamente realizado pelo software do equipamento (LC/MSD ChemStation). Foi realizada uma busca na literatura dos peptídeos previamente identificados em saliva, sendo a massa desses peptídeos verificada nos bancos de dados: Swiss-Prot (<http://www.expasy.org>), EMBL (<http://www.emblheidelberg.de>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Como o sistema utilizado identificava peptídeos com massa de até 3000Da, os peptídeos de baixo peso molecular que tinham massa entre 3000 e 5000Da foram pesquisados por meio da massa de seus íons modificados, sendo aplicada a massa original em um algoritmo para obtenção da massa do íon modificado (MANN, MENG, FENN, 1989).

Posteriormente foi feita uma busca das massas por meio do software nos cromatogramas obtidos dos pools. Também foram analisadas as diferenças que havia em relação aos picos obtidos nos cromatogramas entre os pools com cárie e sem cárie, e se essas diferenças se repetiam nos cromatogramas das amostras individuais.

#### 4.4. Análise estatística

Com o intuito de reduzir as grandes assimetrias observadas nas contagens de EGM, logaritmo natural (Ln) desta variável foi utilizado nas análises estatísticas. Para avaliar a contribuição simultânea das variáveis: presença/ausência de cada peptídeo, níveis de EGM, idade e sexo, na experiência de cárie utilizou-se um modelo de regressão logística binária. Neste modelo experiência de cárie foi considerada como a variável dependente, enquanto as demais variáveis, Ln de EGM, idade, sexo, presença/ausência de cada peptídeo foram consideradas como variáveis independentes. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Teste t (Student) foi utilizado para todas as comparações bivariadas e para a construção de gráfico box-and-whisker plot para relacionar presença/ausência de peptídeo HNP e presença/ausência de cárie com idade das crianças.

## 5. RESULTADOS

Cento e seis crianças foram examinadas e tiveram a saliva coletada para as duas análises (microbiológica e bioquímica), no entanto as amostras de saliva de 10 dessas crianças não puderam ser analisadas microbiologicamente. Uma vez que a saliva a ser cultivada para contagem de EGM não podia ser armazenada por mais de 4 horas, essas amostras de saliva que iriam para o laboratório de Microbiologia foram descartadas. Para a análise dos peptídeos por meio do LC/MS, as salivas puderam ser centrifugadas, liofilizadas e armazenadas em freezer, de forma que todas as 106 amostras de saliva foram processadas em LC/MS. Nas análises em que foram utilizados EGM, considerou-se  $n=96$ . Uma avaliação dos questionários sobre estado de saúde geral da criança revelou que nenhuma criança estava sob tratamento médico, tomando quaisquer tipos de medicamentos, nem possuíam quaisquer tipos de doenças crônicas ou alergias.

Sete crianças (14,58%) só apresentaram cárie em dentes anteriores, 24 (50%) exibiram cárie em dentes posteriores e 17 (35,42%) em dentes anteriores e posteriores concomitantemente. Duas crianças (4,17%) apresentaram lesões de manchas brancas, sendo que uma (2,08%) só mostrou lesão de mancha branca, não exibindo cavitação. As lesões de mancha branca localizaram-se nos dentes incisivos. Nas crianças que tinham cárie apenas nos dentes posteriores, 9 só apresentaram lesão no 1º molar decíduo, 8 no 2º molar decíduo e 7 tinham cárie nos dois molares. O dente mais afetado foi o 1º molar inferior decíduo (37 dentes), seguido pelo 2º molar inferior decíduo (30 dentes). No arco superior, os 1ºs molares decíduos foram os dentes mais acometidos (28 dentes), enquanto incisivos centrais superiores foram os dentes anteriores mais afetados (26 dentes), seguido dos incisivos laterais (23 dentes) e 2ºs molares superiores decíduos (20 dentes). Foi observado um total de 12 incisivos centrais inferiores, 10 incisivos laterais inferiores e 8 caninos inferiores sendo acometidos por lesões de cárie. O canino superior foi o dente menos afetado, apresentando 7 dentes com lesões de cárie.

De acordo com o índice de cárie proposto pela AAPD (2008), o ceo-d e o ceo-s nas crianças com cárie variaram de 1 – 16 e 1 – 52, respectivamente. Ver tabelas 1 e 2 para dados de ceo-s, ceo-d, sexo, idade e Logaritmo Natural (Ln) de EGM de todas as crianças participantes do estudo.

Tabela 1: Distribuição das crianças com cárie (ceo-d, ceo-s e CPI-s) por idade, sexo e contagem de EGM, segundo a AAPD.

| <b>Nº DE IDENTIFICAÇÃO</b> | <b>IDADE (meses)</b> | <b>SEXO</b> | <b>ceo-d</b> | <b>ceo-s</b> | <b>CONTAGEM DE EGM (Ln)</b> |
|----------------------------|----------------------|-------------|--------------|--------------|-----------------------------|
| 1                          | 48                   | M           | 5            | 5            | 7,18                        |
| 3                          | 66                   | M           | 2            | 2            | 14,91                       |
| 4                          | 28                   | F           | 1            | 1            | 4,81                        |
| 14                         | 32                   | F           | 1            | 1            | 14,91                       |
| 16                         | 53                   | F           | 1            | 1            | 9,44                        |
| 21                         | 54                   | M           | 6            | 6            | 8,73                        |
| 26                         | 38                   | M           | 11           | 19           | 5,86                        |
| 32                         | 43                   | F           | 5            | 5            | 13,06                       |
| 33                         | 25                   | F           | 3            | 2            | 10,62                       |
| 41                         | 61                   | F           | 1            | 1            | 8,02                        |
| 43                         | 43                   | M           | 8            | 19           | 5,91                        |
| 56                         | 50                   | M           | 1            | 5            | 11,29                       |
| 57                         | 44                   | F           | 4            | 4            | 9,37                        |
| 60                         | 28                   | M           | 2            | 2            | 11,21                       |
| 64                         | 47                   | F           | 1            | 1            | 5,86                        |
| 65                         | 57                   | F           | 1            | 5            | 6,46                        |
| 66                         | 71                   | M           | 5            | 6            | 12,91                       |
| 69                         | 48                   | F           | 5            | 6            | 11,89                       |
| 70                         | 67                   | F           | 6            | 6            | 13,47                       |
| 71                         | 31                   | M           | 2            | 2            | 13,83                       |
| 76                         | 61                   | M           | 7            | 8            | 12,41                       |
| 82                         | 71                   | M           | 10           | 18           | 10,03                       |
| 85                         | 24                   | M           | 10           | 37           | 8,01                        |
| 86                         | 17                   | M           | 4            | 4            | 9,02                        |
| 88                         | 71                   | M           | 2            | 2            | 6,91                        |
| 89                         | 46                   | F           | 3            | 7            | 10,58                       |
| 91                         | 59                   | M           | 1            | 1            | 8,80                        |
| 94                         | 35                   | M           | 1            | 1            | 11,47                       |
| 98                         | 24                   | M           | 8            | 13           | 12,44                       |
| 102                        | 60                   | M           | 11           | 15           | 0,00                        |
| 103                        | 39                   | F           | 16           | 52           | 11,63                       |
| 105                        | 40                   | F           | 16           | 44           | 14,80                       |
| 106                        | 61                   | M           | 3            | 3            | 0,00                        |
| 107                        | 46                   | M           | 6            | 8            | 11,57                       |
| 108                        | 70                   | F           | 2            | 3            | 8,61                        |
| 110                        | 68                   | M           | 3            | 3            | 9,18                        |
| 113                        | 30                   | M           | 11           | 19           | 12,25                       |
| 114                        | 48                   | F           | 2            | 2            | 11,61                       |
| 115                        | 20                   | F           | 2            | 4            | 7,60                        |
| 116                        | 65                   | M           | 8            | 24           | 14,06                       |
| 117                        | 44                   | M           | 2            | 2            | 11,58                       |
| 119                        | 68                   | M           | 2            | 5            | 9,90                        |
| 122                        | 45                   | F           | 2            | 2            | 12,85                       |
| 124                        | 64                   | M           | 13           | 30           | 11,24                       |
| 125                        | 30                   | F           | 1            | 1            | 11,25                       |

Tabela 2: Distribuição das crianças sem cárie (ceo-d, ceo-s) por idade, sexo e contagem de EGM, segundo a AAPD.

| <b>Nº DE IDENTIFICAÇÃO</b> | <b>IDADE (meses)</b> | <b>SEXO</b> | <b>ceo-d</b> | <b>ceo-s</b> | <b>CONTAGEM DE EGM (Ln)</b> |
|----------------------------|----------------------|-------------|--------------|--------------|-----------------------------|
| 7                          | 60                   | F           | 0            | 0            | 6,10                        |
| 9                          | 43                   | M           | 0            | 0            | 5,56                        |
| 11                         | 66                   | M           | 0            | 0            | 9,31                        |
| 13                         | 36                   | M           | 0            | 0            | 6,88                        |
| 15                         | 44                   | F           | 0            | 0            | 4,26                        |
| 18                         | 69                   | M           | 0            | 0            | 14,91                       |
| 19                         | 52                   | F           | 0            | 0            | 10,33                       |
| 20                         | 22                   | M           | 0            | 0            | 6,41                        |
| 22                         | 60                   | M           | 0            | 0            | 9,70                        |
| 23                         | 34                   | M           | 0            | 0            | 7,79                        |
| 29                         | 39                   | M           | 0            | 0            | 7,83                        |
| 34                         | 41                   | F           | 0            | 0            | 14,91                       |
| 35                         | 46                   | F           | 0            | 0            | 5,95                        |
| 42                         | 59                   | F           | 0            | 0            | 8,97                        |
| 45                         | 46                   | F           | 0            | 0            | 9,80                        |
| 47                         | 62                   | F           | 0            | 0            | 14,91                       |
| 54                         | 69                   | M           | 0            | 0            | 9,29                        |
| 55                         | 45                   | M           | 0            | 0            | 8,21                        |
| 58                         | 27                   | M           | 0            | 0            | 10,44                       |
| 59                         | 62                   | M           | 0            | 0            | 11,01                       |
| 61                         | 26                   | M           | 0            | 0            | 11,21                       |
| 62                         | 71                   | F           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 63                         | 17                   | M           | 0            | 0            | 5,89                        |
| 67                         | 18                   | M           | 0            | 0            | 8,67                        |
| 68                         | 38                   | M           | 0            | 0            | 7,68                        |
| 73                         | 57                   | F           | 0            | 0            | 10,42                       |
| 74                         | 23                   | F           | 0            | 0            | 6,21                        |
| 75                         | 41                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 77                         | 58                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 78                         | 10                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 79                         | 42                   | F           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 80                         | 18                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 81                         | 19                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 83                         | 53                   | F           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 84                         | 34                   | M           | 0            | 0            | 8,62                        |
| 87                         | 36                   | F           | 0            | 0            | 7,72                        |
| 90                         | 43                   | F           | 0            | 0            | 5,52                        |
| 92                         | 29                   | M           | 0            | 0            | 10,97                       |
| 93                         | 47                   | F           | 0            | 0            | 11,74                       |
| 95                         | 42                   | F           | 0            | 0            | 9,88                        |
| 96                         | 42                   | F           | 0            | 0            | 11,92                       |
| 99                         | 36                   | F           | 0            | 0            | 12,48                       |
| 100                        | 50                   | M           | 0            | 0            | 5,11                        |
| 101                        | 27                   | M           | 0            | 0            | 11,21                       |
| 104                        | 63                   | F           | 0            | 0            | 7,31                        |
| 109                        | 27                   | M           | 0            | 0            | 9,59                        |
| 111                        | 43                   | M           | 0            | 0            | 12,41                       |
| 118                        | 50                   | M           | 0            | 0            | 0,00                        |
| 120                        | 47                   | F           | 0            | 0            | 12,14                       |
| 121                        | 27                   | M           | 0            | 0            | 12,38                       |
| 123                        | 47                   | M           | 0            | 0            | 11,60                       |

Quanto à severidade da cárie precoce da infância (CPI-s), das 48 crianças que tiveram experiência de cárie, 27 (56,25%) apresentaram cárie severa da primeira infância (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição da amostra de crianças com e sem cárie em função do gênero e da severidade da doença.

| SEXO         | SEVERIDADE |            | LIVRE DE CÁRIE | TOTAL      |
|--------------|------------|------------|----------------|------------|
|              | SEVERA     | NÃO SEVERA |                |            |
| MASCULINO    | 17         | 11         | 36             | <b>64</b>  |
| FEMININO     | 10         | 10         | 22             | <b>42</b>  |
| <b>TOTAL</b> | <b>27</b>  | <b>21</b>  | <b>58</b>      | <b>106</b> |

Foram detectados EGM na saliva da maioria das crianças (85 crianças; 88,54%). Das 51 crianças que não apresentaram lesões de cárie, 42 (82,35%) apresentaram contagem de EGM superior ou igual a 1 (Tabela 4). Os níveis salivares de EGM variaram desde não detectáveis a  $3 \times 10^6$  ufc/mL e, conforme vemos nas tabelas 4 e 5, foram agrupados em 3 categorias de contagem: 0, 1 a  $10^5$  e  $>10^5$ . Das crianças contaminadas, 34 (40%) apresentaram contaminação moderada (1 a  $10^5$ ) e 51 (60%) apresentaram altos níveis de contaminação ( $>10^5$ ) (JORDAN *et al.*, 1987).

Tabela 4: Distribuição de crianças (n = 96) segundo o número de superfícies cariadas, obturadas e perdidas devido à cárie, e os diferentes níveis de contaminação por EGM.

| CEO-s        | CONTAMINAÇÃO POR EGM |            |           | TOTAL     |
|--------------|----------------------|------------|-----------|-----------|
|              | 0                    | 1 a $10^5$ | $> 10^5$  |           |
| 0            | 9                    | 19         | 23        | <b>51</b> |
| 1 a 5        | 1                    | 11         | 16        | <b>28</b> |
| 6 a 10       | 0                    | 1          | 5         | <b>6</b>  |
| $> 10$       | 1                    | 3          | 7         | <b>11</b> |
| <b>TOTAL</b> | <b>11</b>            | <b>34</b>  | <b>51</b> | <b>96</b> |

Tabela 5: Distribuição dos níveis de contaminação por EGM em relação à idade.

| IDADE (meses) | CONTAMINAÇÃO POR EGM |                     |                   | TOTAL      |
|---------------|----------------------|---------------------|-------------------|------------|
|               | 0                    | 1 a 10 <sup>5</sup> | > 10 <sup>5</sup> |            |
| 10 a 21       | 3                    | 4                   | 0                 | 7          |
| 22 a 33       | 0                    | 4                   | 14                | 18         |
| 34 a 45       | 2                    | 12                  | 11                | 25         |
| 46 a 57       | 2                    | 6                   | 12                | 20         |
| 58 a 71       | 3                    | 8                   | 15                | 26         |
| <b>TOTAL</b>  | <b>10</b>            | <b>34</b>           | <b>52</b>         | <b>96</b>  |
| <b>%</b>      | <b>10,43</b>         | <b>35,41</b>        | <b>54,16</b>      | <b>100</b> |

Foram coletados dados sobre amamentação de 47 crianças (Tabela 6). Não foi possível a coleta desse dado de todas as 106 crianças porque este foi um dado coletado por telefone, 2 meses depois da coleta de saliva; sendo assim, muitos números de telefone e endereços haviam sido modificados, ou não foi possível entrar em contato com o responsável por algum outro motivo. Desses 47 pacientes, 46 (97,87%) foram amamentados no peito, tendo a duração dessa amamentação variado de 0 a 48 meses (média = 14,40, desvio padrão = 12,49). Em relação à escolaridade do responsável, a maioria dos pais tinha ensino médio completo (57,44%). Dois (4,25%) dos responsáveis não possuíam escolaridade.

Tabela 6: Distribuição dos pacientes com idade, ceo-s, contagem de EGM em relação ao tipo de amamentação, duração da amamentação e escolaridade do responsável.

| ID Pacientes | Idade (meses) | ceo-s | Contagem de EGM | Amamentação (peito) | Duração da amamentação (meses) | Escolaridade do responsável   |
|--------------|---------------|-------|-----------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 7*           | 60            | 0     | 450             | não                 | 0                              | Ensino médio completo         |
| 11           | 66            | 0     | 11100           | sim                 | 17                             | Ensino médio completo         |
| 13           | 36            | 0     | 975             | sim                 | 6                              | Ensino fundamental completo   |
| 15           | 44            | 0     | 71              | sim                 | 6                              | Ensino fundamental completo   |
| 18           | 69            | 0     | 3000000         | sim                 | 26                             | Ensino médio completo         |
| 19           | 52            | 0     | 30750           | sim                 | 21                             | Ensino médio completo         |
| 22           | 60            | 0     | 16318           | sim                 | 8                              | Ensino médio completo         |
| 55           | 45            | 0     | 3675            | sim                 | 3                              | Ensino fundamental completo   |
| 58           | 27            | 0     | 34250           | sim                 | 6                              | Ensino médio completo         |
| 59           | 62            | 0     | 60375           | sim                 | 6                              | não estudou                   |
| 61           | 26            | 0     | 74250           | sim                 | 6                              | Ensino médio completo         |
| 62           | 71            | 0     | 0               | sim                 | 2                              | Ensino fundamental completo   |
| 63           | 17            | 0     | 362             | sim                 | 3                              | Ensino médio completo         |
| 67           | 18            | 0     | 5837            | sim                 | 24                             | Ensino médio completo         |
| 68           | 38            | 0     | 2165            | sim                 | 36                             | Ensino fundamental incompleto |
| 73           | 57            | 0     | 33541           | sim                 | 15                             | Ensino fundamental incompleto |
| 77           | 58            | 0     | 0               | sim                 | 36                             | Ensino médio completo         |
| 78           | 10            | 0     | 0               | sim                 | 3                              | Superior completo             |
| 79           | 42            | 0     | 0               | sim                 | 8                              | Ensino fundamental incompleto |
| 80           | 18            | 0     | 0               | sim                 | 12                             | Superior incompleto           |
| 81           | 19            | 0     | 0               | sim                 | 28                             | Ensino médio completo         |
| 83           | 53            | 0     | 0               | sim                 | 3                              | Ensino médio completo         |
| 84           | 34            | 0     | 5541            | sim                 | 9                              | Ensino médio completo         |
| 87           | 36            | 0     | 2250            | sim                 | 31                             | Ensino fundamental incompleto |
| 90           | 43            | 0     | 250             | sim                 | 48                             | Ensino fundamental incompleto |
| 92           | 29            | 0     | 57916           | sim                 | 6                              | Ensino médio completo         |
| 93           | 47            | 0     | 125916          | sim                 | 4                              | Ensino médio completo         |
| 99           | 36            | 0     | 262016          | sim                 | 36                             | Superior completo             |
| 3            | 66            | 2     | 3000000         | sim                 | 30                             | Ensino médio completo         |
| 56           | 50            | 5     | 79800           | sim                 | 4                              | Ensino fundamental completo   |
| 57           | 44            | 4     | 11700           | sim                 | 24                             | Ensino médio completo         |
| 65           | 57            | 5     | 637             | sim                 | 8                              | Ensino médio completo         |
| 66           | 71            | 6     | 406600          | sim                 | 5                              | Superior completo             |
| 71           | 31            | 2     | 1019499         | sim                 | 3                              | Ensino médio incompleto       |
| 82           | 71            | 18    | 22791           | sim                 | 3                              | Ensino médio completo         |
| 85           | 24            | 37    | 3000            | sim                 | 9                              | Superior completo             |
| 88           | 71            | 2     | 1000            | sim                 | 31                             | Ensino médio completo         |
| 89           | 46            | 7     | 39250           | sim                 | 31                             | Ensino médio completo         |
| 91           | 59            | 1     | 6666            | sim                 | 9                              | Ensino fundamental completo   |
| 94           | 35            | 1     | 95458           | sim                 | 12                             | Ensino médio completo         |
| 102          | 60            | 15    | 0               | sim                 | 33                             | Superior completo             |
| 107          | 46            | 8     | 106000          | sim                 | 24                             | Ensino médio completo         |
| 110          | 68            | 3     | 9666            | sim                 | 6                              | Ensino médio completo         |
| 113          | 30            | 19    | 208250          | sim                 | 1                              | Ensino médio completo         |
| 114          | 48            | 2     | 110500          | sim                 | 5                              | Ensino médio completo         |
| 115          | 20            | 4     | 2000            | sim                 | 6                              | Ensino médio completo         |
| 116          | 65            | 24    | 1272000         | sim                 | 24                             | não estudou                   |

## 5.1. Avaliação dos peptídeos

Na identificação dos peptídeos, utilizaram-se os pools a fim de encontrar peptídeos que pudessem se apresentar de forma diferente nas salivas individuais de crianças com cárie e crianças sem cárie. As amostras de saliva foram separadas em dois diferentes pools, sendo o pool I representado por amostras de indivíduos com experiência de cárie (ICC) e o pool II, por amostras de crianças livres de cárie (ISC). Após processadas por meio do LC-MS, cromatogramas representativos foram obtidos desses dois grupos ilustrando as diferenças obtidas entre os perfis. (figuras 16 e 17).

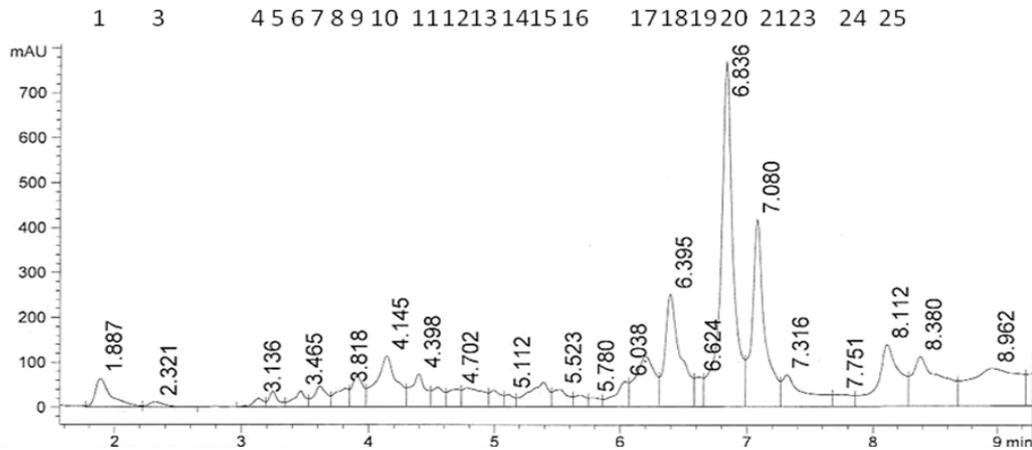


Figura 16: Cromatograma representativo do pool com cárie.

Fonte: O autor.

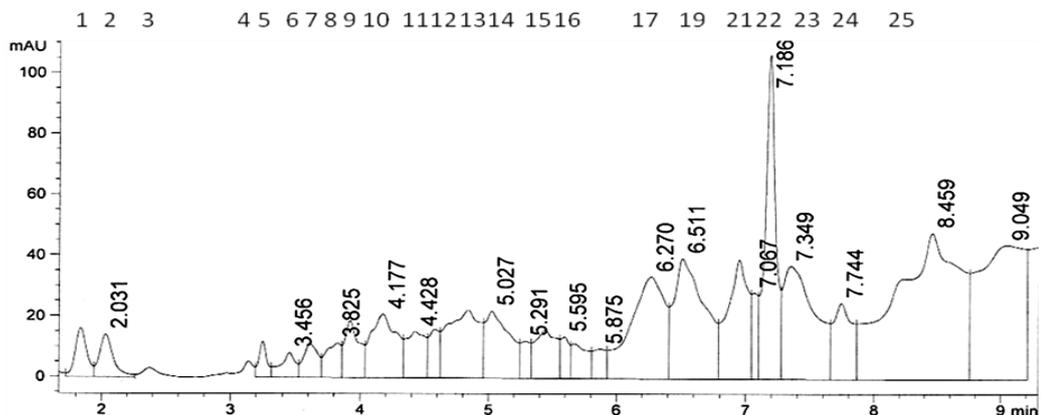


Figura 17: Cromatograma representativo do pool sem cárie.

Fonte: O autor.

Os picos 13, 14 e 17 foram mais abundantes em ISC. Os picos 2 e 22 encontraram-se presentes no pool sem cárie, mas virtualmente ausentes em ICC. Os picos 18 e 20 foram abundantes em ICC, porém ausente em ISC. Esses resultados sugeriram a existência de diferentes padrões de peptídeos nas crianças dependendo da experiência de cárie.

Levando-se em consideração peptídeos com massas já conhecidas na literatura, foi feita uma busca nos cromatogramas dos pools a fim de se encontrar peptídeos que apresentassem alguma diferença em relação à presença/ausência de experiência de cárie. Peptídeos com massa acima de 3000Da foram pesquisados nos cromatogramas com a massa de seus íons, obtida através do logaritmo apresentado por Mann, Meng e Fenn (1989). A partir dessa varredura baseada nas massas por meio do LC-MS, obteve-se uma lista com nove peptídeos (diferentes massas) que estavam presentes em um pool, mas ausentes em outro: IB-8b (1471m/z), estaterina (923 m/z e 924 m/z),  $\alpha$ -defensina 3 (íons 1744m/z e 1163m/z),  $\alpha$ -defensina HNP1-4 (íon 1722m/z), histatina 3 (íon 1017m/z),  $\beta$ -defensina 1 (íons 1134m/z e 1512m/z),  $\beta$ -defensina 2 (íons 2165m/z, 1444m/z e 1060m/z),  $\beta$ -defensina 3 (íons 2580m/z e 1291m/z) e catelicidina LL-37 (íons 1393m/z e 1499m/z). Baseando-se nos tempos em que essas massas se apresentaram nos pools, foram identificados os picos nos quais esses peptídeos, provavelmente, estariam presentes, a partir desta informação foram buscados nas salivas individuais.

Ao ser aplicado regressão logística do aumento ou da redução da probabilidade de se ter experiência de cárie frente às variáveis presença/ausência de cada peptídeo, idade, sexo e contagem de EGM (logaritmo natural da contagem de EGM), foi demonstrado que a presença do peptídeo  $\alpha$ -defensina 3, íon com massa 1744 m/z ( $p=0,0183$ ) reduz a chance de se ter experiência de cárie. Enquanto a presença do peptídeo PRP IB-4, com massa 1344 m/z ( $p = 0,0261$ ) aumenta a chance de se ter experiência de cárie. Esse modelo logístico binário demonstrou que idade ( $p=0,0785$ ), níveis de EGM ( $p=0,0704$ ) e sexo ( $p=0,5094$ ) não demonstraram influência significativa sobre a chance de se ter experiência de cárie (Tabela 7).

Tabela 7: Regressão logística da probabilidade de cárie considerando todas as variáveis.

| Variáveis                         | Coefficiente de regressão | Soma dos quadrados | Estatística Wald | Grau de liberdade | Significância | Exponencial (B)        |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------------|------------------------|
| Idade                             | 0,036                     | 0,021              | 3,096            | 1                 | 0,0785        | 1,037                  |
| EGM                               | 0,138                     | 0,076              | 3,274            | 1                 | 0,0704        | 1,148                  |
| Sexo                              | -0,388                    | 0,587              | 0,435            | 1                 | 0,5094        | 1,473                  |
| PRP IB-8B                         | 0,937                     | 1,421              | 0,435            | 1                 | 0,5095        | 0,392                  |
| PRP IB-4                          | 3,663                     | 1,647              | 4,946            | 1                 | 0,0261        | 0,026                  |
| Histatina 3                       | -0,563                    | 0,782              | 0,518            | 1                 | 0,4719        | 1,755                  |
| Estaterina (924)                  | 0,174                     | 0,720              | 0,058            | 1                 | 0,8095        | 0,841                  |
| Estaterina (925)                  | 21,685                    | 21433,076          | 0,000            | 1                 | 0,9992        | 0,000                  |
| $\alpha$ -defensina 3 (1744)      | -1,878                    | 0,796              | 5,569            | 1                 | 0,0183        | 6,542                  |
| $\alpha$ -defensina 3 (1163)      | 19,419                    | 20504,866          | 0,000            | 1                 | 0,9992        | 0,000                  |
| Histatina 3 (1017)                | -19,969                   | 21433,076          | 0,000            | 1                 | 0,9993        | 470487081,795          |
| $\alpha$ -defensina HNP1-4 (1722) | -0,342                    | 0,782              | 0,191            | 1                 | 0,6622        | 1,407                  |
| $\beta$ -defensina 3 (2580)       | -2,185                    | 1,250              | 3,058            | 1                 | 0,0803        | 8,893                  |
| $\beta$ -defensina 3 (1291)       | -23,097                   | 40193,043          | 0,000            | 1                 | 0,9995        | 10732689620,741        |
| $\beta$ -defensina 1 (1134)       | -21,429                   | 40192,948          | 0,000            | 1                 | 0,9996        | 2024540577,025         |
| $\beta$ -defensina 1 (1512)       | 1,254                     | 1,641              | 0,584            | 1                 | 0,4447        | 0,285                  |
| $\beta$ -defensina 2 (1060)       | -0,535                    | 0,556              | 0,928            | 1                 | 0,3354        | 1,708                  |
| $\beta$ -defensina 2 (2165)       | 22,760                    | 40193,043          | 0,000            | 1                 | 0,9995        | 0,000                  |
| $\beta$ -defensina 2 (1444)       | -39,658                   | 28998,259          | 0,000            | 1                 | 0,9989        | 167182993863528000,000 |
| Catelicidina LL37 (1393)          | 21,220                    | 40192,948          | 0,000            | 1                 | 0,9996        | 0,000                  |
| Catelicidina LL37 (1499)          | -0,114                    | 0,942              | 0,015            | 1                 | 0,9038        | 1,121                  |

A partir dos dados da tabela 7, foram utilizadas as variáveis com significância menor que 10%, que eram idade, contagem de EGM, sexo, PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) para aplicação de regressão logística entre esses parâmetros, obtendo-se a tabela 8.

Levando-se em consideração somente esses 6 parâmetros na regressão logística aplicada, foi observado que idade ( $p=0,020$ ) e contagem de EGM ( $p=0,036$ ) relacionavam-se com a presença de cárie, ao contrário do observado em relação a sexo ( $p=0,074$ ), que não estava relacionado com cárie. Em se tratando dos peptídeos, a presença de  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) reduziu a chance de se ter cárie ( $p=0,019$ ), como visto anteriormente. E, além disso, a presença da  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ), também, reduziu risco de cárie ( $p=0,034$ ). Em contrapartida, a presença do peptídeo PRP IB-4 aumentou a chance de se ter a doença ( $p=0,035$ ).

Tabela 8: Regressão logística da probabilidade de cárie considerando idade, EGM, sexo e os peptídeos PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 e  $\beta$ -defensina 3.

| Variáveis                    | Coefficiente de regressão | Soma dos quadrados | Estatística Wald | Grau de liberdade | Significância | Exponencial (B) |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------------|-----------------|
| Idade                        | 0,041                     | 0,018              | 5,388            | 1                 | 0,020         | 1,042           |
| EGM                          | 0,141                     | 0,067              | 4,381            | 1                 | 0,036         | 1,151           |
| Sexo                         | -0,074                    | 0,474              | 0,024            | 1                 | 0,877         | 1,076           |
| PRP IB-4                     | 2,731                     | 1,295              | 4,449            | 1                 | 0,035         | 0,065           |
| $\alpha$ -defensina 3 (1744) | -1,588                    | 0,677              | 5,499            | 1                 | 0,019         | 4,894           |
| $\beta$ -defensina 3 (2580)  | -2,451                    | 1,156              | 4,492            | 1                 | 0,034         | 11,600          |

Relacionando-se presença/ausência de cárie com presença/ausência dos peptídeos PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ), os quais tiveram significância estatística na regressão logística logo acima representada, foi obtida a tabela 9.

Tabela 9: Relação entre presença/ausência de cada peptídeo e presença/ausência de cárie de 106 crianças.

|                              | Peptídeos | Cárie      |            |       |
|------------------------------|-----------|------------|------------|-------|
|                              |           | Ausente    | Presente   | Total |
| PRP IB-4                     | Ausente   | 4 (6,8%)   | 3 (6,2%)   | 7     |
|                              | Presente  | 54 (93,2%) | 45 (93,8)  | 99    |
| $\alpha$ -defensina 3 (1744) | Ausente   | 39 (67,2%) | 42 (87,5%) | 81    |
|                              | Presente  | 19 (32,8%) | 6 (12,5%)  | 25    |
| $\beta$ -defensina 3 (2580)  | Ausente   | 4 (6,8%)   | 10 (20,8%) | 14    |
|                              | Presente  | 54 (93,2%) | 38 (79,2%) | 92    |

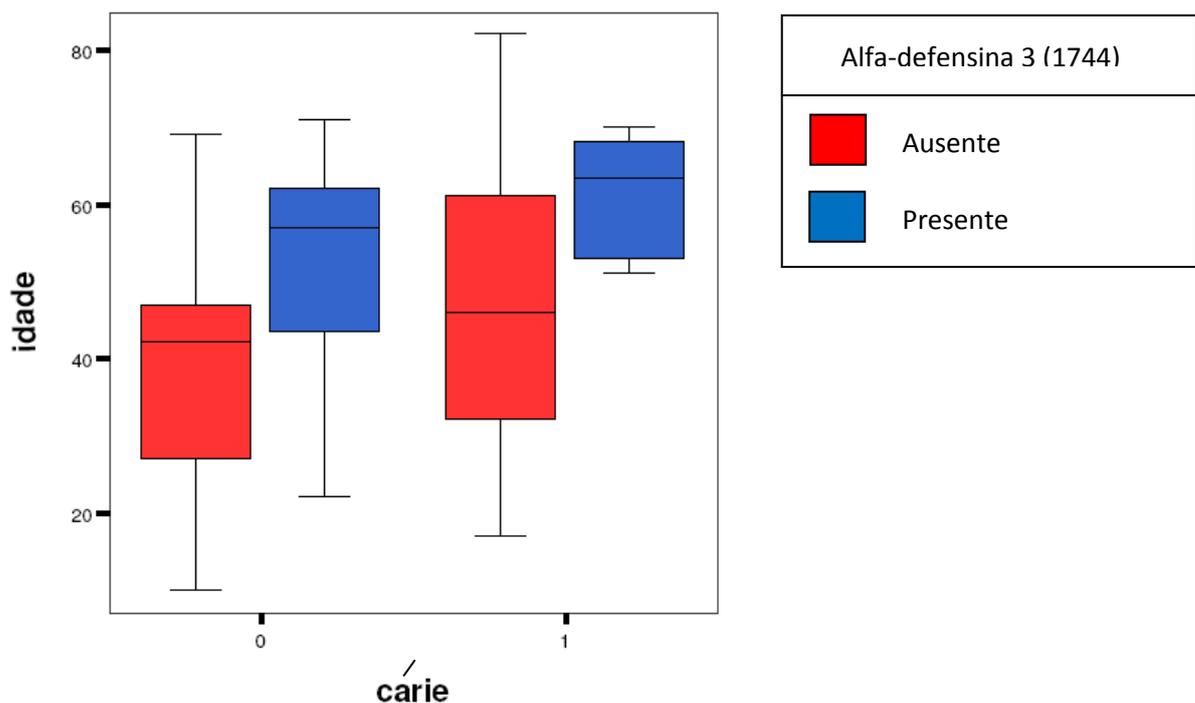
Cárie ausente (N=58); cárie presente (N=48)

Utilizando-se dados de ausência/presença de cárie e ausência/presença dos peptídeos  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ), pôde - se verificar que: (1) de 14 crianças que não apresentaram nenhum desses 2 peptídeos, apenas 10 tiveram experiência de cárie; (2) de 25 crianças que apresentaram esses 2 peptídeos, apenas 6 tiveram experiência de cárie; e (3) de 67 crianças que apresentaram a  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) e não apresentaram a  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ), praticamente a metade (35) não tiveram cárie e a outra metade (32) tiveram experiência de cárie (Tabela 10). Com esses dados, sugeriu-se que a  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) sozinha não influenciou a variável experiência de cárie. Mas a presença da  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) juntamente com a  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) protegeu os indivíduos em relação à cárie.

Tabela 10: Relação entre presença/ausência de cárie e presença/ausência dos peptídeos  $\alpha$ -defensina 3 (1744) e  $\beta$ -defensina 3 (2580).

| Cárie    |                              | $\beta$ -defensina 3 (2580) |          |       |    |
|----------|------------------------------|-----------------------------|----------|-------|----|
|          |                              | Ausente                     | Presente | Total |    |
| Ausente  | $\alpha$ -defensina 3 (1744) | Ausente                     | 4        | 35    | 39 |
|          |                              | Presente                    | 0        | 19    | 19 |
| Presente | $\alpha$ -defensina 3 (1744) | Ausente                     | 10       | 32    | 42 |
|          |                              | Presente                    | 0        | 6     | 6  |

Por meio do teste t (Student), foi construído o gráfico tipo box – and – whisker plot, sendo observado que a  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) está presente em indivíduos mais velhos (11 meses a mais do que os que não tem esses peptídeo), atuando como proteção à cárie nessas pessoas ( $p=0,147$ ) (Gráfico 1).



**Gráfico 1** – Representação gráfica da relação tridimensional entre idade, presença/ausência da  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e presença/ausência e cárie.

Cromatogramas representativos, obtidos por meio do espectrômetro de massa, da presença dos peptídeos PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ), que tiveram diferença significativa entre amostras de crianças com cárie e sem cárie, segundo a tabela 8, estão mostrados nas figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

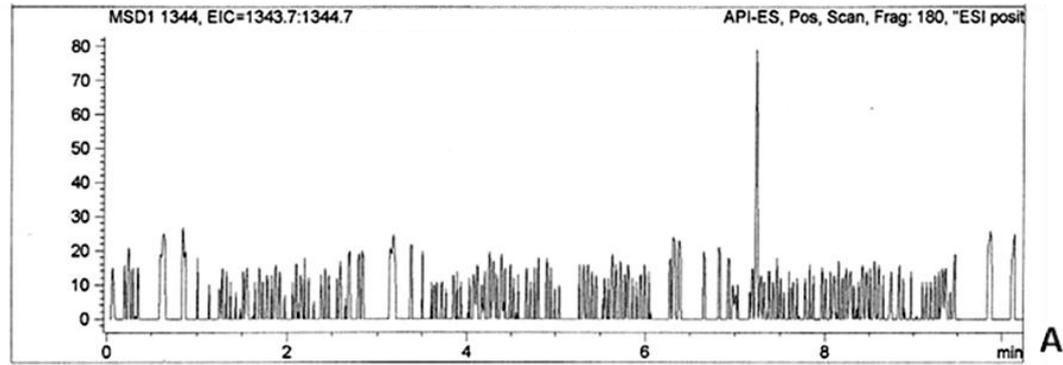


Figura 18: Identificação no MS. Peptídeos das proteínas ricas em prolina IB-4 (1343  $m/z$ ).

Fonte: O autor.

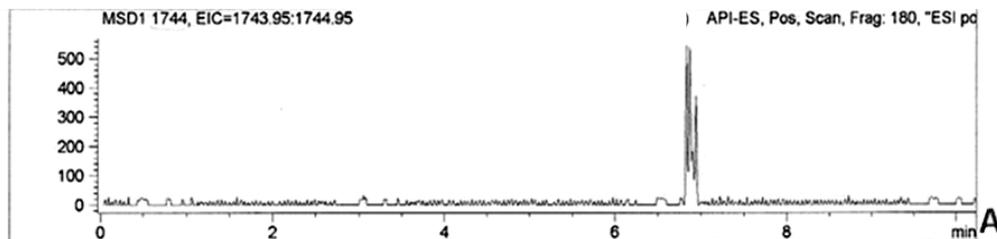


Figura 19: Identificação no MS. Peptídeos da alfa defensina 3 (íon 1744 $m/z$ ).

Fonte: O autor.

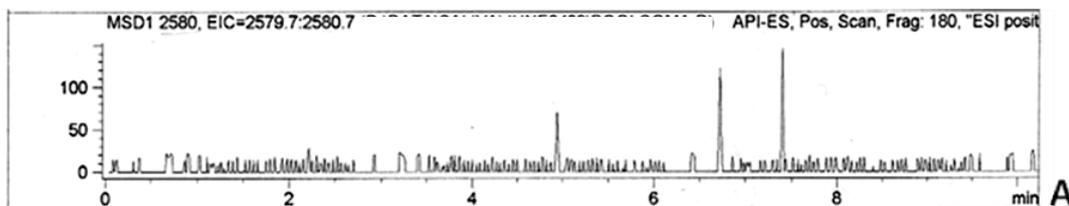


Figura 20: Identificação no MS. Peptídeos da beta defensina humana 3 (íon 2580 $m/z$ ).

Fonte: O autor.

Os peptídeos PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) surgiram nos picos correspondentes aos tempos 7,3 minutos, 6,8 minutos e 4,7 minutos, respectivamente. A figura 21 mostra um cromatograma representativo de uma criança com experiência de cárie, que possui o pico 7,3, no qual, provavelmente, se encontra o peptídeo PRP IB-4. Em seguida, é demonstrado um cromatograma de criança sem cárie que possui picos nos tempos correspondentes a 6,8 e 4,7 minutos, onde, possivelmente, encontram-se os peptídeos  $\alpha$ -defensina 3 (1744  $m/z$ ) e  $\beta$ -defensina 3 (2580  $m/z$ ) (Figura 22).

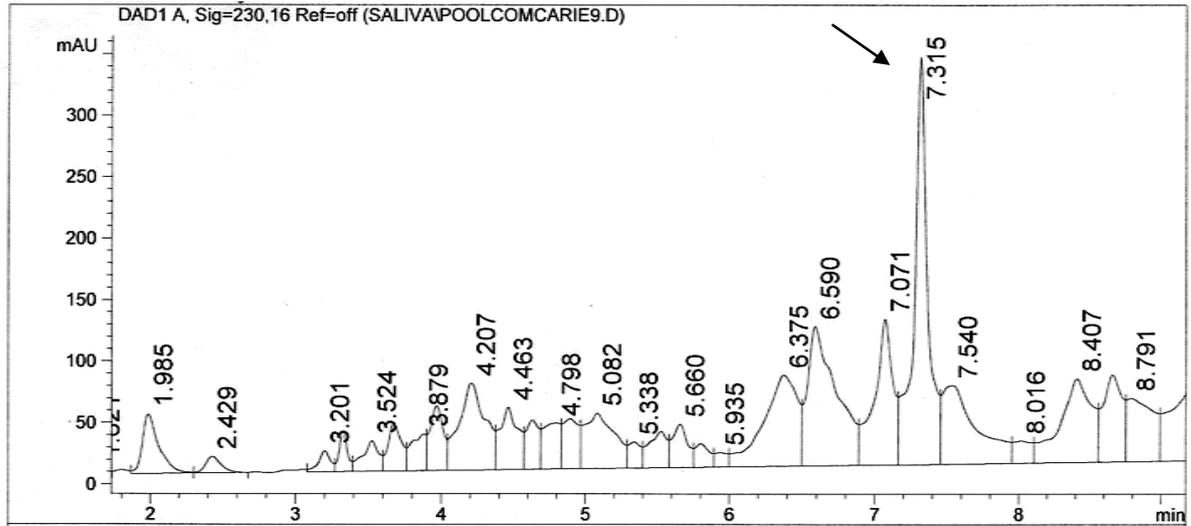


Figura 21: Cromatograma de criança com experiência de cárie, com destaque para o pico no tempo 7,3, no qual se encontram peptídeos da Proteína Rica em Prolina IB-4.

Fonte: O autor.

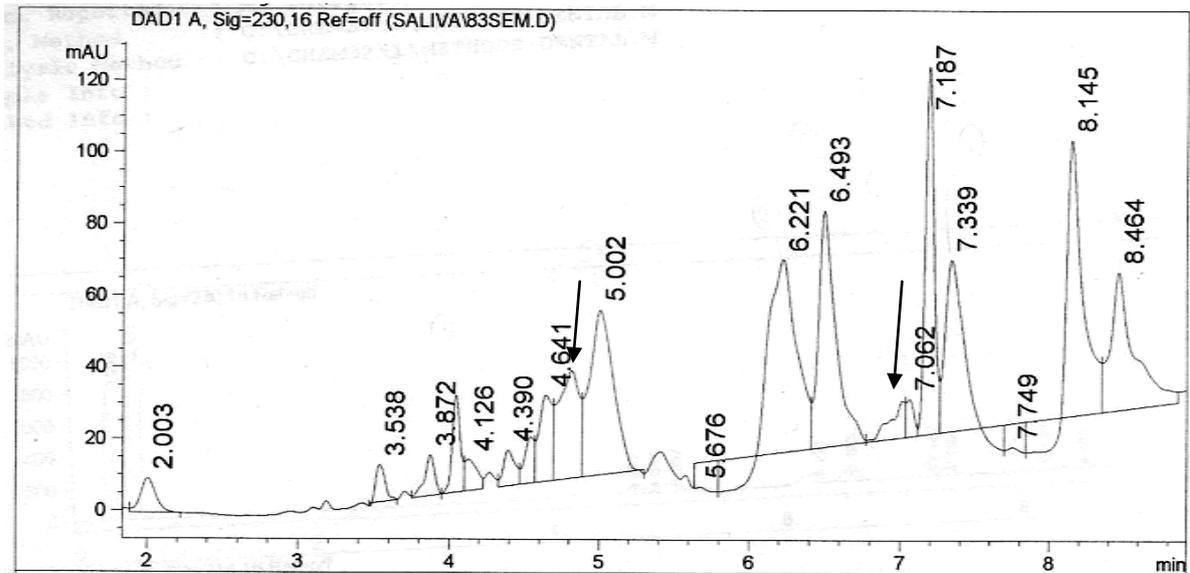


Figura 22: Cromatograma de criança sem experiência de cárie, com destaque para os picos nos tempos 4,7 e 6,8, no qual se encontram peptídeos da  $\beta$ -defensina 3 e  $\alpha$ -defensina 3, respectivamente.

Fonte: O autor.

## 6. DISCUSSÃO

Peptídeos de baixo peso molecular encontrados na saliva são formados a partir da atividade proteolítica ocorrida nesse meio (PERINPANAYAGAM *et al.*, 1995). As proteínas que dão origem aos peptídeos presentes em saliva total são derivadas principalmente de secreções das glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores. Todavia, uma pequena quantidade de proteínas presentes em saliva total origina-se de microorganismos orais, fluido crevicular, células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares e componentes da dieta (TENOVUO, 1989). Como os componentes salivares podem sofrer mudanças na presença de doenças orais como a cárie dentária (TENOVUO, 1989), no presente trabalho, buscou-se encontrar uma possível relação entre peptídeos salivares e a presença/ausência de experiência de cárie em crianças durante a primeira infância.

No presente estudo, o método utilizado para a caracterização dos peptídeos de baixo peso molecular foi o LC-MS por ser um dos métodos que têm emergido nessa área de identificação (LINSCHIED *et al.*, 2009). O equipamento usado identificou peptídeos com até 3000Da. Por esse motivo, os peptídeos que tinham massa entre 3000Da e 5000Da, para serem identificados, tiveram suas massas aplicadas em um algoritmo conforme sugerido por Mann, Meng e Fenn (1989) para obtenção das massas dos íons modificados (charges). Durante a identificação dos peptídeos, no presente trabalho, as diferenças encontradas nos cromatogramas em relação aos picos sugerem diferentes composições para cada indivíduo, dependendo da experiência de cárie, estando de acordo com Ayad *et al.* (2000).

Vários estudos procuraram analisar peptídeos em saliva (AYAD *et al.*, 2000, KOHYAMA; SHIMOMURA; SANADA, 1984, HUANG *et al.*, 2008, MATHEWS *et al.*, 1999, MIZUKAWA *et al.*, 1999a, MIZUKAWA *et al.*, 1999b, MURAKAMI *et al.*, 2002, PERINPANAYAGAM *et al.*, 1995, SAHASRABUDHE *et al.*, 2000, TAO *et al.*, 2005, VITORINO *et al.*, 2004, VITORINO *et al.*, 2005). Entretanto, poucos trabalhos relacionaram peptídeos salivares com cárie (AYAD *et al.*, 2000, TAO *et al.*, 2005, VITORINO *et al.*, 2005). Apenas 2 trabalhos relataram a participação de crianças nesses estudos (KOHYAMA; SHIMOMURA; SANADA, 1984, TAO *et al.*, 2005)

O primeiro estudo existente na literatura com fracionamento de peptídeos de baixo peso molecular em saliva de crianças com cárie foi realizado por Kohyama, Shimomura e Sanada (1984). Nesse estudo, obteve-se saliva total de 48 crianças de 3 a 9 anos de idade, com experiência de cárie. Utilizou-se o CSI durante o exame clínico. As amostras de saliva foram purificadas em colunas de Bio Gel P-6 e processadas em aparelho de HPLC. Foram

encontrados dois picos diferentes entre os grupos com alto CSI e baixo CSI. Esses picos tinham peso molecular entre 1500Da e 4000Da e encontravam-se em maior concentração nas crianças com alto CSI. A faixa etária do grupo de estudo em questão incluiu crianças que possuíam somente dentição decídua e crianças com dentição mista. Esse fato pode ter levado a problemas na análise da saliva, tendo em vista que ocorrem mudanças com a idade na composição da saliva de crianças saudáveis (BEN-ARYEH *et al.*, 1990). Nesse estudo, os peptídeos não foram caracterizados, sendo encontrado apenas o peso molecular dos picos, provavelmente por causa da limitação dos equipamentos disponíveis na época.

TAO *et al.* (2005) também desenvolveram trabalho com crianças, porém a idade dos participantes se encontrava entre 11 e 15 anos. Os autores procuraram determinar uma possível relação entre prevalência de cárie e concentrações salivares dos peptídeos hBD-3, catelicidina LL 37 e  $\alpha$ -defensina HNP1-3. Com este propósito, saliva total foi coletada de 149 crianças e analisada por meio de slot blot. Nos resultados, enquanto os níveis de LL-37 e hBD-3 não se correlacionaram com experiência de cárie, a média dos níveis de HNP1-3 foi significativamente maior nas crianças sem cárie do que nas crianças com cárie. Crianças com altos níveis de cárie não expressaram altas concentrações de SM, portanto, HNP1-3 não foi correlacionado com SM salivar.

Nenhum trabalho tinha sido realizado até o momento analisando perfil de peptídeos salivares exclusivamente durante a primeira infância, sendo o presente trabalho pioneiro nessa faixa etária. Anteriormente, foram executados trabalhos com crianças durante a primeira infância pelo nosso grupo de pesquisa, mas foram estudados aminoácidos em crianças saudáveis (FONTELES *et al.*, 2009), aminoácidos em crianças desnutridas (COSTA, 2008) e proteínas em crianças com desnutrição energético-protéica (MOTA, 2008). Dessa forma, nosso grupo foi pioneiro na exploração de proteínas, aminoácidos e peptídeos nessa faixa etária. Acredita-se ser este fato devido às grandes dificuldades encontradas durante o momento de coleta das amostras de saliva, já que essa coleta para a medição de parâmetros salivares requer uma padronização com o intuito de minimizar a interferência de processos fisiológicos inerentes (COSTA, 2008). A idade, também, é um fator importante no momento da coleta já que crianças podem ter um comportamento agitado neste momento, podendo inclusive chorar, o que torna a saliva desses indivíduos mais turva e com composição comprovadamente afetada (TENOVUO *et al.*, 1986). Algumas crianças tiveram de ser excluídas do presente trabalho como forma de controle deste viés.

Anteriormente, outros estudos buscaram pesquisar o perfil de peptídeos na saliva de adultos. Perinpanayagam *et al.* (1995) analisaram a saliva de parótida de um indivíduo de

25 anos de idade através de filtração por meio de colunas de Bio-Gel P-2, processamento por meio de HPLC e caracterização das seqüências de aminoácidos. Através das seqüências obtidas, concluiu-se que os PAs encontrados provavelmente são derivados da proteólise das proteínas ricas em prolina, histatinas e estaterinas. Os autores relataram também que como a saliva da parótida é um líquido que não possui microorganismos, muitos dos PAs fracionados desta secreção parecem ter-se derivado do processo proteolítico de grandes proteínas. Nesse estudo, não foi explorada a relação dos peptídeos com a cárie dentária.

Posteriormente, Mizukawa *et al.* (1999a) utilizaram saliva total para encontrar alguma relação de PAs com várias doenças orais em um estudo que verificou a presença do peptídeo antimicrobiano HNP-1 ( $\alpha$ -defensina 1) em 21 pacientes (22 a 82 anos de idade). A saliva foi coletada, isolada e purificada por meio de HPLC, o peso molecular do HNP-1 foi mensurado através do espectrômetro de massa, e a seqüência de aminoácidos foi determinada por um seqüenciador de proteínas. Os autores obtiveram como resultados que a concentração de HNP-1 na saliva de pacientes com líquen plano (n=5), leucoplasia (n=4), glossite associada com deficiência de ferro (n=4) foi  $8,3 \pm 4,3\mu\text{g/mL}$ ,  $13,2 \pm 7,9\mu\text{g/mL}$  e  $11,4 \pm 4,9\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Essas concentrações foram significativamente maiores que aquelas de sujeitos saudáveis ( $0,8\mu\text{g/mL}$ ). Em contraste, concentrações salivares de HNP-1 em pacientes com glossodínia (n=4) e desconforto oral (n=4) foram similares àquelas de indivíduos saudáveis. No mesmo ano, foi realizado trabalho semelhante por Mizukawa *et al.* (1999b), mas em 10 pacientes (28 – 84 anos de idade) com inflamação oral, no qual foi verificado que a concentração de HNP-1 era significativamente maior em pacientes com inflamação oral do que em voluntários saudáveis. Ainda foi encontrado nessa população uma forte correlação positiva entre a concentração de  $\alpha$ -defensina-1 salivar e a concentração da proteína C-reativa. No nosso estudo, foi encontrada  $\alpha$ -defensina HNP1-4 (mistura das  $\alpha$ -defensinas 1, 2, 3 e 4) no pool de pacientes com cárie, mas não houve significância estatística quando foram avaliadas as amostras de salivas individualmente.

Posteriormente, Matthews *et al.* (1999) analisaram a produção de peptídeo derivado da  $\beta$ -defensina por mucosa oral e glândulas salivares. Nesse estudo, foi caracterizada a expressão de RNAm de hBD-1 e hBD-2 nas glândulas salivares, na língua, gengiva e mucosa bucal, e foram detectados peptídeos de  $\beta$ -defensina em secreções salivares. A expressão de RNAm foi quantificada por ensaios de proteção RNase, sendo detectado RNAm de hBD-1 em gengiva, glândula parótida, mucosa bucal e língua. Western Blot, cromatografia líquida e espectrômetro de massa foram utilizados para identificar peptídeos de hBD-1 e hBD-2 em saliva humana. A expressão de hBD-1 foi constitutiva, enquanto a expressão de hBD-2 foi

induzida por IL-1 $\beta$  e LPS. Os autores não relataram relação com cárie. Ayad *et al.* (2000) buscaram uma associação dos PAs derivados das PRPs com experiência de cárie. Esse estudo foi realizado com 18 adultos (50 anos de idade ou mais), sendo 9 livres de cárie e 9 com cárie. No exame clínico, a cárie foi avaliada através de CPOS. Na análise dos peptídeos, foram utilizados imunoblotting, colunas de Bio-Gel P-2 e P-6 e analisador Aminoquant II. Identificaram-se 18 peptídeos que pareciam ser produtos de clivagem proteolítica das PRPs IB-4, IB-5, IB-7, IB-8b e P-B. Os peptídeos mais abundantes no grupo sem cárie diferiu daqueles isolados do grupo com cárie. O único peptídeo relacionado à cárie foi IB-7, encontrado em maior quantidade na saliva coletada de indivíduos sem cárie. Com os resultados, os autores puderam afirmar que o processo proteolítico de proteínas da saliva da parótida diferem entre indivíduos com e sem cárie.

No presente estudo, foi demonstrado que o peptídeo PRP IB-4 aumenta a chance de se ter experiência de cárie. Esses resultados contrastaram com o trabalho de Ayad *et al.* (2000), no qual, embora sem significância estatística, foram encontrados peptídeos das proteínas ricas em prolina IB-4 em pacientes livres de cárie. Essa diferença nos resultados pode ser justificada pelo pequeno tamanho das inúmeras proteínas ricas em prolina, que são mais fáceis de serem perdidas durante os passos do processamento como a diálise e a propensão dessas proteínas de sofrerem clivagem proteolítica pós-translacional. Além disso, existe o fato de que a amostra estudada no presente estudo é bem mais jovem (10 a 71 meses de idade) do que a amostra estudada por Ayad *et al.* (2000) (adultos de 20 anos ou mais). Em trabalho feito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (FONTELES *et al.*, 2009) com crianças na mesma faixa etária do presente estudo, que teve como objetivo identificar aminoácidos livres na saliva total de crianças com e sem cárie, relacionando-os à experiência de cárie e SM na saliva, foi concluído que presença de prolina livre e ausência de glicina livre estavam relacionadas ao aumento da experiência de cárie. Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, uma vez que a prolina é um aminoácido precursor dos peptídeos ricos em prolina. Em adição, as proteínas ricas em prolina são inibidores secundários da precipitação de fosfato de cálcio, inibindo o crescimento de cristais de fosfato de cálcio precipitado. Essa função resulta em um estado estável, mas supersaturado das secreções salivares, constituindo um meio ambiente protetor e reparador, importante para manter a integridade do dente (TENOVUO, 1989). Os nossos resultados, com o peptídeo IB-4 sendo relacionado com aumento da experiência de cárie, sugerem que peptídeos IB-4, precursores de PRPs em sua forma não ligada a outro peptídeo não exerce o papel protetor exercido por sua forma ligada, que é a proteína rica em prolina.

Posteriormente, Sahasrabudhe *et al.* (2000) delinearum um estudo para detectar a expressão e localização do peptídeo de hBD-1 em glândulas salivares e na saliva. Foram feitas biópsias de pacientes com mucocele (n=20), havendo a detecção desse peptídeo por imunohistoquímica e expressão localizada em células ductais, e não em células acinares nessas glândulas. O peptídeo estava localizado apicalmente próximo ao lúmen nas células do ducto. Análise de Western-Blot, também, detectou peptídeo de hBD-1 em saliva total, acidificada, não estimulada de voluntários sadios. Nesse estudo, os peptídeos não foram relacionados à cárie, como ocorreu no presente trabalho. Uma falha encontrada foi o fato de que não foi citada a idade dos pacientes, sendo informado apenas que eram adultos. Murakami *et al.* (2002), utilizando Western-blot, RT-PCR e imunohistoquímica, encontraram PAs de catelicidinas em glândulas salivares e saliva de ratos e seres humanos ao examinar a expressão de RNAm e proteínas em embriões de ratos de 17 dias de gestação, ratos recém-nascidos com 4 dias e 2 voluntários sadios humanos, cujas idades não foram citadas. No presente estudo, foram detectadas catelicidinas em saliva de crianças, mas não houve diferença na expressão destes peptídeos entre crianças com e sem experiência de cárie.

Mais recentemente, Vitorino *et al.* (2005) utilizaram uma população de 20 adultos com o objetivo de verificar possível correlação entre composição de peptídeos da saliva e cáries dentárias. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: com cárie e sem cárie, de acordo com os índices CPOD/CPOS. A análise foi feita utilizando-se HPLC-MS, extração sequencial com 6M de guanidina seguida por trifluoroacetato, e, da mesma forma que no presente trabalho, a identificação dos peptídeos foi baseada em pesos moleculares teóricos disponíveis em bancos de dados na Internet. Os autores tiveram como resultado uma forte correlação entre ausência de cárie e grandes quantidades de PRP 1-3, histatina 1 e estaterina; mostrando, dessa forma, a importância desses peptídeos na manutenção da integridade do dente. Nesse estudo, não foi feita contagem de EGM. Embora a metodologia utilizada por esses autores assemelhe-se aos procedimentos metodológicos da presente pesquisa, os peptídeos detectados e relacionados à experiência de cárie no estudo de Vitorino *et al.* (2005) diferiram daqueles encontrados em nossos resultados, onde relacionamos presença de  $\alpha$ -defensina 3 e  $\beta$ -defensina 3 com redução da experiência de cárie, e PRP IB4 com o aumento dessa variável. Provavelmente essa diferença nos tipos de peptídios encontrados pode ser justificada pela diferença na idade da população dos dois estudo, podendo, nas crianças durante a primeira infância, prevalecer tipos diferentes de peptídios em relação aos adultos.

Em relação às defensinas, foi encontrado no presente trabalho que  $\beta$ -defensina 3 sozinha não influencia na ausência/presença de cárie, mas a presença da  $\alpha$ -defensina 3

juntamente com a  $\beta$ -defensina 3 protege os indivíduos em relação à cárie. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Tao *et al.* (2005), no qual embora não tenha sido avaliada a presença simultânea desses dois peptídeos, os autores encontraram que níveis de  $\alpha$ -defensina 1-3 (uma mistura de  $\alpha$ -defensina 1, 2 e 3) são significativamente maiores em crianças com cáries do que em crianças sem cáries. Além disso, no mesmo trabalho, não foi encontrada relação da  $\beta$ -defensina 3 sozinha com experiência de cárie. A falta de um maior número de estudos que corroborem com esses achados pode ser explicada pelo fato de que pouca atenção tem sido dada ao papel das defensinas na imunidade inata da cavidade oral (DUNSCHE *et al.*, 2002). A relação encontrada no presente trabalho se deve, possivelmente, ao fato de que as defensinas em geral têm ação contra bactérias gram positivas e gram negativas (JOLY *et al.*, 2004; HARDER *et al.*, 2001). Embora tenha sido comprovado *in vitro* o efeito da  $\beta$ -defensina contra EGM (OUHARA *et al.*, 2005), e especificamente da  $\beta$ -defensina 3 contra EGM (MAISETTA *et al.*, 2003), provavelmente esse efeito é potencializado quando da existência simultânea deste peptídeo com a  $\alpha$ -defensina. Inclusive, Maisetta *et al.* (2003) fizeram um trabalho para avaliar a ação do peptídeo  $\beta$ -defensina 3 isolado e combinado com outros agentes antimicrobianos. Nesse estudo, os autores relataram atividade antibacteriana aumentada deste peptídeo quando associado a outros agentes antimicrobianos como lizosima, metronidazol, amoxicilina e clorexidina.

As defensinas fazem parte de uma família de pequenos peptídeos ricos em arginina (LEHRER, GANZ, SELSTED, 1991). VanWuyckuyse *et al.* (1995), ao analisarem aminoácidos em saliva de parótida de indivíduos com e sem cárie (20 adultos livres de cárie, 19 adultos e 17 crianças de 10 a 14 anos com cárie), reportaram uma tendência a um maior nível de glutamina, histidina, arginina e lisina nos grupos de adultos e crianças livres de cárie. Entretanto, a alta significância estatística ao comparar as concentrações desses aminoácidos em cada grupo só foi verificada para os aminoácidos arginina e lisina. Foi sugerido pelos autores que a maior disponibilidade desses aminoácidos em indivíduos sem cárie viabilizaria uma produção aumentada de poliaminas como putrescina e cadaverina, levando à síntese de  $\text{NH}_4^+$ , aumentando o pH da placa nestes indivíduos, tornando-os menos susceptíveis à cárie dentária. Nossos resultados estão de acordo com este estudo de VanWuyckuyse *et al.* (1995), ao mostrar que as defensinas ( $\alpha$ -defensina 3 juntamente com a  $\beta$ -defensina 3) possuem a mesma propriedade de proteção contra as cáries, apresentada pelo seu aminoácido constituinte arginina.

O presente trabalho foi baseado em critérios adaptados da Academia Americana de Odontologia Pediátrica (2009), onde manchas brancas na primeira infância foram

computadas no cálculo do número de dentes cariados, perdidos ou obturados devido à cárie. Afinal, ao longo dos tempos, o conhecimento relacionado à cárie dentária teve grandes mudanças, tendo-se atualmente uma compreensão bem diferente da doença, seus critérios diagnósticos e fatores de risco. Estatisticamente, investigaram-se, em conjunto, as variáveis capazes de influenciar risco à cárie dentária: idade, sexo, contagem de SM e presença de cada peptídeo identificado por meio de regressão logística. Essa abordagem estatística, possivelmente, permite uma melhor avaliação da capacidade de cada variável em aumentar ou reduzir a probabilidade ao desenvolvimento da cárie. Sendo a cárie uma doença que sofre influência de múltiplos fatores, não podemos atribuir a um fator isolado o poder de alterar o risco à doença (COSTA, 2008).

No presente trabalho, a contagem de EGM foi utilizada como forma de medir o risco de cárie da população estudada, já que EGM são considerados os principais fatores etiológicos para as cáries, e seus níveis salivares podem ser utilizados como preditores do risco de cárie (ALALUUSHUA *et al.*, 1996, BERKOWITZ; JORDAN; WHITE, 1975), embora o uso dos EGM como um fator isolado é um dado controverso de risco à cárie, já que a cárie é uma doença de natureza multifatorial (KEYES; JORDAN, 1963). Nossos resultados estão de acordo com Tao *et al.* (1995) em relação a menores níveis de EGM em crianças com cárie. Esse fato pode ser explicado por um reflexo do aumento da aderência da bactéria à superfície dentária ou devido à presença de espécies mais aderentes e/ou mais cariogênicas (RUDNEY; STAIKOV, 2002). Idade foi significativamente correlacionada com experiência de cárie de forma diretamente proporcional, concordando com o estudo de Fujiwara *et al.* (1991), que realizaram estudo com 356 crianças de 0 a 2 anos de idade. EGM foram encontrados em somente 7,3% na população com idade maior ou igual a 6 meses e menor que 1 ano. Aumentando a proporção para 29,7% na idade maior ou igual a 1 ano e 6 meses e menor que 2 anos; e para 43,4% na população com faixa etária maior ou igual a 2 anos e menor que 2 anos e 6 meses.

Outros fatores avaliados em praticamente metade da população desse estudo foram amamentação e nível de escolaridade dos pais já que há uma relação desses fatores com a cárie da primeira infância (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002; TINANOFF; SULLIVAN, 1997). Segundo Tinanoff e Sullivan (1997), nas crianças, a cárie pode estar relacionada com inapropriados hábitos de amamentação. Hallonsten *et al.* (1995) verificaram que a média de ceo-s (número de superfícies dentárias cariadas, extraídas devido à cárie ou obturadas na dentição decídua) era de 5,3 em grupo de crianças com cárie que tomavam mamadeira, sendo de 4,9 no grupo de crianças com cárie, mas que não tinham o hábito de tomar mamadeira.

Contrastando com esses resultados, Ramos-Gomez *et al.* (2002), objetivando buscar uma associação entre fatores bacterianos, comportamentais e ambientais com a CPI em população de crianças espanholas e afro-americanas com menos de 60 meses de idade, verificaram que não havia diferença estatisticamente significativa na dieta, nos padrões de amamentação, no nível de educação dos pais, na renda familiar e em relação ao país de origem em crianças com e sem cárie. Foi encontrada relação significativa entre CPI e perda de seguro dental da criança. Indivíduos infantis sem seguro dental encontravam-se duas vezes mais propícios a terem CPI do que crianças com seguro (público ou privado).

Existem fatores específicos relacionados à CPI. Os dentes decíduos, neste tipo de cárie, assumem uma significância especial porque a progressão das lesões para o interior da dentina é rápida devido à fina espessura do esmalte nos incisivos decíduos (~0,5mm comparado a mais de 1mm em incisivos permanentes) (RIPA, 1988). Em relação à amamentação, durante a sucção, o bico do peito ou da mamadeira é colocado contra o palato, momento em que a língua é estendida sobre os incisivos inferiores; dessa forma, o leite materno ou proveniente de mamadeira entra em contato com todos os dentes, com exceção dos incisivos inferiores que estão fisicamente protegidos pela língua (RIPA, 1988). Este último leva ao padrão comumente encontrado na CPI, caracterizado por um quadro onde os 4 incisivos superiores são mais afetados, enquanto os 4 incisivos inferiores permanecem hígidos (MC DONALD *et al.*, 2005). As cáries anteriores dos indivíduos do presente estudo seguiam esse padrão de maior ocorrência nos incisivos superiores.

No presente estudo, vários parâmetros foram avaliados em relação à experiência de cárie. Os resultados encontrados com relação aos peptídeos e demais fatores estiveram de acordo com a literatura. Vários peptídeos foram encontrados, baseando-se naqueles previamente existentes em bancos de dados, mas apenas 3 foram significativamente correlacionados com experiência de cárie. Devido ao pioneirismo desse trabalho, em que foram avaliados vários fatores de risco à cárie, incluindo peptídeos salivares de baixo peso molecular, na faixa etária concernente à primeira infância, há a necessidade de estudos aprofundados para verificar a associação de outros peptídeos com experiência de cárie nessa faixa etária e, possivelmente, descobrir peptídeos que ainda não foram seqüenciados, os quais, provavelmente, podem exercer papel fundamental no universo multifatorial da cárie dentária.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. Grande quantidade de peptídeos de baixo peso molecular foi encontrada em saliva total humana durante a primeira infância;
2. Houve diferença no perfil de peptídeos da saliva total de crianças com e sem cárie da primeira infância;
3. Na presente amostra, os peptídeos PRP IB-4,  $\alpha$ -defensina 3 e  $\beta$ -defensina 3 relacionaram-se com experiência de cárie, sendo o primeiro com aumento do risco e os dois últimos com proteção à cárie;
4. O peptídeo  $\alpha$ -defensina 3 encontra-se presente em crianças de maior idade (11 meses a mais) e atua como proteção à cárie nessas pessoas;
5. Os EGM e a idade foram relacionados positivamente à experiência de cárie, ao contrário do que foi observado com o sexo.

## REFERÊNCIAS

- ACS, O.; LODOLINI, U.; KAMINSKY, S.; CISNEROS, G. J. Effect of nursing caries on body weight in a pediatric population. **Pediatr. Dent.**, v. 14, n. 5, p. 302-305, Sept.-Oct. 1992.
- 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, Feb. 1996.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O. V. Streptococcus and mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **J. Dent. Res.**, v. 91, n. 6, p. 453-457, Dec. 1983.
- ALTMAN, H.; STEINBERG, D.; PORAT, Y.; MOR, A.; FRIDMAN, M.; FRIEDMAN, M.; BACHRACH, G. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 58, n. 1, p. 198-201, July 2006.
- AMERICA, A. H. P.; CORDEWENER, J. H. G. Comparative LC-MS: A landscape of peaks and valleys. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 731-749, Feb. 2008.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. **Definition of Early Childhood Caries (ECC)**, 2008. Disponível em: <<http://www.aapd.org>> . Acesso em: 28 jun. 2009.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Unique Challenges and treatment options. **Reference manual**, v. 30, n. 7, 2008/2009.
- ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MC GHEE, J. R. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v. 197, n. 4300, July 1977.
- AYAD, M.; VAN WUYCKHUYSE, B. C.; MINAGUCHI, K.; RAUBERTAS, R. F.; BEDI, G. S.; BILLINGS, R. J.; BOWEN, W. H.; TABAK, L. A. The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 4, p. 976-982, Apr. 2000.
- BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Antimicrobial peptides in COPD-basic biology and therapeutic applications. **Curr. Drug Targets**, v. 7, n. 6, p. 743-750, June 2006.
- BANKEL, M.; ERIKSSON, U. C.; ROBERTSON, A.; KÖLER, B. Caries and associated factors in a group of Swedish children 2-3 years of age. **Swed. Dent. J.**, v. 30, n. 4, p. 137-146, 2006.
- BARDOW, A.; MOE, D.; NYVAD, B.; NAUNTOFTE, B. The buffer capacity and buffer systems of human whole systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, n. 1, p. 1-12, Jan. 2000.

BAUM, B. J. Neurotransmitter control of secretion. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. spec., p. 628-632, Feb. 1987.

BEHBEHANI, J. M.; SCHEUTZ, F. Oral health in Kuwait. **Int. Dent. J.**, v. 54, n. 6, suppl. 1, p. 401-408, Dec. 2004.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high risk individuals and groups and its role in caries process. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 33, n. 4, p. 248-255, Aug. 2005.

BEN-ARYEN, H.; FISHER, M.; SZARGEL, R.; LAUFER, D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, n. 1, p. 929-931, 1990.

BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V.; WHITE, G. The early establishment of streptococcus mutans in the mouths of infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 20, n. 3, p. 171-174, Mar. 1975.

BIRKHED, D.; HEINTZE, U. Salivary secretion rate, buffer capacity and pH. In: TENOVUO, J. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**. Vol I. FL: CRC Press, 1989.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 61-92, 1995.

BOUE, D.; ARMAU, E.; TIRABAY, G. A bacteriological study of rampant caries in children. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 1, p. 23-28, Jan. 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, n. 1, p. 76-81, Feb. 1997.

BOWEN, W. H.; PEARSON, S. K.; ROSALEN, P. L.; MIGUEL, J. C.; SHIH, A. Y. Assessing the cariogenic potential of some infant formulas, milk and sugar solutions. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 128, n. 7, p. 865-871, July 1997.

BRAIDA, L. *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin-1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. **AIDS**, v. 18, n. 11, p. 1598-1600, July 2004.

BURNETT, G. W.; SCHIRP, H. W.; SCHUSTER, G. S. Cárie Dentária. In: **Microbiologia Oral e Doenças Infeciosas**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1978.

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, n. 1, p. 37-45, Jan. 1993.

CARDOSO, L.; RÖSING, C.; KRAMER, P.; COSTA, C. C.; COSTA FILHO, L. C. Polarização da água em município sem água fluoretada. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 237-246, jan.-fev. 2003.

CARLOS, J. P.; GITTELSON, A. M. Longitudinal studies of the natural history of caries II. **Arch Oral Biol.**, v. 10, n. 5, p. 739-751, Sept.-Oct. 1965.

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, n. 3, p. 121-124, Sept. 1987.

CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G.; WIKNER, S. Establishment of streptococcus mutans in the mouths of infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 15, n. 12, p. 1143-1148, Dec. 1970.

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

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia Restauradora Fundamentos e Possibilidades**. Quintessence editora LTDA: São Paulo, 2002

DALE, B. A.; KIMBALL, J. R.; KRISANAPRAKORNKIT, S.; ROBERTS, F.; ROBINOVITCH, M.; O'NEAL, R.; VALORE, E. V.; GANZ, T.; ANDERSON, G. M.; WEINBERG, A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **J. Periodont. Res.**, v. 36, n. 5, p. 285-294, Oct. 2001.

DALE, B. A.; TAO, R.; KIMBALL, J. R.; JUREVIC, R. J. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. **BMC Oral Health**, v. 6, suppl. 1: S13, June, 2006.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-833, June 2001.

DANIELS, T. E.; FOX, P. C. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 18, n. 3, p. 571-589, Aug. 1992.

DAWES, C. Factors influencing salivary flow rate and composition. In: EDGAR, W. M.; O'MUFLANE, D. M. **Saliva and dental health**. London: British Dental Journal, 1990.

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

DIAMOND, G. *et al.* Tracheal antimicrobial peptide, a cystein-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. **Proc. Natl. Acad.**, v. 88, n. 9, p. 3952-3956, May 1994.

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, Sept. 2002.

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, Summer 1996.

DUNSCHE, A.; AÇIL, Y.; DOMMISCH, H.; SIEBERT, R.; SCHRÖDER, J. M.; JEPSEN, S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 109, n. 2, p. 121-124, Apr. 2002.

DYE, B. A.; TAN, S.; SMITH, V.; LEWIS, B. G.; BARKER, L. K.; THORNTON-EVANS, G. *et al.* Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. National Center for Health Statistics. **Vital Health Stat.**, v. 11, n. 248, 2007.

EDFELT, K.; AGERBERTH, B.; ROTTENBERG, M. E.; GUDMUNDSSON, G. H.; WANG, X. B.; MANDAL, K.; XU, Q.; YAN, Z. Q. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 7, p. 1551-1557, July 2006.

EDGAR, W. M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br. Dent. J.**, v. 172, n. 8, p. 305-312, Apr. 1992.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, n. 15, p. 11-28, Dec. 1999.

ERICKSON, P. R.; MC CLINTOCK, K. L.; GREEN, N.; LAFLEUR, R. J.; Estimation of the caries-related risk associated with infant formulas. **Pediatr. Dent.**, v. 20, n. 7, p. 395-403, Nov. –Dec. 1998.

ERSIN, N. K.; ERONAT, N.; COGULU, 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, May-Aug. 2006.

FDI: Dental Caries. In: HINE, M. K. **Epidemiology of selected dental conditions 1950-1963**. Bethesda, Fédération Dentaire Internationale, National Library of Medicine, 1964.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Dental Caries**. The disease and its clinical management. 2.ed. Iowa: Blackwell Munksgaard, 2008.

FERGUSON, D. B. Current diagnostic uses of saliva. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 2, p. 420-424, Feb. 1987.

FERGUSON, D. B. Salivary electrolytes. In: TENOVUO, J. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**. Flórida: CRC Press, 1989. v. 1.

FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiological role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 61, p. 9-19, July 1960.

FONTELES, C. S. R.; GUERRA, M. H.; RIBEIRO, T. R.; MENDONÇA, D. N.; CARVALHO, C. B. M.; MONTEIRO, A. J.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C. Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 1, p. 80-85, Jan. 2009.

FOX, P. C. Saliva composition and its importance in dental health. **Compend. Suppl.**, v. 13, p. 457-460, 1989.

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. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 110, n. 4, p. 519-525, Apr. 1985.

FRIEDRICH, C. L. *et al.* Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, n. 8, p. 2086-2092, Aug. 2000.

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, June 1991.

GABAY, J. E. Ubiquitous natural antibiotics. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 373-374, Apr. 1994.

GANZ, T.; SELSTED, M. E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S. S. L.; DAHER, K.; BAINTON, D. F.; LEHRER, R. I. Defensins: natural peptide antibiotic of human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 4, p. 1427-1435, Oct. 1985.

GARG, A. K.; MALO, M. Manifestations and treatment of xerostomia and associated oral effects secondary to head and neck radiation therapy. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 128, n. 8, p. 1128-1133, Aug. 1997.

GIROIR, B. P.; QUINT, P. A.; BARTON, P.; KIRSCH, E. A.; KITCHEN, L.; GOLDSTEIN, B.; NELSON, B. J.; WEDEL, N. J.; CARROLL, S. F.; SCANNON, P. J. Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-inducing protein in children with severe meningococcal sepsis. **Lancet**, v. 350, n. 9089, p. 1439-1443, Nov. 1997.

GLANTZ, P. O.; FRIBERG, S. E.; WIRTH, S. M.; BAIER, R. E. Thin-section transmission electron microscopy of human saliva. **Acta Odontol. Scand.**, v. 47, n. 2, p. 111-116, Apr. 1989.

GLANTZ, P. O. Interfacial phenomena in the oral cavity. **Colloids. Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects**, v. 123-124, p. 657-670, May 1997.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for streptococcus mutans. **Arch. Oral Biol.**, v. 18, n. 11, p. 1357-1364, Nov. 1973.

GRANATH, L.; CLEATON-JONES, P.; FATTI, L. 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, Jan. 1993.

GREENWELL, A. L.; JOHNSEN, D.; DISANTIS, T. A.; GERTENMAJER, J.; LIMBERT, N. Longitudinal evaluation of caries patterns from the primary to the mixed dentition. **Pediatr. Dent.**, v. 12, n. 5, p. 278-282, Sept.-Oct. 1990.

GRINDEFJORD, M.; DAHLLOF, G.; MODEER, T. Caries development in children from 2.5 to 3.5 years of age. A longitudinal study. **Caries Res.**, v. 29, n. 6, p. 449-454, 1995.

GRINDEFJORD, M.; DAHLLOF, G.; WIKNER, S.; HÖJER, B.; MODÉER, T. Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 280-283, Oct. 1991.

GUARNA, M. M.; COULSON, R.; RUBINCHIK, E. Anti-inflammatory activity of cationic peptides: application to the treatment of acne vulgaris. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 257, n. 1, p. 1-6, Apr. 2006.

GUDMUNDSSON, G. H.; AGERBERTH, B.; ODEBERG, J.; BERGMAN, T.; OLSSON, B.; SALCEDO, R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL37 in granulocytes. **Eur. J. Biochem.**, v. 238, n. 2, p. 325-332, June 1996.

GUEDES PINTO, A. C. **Odontopediatria clínica**. São Paulo: Editora Artes Médicas LTDA, 1998.

GUSTAFSSON, B. E.; QUENSEL, C. E.; SWENANDER-LANKE, L.; LUNDQUIST, C.; GRAHNEN, H.; BONOW, B.E. KRASSE, B. The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. **Acta Odont. Scand.**, v. 11, n. 3-4, p. 232-364, Sept. 1954.

HALLET, K. B.; O'ROURKE, P. K. Pattern and severity of early childhood caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 34, n. 1, p. 25-35, Feb. 2006.

HALLONSTEN, A. L.; WENDT, L. K.; MEJARE, 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, n. 3, p. 149-155, Sept. 1995.

HÄSTRÖM, L.; JOHANSSON, A.; CARLSSON, J. Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mammalian cells against hydrogen peroxide toxicity. **Med. Biol.**, v. 61, n. 5, p. 268-274, 1983.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRÖDER, J. M. A peptide antibiotic from human skin. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 861-862, June 1997.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRÖDER, J. M. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 8, p. 5707-5713, Feb. 2001.

HATTON, M. N.; LOOMIS, R. E.; LEVINE, M. J.; TABAK, L. A. Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a saliva glycoprotein – albumin complex. **Biochem J.**, v. 230, n. 3, p. 817-820, Sept. 1985.

HAY, D. I.; BENNICK, A.; SCHLESINGER, D. H.; MINAGUCHI, K.; MADAPALLIMATTAM, G.; SCHLUCKEBIER, S. K. The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f). **Biochem. J.**, v. 255, n. 1, p. 15-21, Oct. 1988.

HAY, D. I.; MORENO, E. C.; SCHLESINGER, D. H. Phosphoprotein inhibitors of calcium phosphate precipitation from human salivary secretions. **Inorg. Persp. Biol. Med.**, v. 2, p. 271-285, 1979.

HOROWITZ, H. S. Research issues in early childhood caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 26 (1 Suppl), p. 67-81, 1998.

HUANG, C. M.; TORPEY, J. W.; LIU, Y. T.; CHEN, Y. R.; WILLIAMS, K. E.; KOMIVES, E. A.; GALLO, R. L. A peptide with a Progn C terminus in the human saliva peptidome exerts bactericidal activity against *Propionibacterium acnes*. **Antimicrob Agents Chemoter.**, v. 52, n. 5, p. 1834-1836, May 2008.

HUANG, H. J.; ROSS, C.R.; BLECHA, F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, n. 5, p. 624-629, May 1997.

HUMPREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow and function. **J. Prosthet. Dent.**, v. 85, n. 2, p.162-169, Feb. 2001.

HUNTER, K. D.; WILSON, W. S. The effects of antidepressants drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ion in human parotid saliva. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, n. 11, p. 983-989, Nov. 1995.

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

IKEDA, T.; SANDHAM, H. J.; BRADLEY JR, E. L. Changes in streptococcus mutans and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children. **Arch. Oral Biol.**, v. 18, n. 4, p. 555-566, Apr. 1973.

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, n. 6, p. 951-957, Nov.-Dec. 1976.

JOHNSON, D. C.; GERSTENMAIER, J. H.; DISANTIS, T. A.; BERKOWITZ, R. J. Susceptibility of nursing caries children to future approximal molar decay. **Pediatr. Dent.**, v. 8, n. 3, p. 168-170, June, 1986.

JOLY, S.; MAZE, C.; MC CRAY JR, P. B.; GUTHMILLER, J. M. Human  $\beta$ -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1024-1029, Mar. 2004.

JONES, D. E.; BEVINS, C. L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 32, p. 23216-23225, Nov. 1992.

JORDAN, H. V.; LARAWAY, R.; SNIRCH, R.; MARMEL, M. A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 1, p. 57-61, Jan. 1987.

KAMYSZ, W.; OKROJ, M.; LUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochim. Pol.**, v. 50, n. 2, p. 461-469, 2003.

KASTE, L.; MARIANOS, D.; CHANG, R.; PHIPPS, K. R. The assessment of nursing caries and its relationship to high caries in permanent dentition. **J. Public Health Dent.**, v. 52, n. 2, p 64-68, Winter 1992.

KELLY, M.; BRUERD, B. The prevalence of baby bottle tooth decay among two Native American populations. **J. Public Health Dent.**, v. 47, n. 2, p. 94-97, Spring 1987.

KERLIKOWSKE, K.; GRADY, D.; RUBIN, S. M.; SANDROCK, C; ERNSTER, V. L. Efficacy of screening mammography: a meta-analysis. **JAMA.**, v. 273, n. 2, p. 149-154, Jan. 1995.

KEYES, P. H. Research in dental caries. **JADA.**, v. 76, n. 6, p. 1357-1373, June 1968.

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

KEYES, P.H.; JORDAN, H. V.; Factors influencing the initial transmission and inhibition of dental caries. In: HARRIS, R. S. **Mechanisms of hard oral tissue destruction**, p. 261-283, New York: Acad. Pr. 1963.

KIRSTILÄ, V.; HÄKKINEN, P.; JENTSCH, H.; VILJA, P.; TENOVUO, J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic micro-organisms: a two-year cohort study. **J. Dent. Res.**, v. 77, n. 1, p. 73-80, Jan. 1998.

KOHYAMA, H.; SHIMOMURA, H.; SANADA, K. Fractionation of low molecular peptides in saliva of decayed child. **Shigaku**, v. 72, n. 3, p. 595-610, Oct. 1984.

KOUNTOURAS, J. Detecting Helicobacter pylori. Diagnostic tests for Helicobacter pylori. **Gut.**, v. 42, n. 6, p. 900-901, 1998.

KRASSE, B. The effect of caries inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. **Arch. Oral Biol.**, v. 10, n. 2, p. 223-226, Mar.-Apr. 1965.

KRASSE, B.; GAHNBERG, L. Available immunoglobulin A antibodies in mouth rinses and implantation of streptococcus mutans. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 3, p. 1360-1362, Sept. 1983.

KYLSTEN, P.; SAMAKOVLIS, C.; HULTMARK, D. The cecropin locus in Drosophila: a compact gene cluster involved in response to infection. **EMBO J.**, v. 9, n. 9, p. 217-224, Sept. 1990.

LAIBLE, N. J.; GERMANE, G. R. Adsorption of lysozyme from human whole saliva by streptococcus sanguis 903 and other oral microorganisms. **Infect. Immun.**, v. 36, n. 1, p. 148-159, Apr. 1982.

LAJERLOF, F.; DAWES, C. The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. **J Dent. Res.**, v. 63, n. 5, p. 618-621, May 1984.

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

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. **Cell.**, v. 64, n. 2, p. 229-230, Jan. 1991.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 797, p. 228-239, Oct. 1996.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Carboidratos. In: \_\_\_\_\_ **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LENANDER-LUMIRAKI, M.; LOIMARANTA, V. Saliva and dental caries. **Adv. Dent. Res.**, v. 14, n. 1, p. 40-47, Dec. 2000.

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, n. 1, 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. **Arch. Oral Biol.**, v. 39, n. 12, p. 1057-1062, Dec. 1994.

LINSCHIED, M. W.; AHRENDTS, R.; PIEPER, S.; KUHN, A. Liquid Chromatography – mass spectrometry – based quantitative proteomics. **Methods Mol. Biol.**, v. 564, p. 189-205, 2009.

LOESCHE, W. J. Role of streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v. 50, n. 4, p. 353-380, Dec. 1986.

LOESCHE, W. J.; ROWAN, J.; STRAFFON, L. H.; LOOS, P. J. Association of streptococcus mutans with human dental decay. **Infect. Immun.**, v. 11, n. 6, P. 1252-1260, June 1995.

MADAPALLIMATTAM, G.; BENNICK, A. Phosphopeptides derived from human salivary acidic proline-rich proteins. **Biochem. J.**, v. 270, n. 2, p. 297-304, Sept. 1990.

MAISETTA, G.; BATONI, G.; ESIN, S.; LUPERINI, F.; PARDINI, M.; BOTTAI, D.; FLORIO, W.; GIUCA, M. R.; GABRIELE, M.; CAMPA, M. Activity of human  $\beta$ -defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 47, n. 10, p. 3349-3351, Oct. 2003.

MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid. **Br. Med. J.**, v. 305, n. 6847, p. 207-208, July 1992.

MALLOW, E. M.; HARRIS, A.; SALZMAN, N.; RUSSELL, J. P.; DEBERARDINIS, R. J.; RUCHELLI, E.; BEVINS, C. L. Human enteric defensins. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 8, p. 4038-4045, Feb. 1996.

- MALTZ, M.; SILVA, B. B. Relação entre cárie, gengivite, fluorose e nível socioeconômico em escolares. **Rev. Saúde pública**, v. 35, n. 2, p. 170-176, abr. 2001.
- MANDEL, I. D. The diagnostic uses of saliva. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 19, n. 3, p. 119-125, Mar. 1990.
- MANDEL, I. D. The functions of saliva. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. spec., p. 623-627, Feb. 1987.
- MANDEL, L.; FATEHI, J. Minor salivary gland sialolithiasis. Review and case report. **N. Y. State Dent.**, v. 58, n. 10, p. 31-3, Dec. 1992.
- MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.*, v. 61, p. 1702-1708, 1989.
- MÄNSSON-RAHEMTULLA, B.; BALDONE, D. C.; PRUITT, K. M.; RAHEMTULLA, F. Effects of variations in pH and hypothiocyanite concentrations on *S. mutans* glucose metabolism. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 2, p. 486-491, Feb. 1987.
- MARTHALER, T. M. Changes in dental caries 1953-2003. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 173-181, May-Jun. 2004.
- MATEE, M. I. N.; MIKX, F. H. M.; MASELLE, S. Y. M.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W. H. Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. **Caries Res.**, v. 26, n. 3, p. 183-187, 1992.
- MATHEWS, M.; JIA, H. P.; GUTHMILLER, J. M.; LOSH, G.; GRAHAM, S.; JOHNSON, G. K.; TACK, B. F.; MC CRAY JR, P. B. Production of  $\beta$ -Defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 6, p. 2740-2745, June 1999.
- MATTOS-GRANER, R. O.; CORRÊA, M. S. N. P.; LATORRE, M. R. O.; PERES, R. C. R.; MAYER, M. P. A. Mutans streptococci oral colonizarion 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, Summer 2001.
- MATTOS-GRANER, R. O.; SMITH, D. J.; KING, W. F.; MAYER, M. P. A. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 6, p. 1371-1377, June 2000.
- 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 Brazilian children. **Caries Res.**, v. 32, n. 5, p. 319-323, 1998.
- MC CARTHY, C.; SNYDER, M. L.; PARKER, R. B. The indigenous oral flora of man I. The newborn to the 1-year-old infant. **Arch. Oral Biol.**, v. 10, n. 1, p. 61-70, Jan.-Feb. 1965.
- MC DONALD, R. E.; AVERY, D. R.; STOOKEY, G. K. **Cárie dentária na criança e no adolescente**. In: MC DONALD, R. E.; AVERY, D. R. *Odontopediatria*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

MC KAY, M. S.; OLSON, E.; HESLA, M. A.; PANYUTICH, A.; GANZ, T.; PERKINS, S.; ROSSOMANDO, E. F. Immunomagnetic recovery of human neutrophil defensins from the human gingival crevice. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 190-193, June 1999.

MC RAY, M. S.; OLSON, E.; HESLA, M. A.; PANYUTICH, A.; GANZ, T.; PERKINS, S.; ROSSOMANDO, E. F. Immunomagnetic recovery of human neutrophil defensins from the human gingival crevice. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 190-193, June 1999.

MILLER, W. D. **The micro-organisms of the human mouth.** Unaltered reprint of the original work by Willoughby D. Miller (1853-1907) published in 1890 in Philadelphia. Basel: Karger, 1973.

MILNES, A. R. Description and epidemiology of nursing caries. **J. Public Health Dent.**, v. 56, n. 1, p. 38-50, Winter 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Projeto SB Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira 2002-2003.** Brasília, 2004.

MIZUKAWA, N.; SUGIYAMA, K.; UENO, T.; MISHIMA, K.; TAKAGI, S.; SUGAHARA, T. Defensin-I, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases. **Oral Dis.**, v. 5, n. 2, p. 139-142, Apr. 1999.

MIZUKAWA, N.; SUGIYAMA, K.; UENO, T.; MISHIMA, K.; TAKAGI, S.; SUGAHARA, T. Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 87, n. 5, p. 539-543, May 1999.

MOTA, A. C. M. **Análise do perfil de proteínas salivares, experiência de cárie e níveis de streptococcus mutans em população de crianças desnutridas.** 2008. 143f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 2008.

MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; DORSCHNER, R. A.; GALLO, R. L. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 12, p. 845-850, Dec. 2002.

NEDERFORS, T. **Xerostomia and hyposalivation.** *Adv. Dent. Res.*, v. 14, p. 48-56, 2000.

NEFF, D. Acid production from different carbohydrate sources in human plaque *in situ*. **Caries Res.**, v. 1, n. 1, p. 78-87, 1967.

NEVILLE, B.W., DAMM, D.D., ALLEN, C.M., BOUQUOT, J.E. Anormalidades dentárias. In: \_\_\_\_\_ **Patologia oral e maxillofacial.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

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, n. 5, p. 347-352, Sept.-Oct. 2002.

- ONG, P. Y.; OHTAKE, T.; BRANDT, C.; STRICKLAND, I.; BOGUNIEWICZ, M.; GANZ, T.; GALLO, R. L.; LEUNG, D. Y. Endogenous antimicrobial peptides and skin infectious in atopic dermatitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 15, p. 1151-1160, Oct. 2002.
- 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, Jan.-Feb. 1993.
- O'SULLIVAN, D. M.; TINANOFF, N. The association of early childhood caries patterns with caries incidence in preschool children. **J. Public Health Dent.**, v. 56, n. 2, p. 81-83, Spring 1996.
- OPPENHEIM, F. G.; XU, T.; MC MILLIAM, F. M.; LEVITZ, S. M.; DIAMOND, R. D.; OFFNER, G. D.; TROXLER, R. F. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 16, p. 7472-7477, June 1988.
- OUHARA, K.; KOMATSUZAWA, H.; YAMADA, S.; SHIBA, H.; FUJIWARA, T.; OHARA, M.; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; KURIHARA, H.; SUGAI, M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides,  $\beta$ -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 55, n. 6, p. 888-896, May 2005.
- PERINPANAYAGAM, H. E. R.; VAN WUYCKHUYSE, B. C.; JI, Z. S.; TABAK, L. A. Characterization of low-molecular-weight peptides in human parotid saliva. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 1, p. 345-350, Jan. 1995.
- 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, Summer 2000.
- PRUITT, K. M. The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties. **J. Oral Pathol.**, v. 16, n. 8, p. 417-420, Sept. 1987.
- PUTSEP, K.; CARLSSON, G.; BOMAN, H. G.; ANDERSSON, M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1144-1149, Oct. 2002.
- QUISSELL, D. O. Steroid hormone analysis in saliva. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 694, n. 1, p. 17-24, Apr. 1996.
- RAJ, P. A.; ANTONYRAJ, K. J.; KARUNAKARAM, T. Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. **Biochem. J.**, v. 347, Pt 3, p. 633-641, May 2000.
- 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, Winter 2002.
- READ, G. F. Hormones in saliva. TENOVUO, J. O. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**, vol II. Flórida: CRC Press, 1989.
- RIPA, L. W. Nursing caries: a comprehensive review. **Pediatr. Dent.**, v. 10, n. 4, p. 268-282, Dec. 1988.

- RUDNEY, J. D.; STAIKOV, R. K. Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomicetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. **Arch. Oral Biol.**, v. 47, n. 5, p. 347-359, May 2002.
- SAHASRABUDHE, K. S.; KIMBALL, J. R.; MORTON, T. H.; WEINBERG, A.; DALE, B. A. Expression of the antimicrobial peptide, human  $\beta$ -defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 9, p. 1669-1674, Sept. 2000.
- SCHIPPER, R. G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M. H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, n. 12, p. 1114-1135, Aug. 2007.
- SCHONWETTER, B. S.; STOLZENBERG, E. D.; ZASLOFF, M. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. **Science**, v. 267, n. 5204, p. 1645-1648, Mar 1995.
- SCULLY, C. HIV topic update salivary testing for antibodies. **Oral Dis.**, v. 3, n. 4, p. 212-215, Dec. 1997.
- SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 26, suppl. 1, p. 8-27, 1998.
- SHAW, J. H.; WOLLMAN, D. H. The influence of sialoadenectomy in rats on food and water consumption. **J. Dent. Res.**, v. 37, n. 5, p. 805-810, Sept.-Oct. 1958.
- SHOMERS, J. P.; TABAK, L. A.; LEVINE, M. J.; HAY, D. I. Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. **J. Dent. Res.**, v. 61, n. 2, p. 397-399, Feb. 1982.
- SIMMONDS, R. S.; TOMPKINS, G. R.; GEORGE, R. J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque; a review of recent advances. **N. Z. Dent. J.**, v. 96, n. 424, p. 44-49, June 200.
- SLAVKIN, H. C. Toward molecular based diagnostics for the oral cavity. **JADA.**, v. 129, n.10, p. 1138-1143, Oct. 1998.
- SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A.; EBERSOLE, J. L. Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. **Infect. Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 82-89, Oct. 1979.
- SÖDERLING, E. Practical aspects of salivary analysis. In: TENOVUO, J. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**. Flórida: CRC Press, 1989. v. 1.
- SREEBNY, L. M.; ZHU, W. X. The use of whole saliva in the differential diagnosis of Sjögren's syndrome. **Adv. Dent. Res.**, v. 10, n. 1, p. 17-24, Apr. 1996.
- STEINER, H.; HUTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246-268, July 1981.

STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Dis.**, v. 8, n. 2, p. 69-76, Mar. 2002.

TABAK, L. A.; LEVINE, M. J.; MANDEL, I. D.; ELLISON, S. A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. **J. Oral Pathol.**, v. 11, n. 1, p. 1-17, Feb. 1982.

TANAKA, D.; MIYASAKI, K. T.; LEHRER, R. I. Sensitivity of actinobacillus actinomycetemcomytans and capnocytophaga spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 226-231, Aug. 2000.

TAO, R.; JUREVIC, R. J.; COULTON, K. K.; TSUTSUI, M. T.; ROBERTS, M. C.; KIMBALL, J. R.; WELLS, N.; BERNT, J.; DALE, B. A. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 49, n. 9, p. 3883-3888, Sept. 2005.

TAPPUNI, A. R.; CHALLACOMBRE, S. J. A comparison of salivary immunoglobulin A (IgA) and IgA subclass concentrations in predentale and dentale children and adults. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 142-145, June 1994.

TATEVOSSIAN, A. Facts and artefacts in research on human dental paque fluid. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 6, p. 1309-1315, June 1990.

TENOVUO, J. **Human saliva:** clinical chemistry and microbiology. Flórida: CRC Press, 1989. v. 1.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? **Acta Odontol. Scand.**, v. 56, n. 5, p. 250-256, Oct. 1998.

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, Feb. 1987.

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

TENOVUO, J.; PRUITT, K. M. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. **J. Oral Pathol.**, v. 13, n. 6, p. 573-584, Dec. 1984.

TERRITO, M. C.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 6, p. 2017-2020, Dec. 1989.

THIBODEAU, B. 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, n. 6, p. 406-412, Dec. 1999.

- THIBODEAU, B. A.; O'SULLIVAN, D. M. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 24, n. 3, p. 164-168, June 1996.
- TINANOFF, N.; O'SULLIVAN, D. M. Early childhood caries: overview and recent findings. **Pediatr. Dent.**, v. 19, n. 1, p. 12-16, Jan.-Feb. 1997.
- TRAEBERT, J. L.; PERES, M. A.; GALESSO, E. R.; ZABOT, N. E.; MARCENES, W. Prevalência e severidade da cárie dentária em escolares de seis e doze anos de idade. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, n.3, p. 283-288, jun. 2001.
- VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Adv. Dent. Res.**, v. 7, n. 2, p. 87-96, Aug. 1993.
- 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, Feb. 1982.
- VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER, J. G.; VEERMAN, E. C. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 247-253, May-June 2004.
- VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C. I.; HELMERHORST, E. J.; AMERONGEN, A. V. N. Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biol. Chem.**, v. 382, n. 4, p. 597-619, Apr. 2001.
- VAN WUYCKHUYSE, B. C.; PERINPANAYAGAM, H. E. R.; BEVACQUA, D.; RAUBERTAS, R. F.; BILLINGS, R. J.; BOWEN, W. H.; TABAK, L. A. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 2, p. 686-690, Feb. 1995.
- VARGAS, C. M.; RONZIO, C. R.; Disparities in early childhood caries. **BMC Oral Health**, v. 6, suppl. 1, July 2006.
- VITORINO, R.; LOBO, A. J. C.; DUARTE, J. A. R.; FERRER-CORREIA, A. J.; DOMINGUES, P. M.; AMADO, F. M. L. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr.**, v. 18, n. 8, p. 570-575, Oct. 2004.
- VITORINO, R.; LOBO, A. J. C.; DUARTE, J. A. R.; FERRER-CORREIA, A. J.; DOMINGUES, P. M.; AMADO, F. M. L. The role of salivary peptides in dental caries. **Biomed. Chromatogr.**, v. 19, n. 3, p. 214-222, Apr. 2005.
- WAN, A. K. L.; SEOW, L. J.; WALSH, L. J.; BIRD, P.; TUDEHOPE, D. I.; PURDIE, D. M. Association of streptococcus mutans infection and oral development nodules in pre-dentale infants. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 10, p. 1945-1948, Oct. 2001.
- 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 predentale infants. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 12, p. 2060-2065, Dec. 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, July 2003.

WATSON, G. E.; PEARSON, S. K.; FALANY, J. L. The effect of chronic propranolol treatment on salivary composition and caries in the rat. **Arch Oral Biol.**, v. 35, n. 6, p. 435-441, 1990.

WOO, J. S.; JEONG, J. Y.; HWANG, Y. J.; CHAE, S. W.; HWANG, S. J.; LEE, H. M. Expression of cathelicidin in human salivary glands. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 129, n. 2, p. 211-214, Feb. 2003.

YAMADA, S.; YAJIMA, J.; HARANO, M. MIKI, K.; NAKAMURA, J.; TSUDA, A.; SHOJI, H.; MAEDA, H.; TANAKA, M. Saliva level of free 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in psychiatric outpatients with anxiety. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 13, n. 5, p. 213-217, Sept. 1998.

ZAIYOU, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. **J. Mol. Med.**, v. 85, n. 4, p. 317-329, Jan. 2007.

ZHANG, L.; YU, W.; HE, T.; YU, J.; CAFFREY, R. E.; DALMASSO, E. A.; FU, S.; PHAM, T.; MEI, J.; HO, J. J.; ZHANG, W.; LOPEZ, P.; HO, D. D. Contribution of human  $\alpha$ -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 995-1000, Nov. 2002.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, Jan. 2002.

ZHAO, C.; WANG, I.; LEHRER, R. L. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. **FEBS Lett.**, v. 396, n. 2-3, p. 319-322, Nov. 1996.

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

ZOITOPOULOS, L.; BRAILSFORD, S. R.; GELBIER, S.; LUDFORD, R. W.; MARCHANT, S. H.; BEIGHTON, D. Dental caries and caries-associated micro-organisms 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, Nov. 1996.

# APÊNDICES

## **APÊNDICE A : Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

### **“ESTUDO DO PERFIL DE PEPTÍDIOS SALIVARES DE CRIANÇAS COM CÁRIE DA PRIMEIRA INFÂNCIA. UMA VISÃO DA SALIVA COMO MEIO DIAGNÓSTICO”**

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.

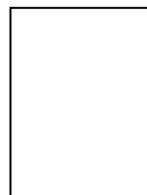
Ao assinar este termo que consta de seu nome, nome de seu filho ou filha, idade, e número do prontuário, você estará declarando que por meio de livre e espontânea vontade sua e de seu filho ou filha, ele(a) estará participando como voluntário do projeto de pesquisa citado acima, de responsabilidade da Cirurgiã-Dentista Thyciana Rodrigues Ribeiro da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Ceará. O abaixo-assinado estará ciente que:

- a) O objetivo da pesquisa é verificar se existe alguma diferença entre a saliva de uma criança com cárie e a de outra 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 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, e da coleta de saliva.
- 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:
  - Na primeira amostra, haverá coleta da saliva já presente na boca do seu filho ou filha com o uso de uma pequena cânula (semelhante a um pequeno pedaço de borracha), enquanto se encontra em repouso no seu colo.
  - Na segunda amostra, seu filho ou filha terá que chupar um pequeno pedaço de parafina por um minuto, e o mesmo se encontrará ligada a um pedaço de fio dental, para evitar que o seu filho ou filha engula o material. Após decorrido o tempo o mesmo será retirado da boca e a saliva será colocada em um pequeno frasco.

- Para que seja feita a coleta é preciso que seu filho ou filha, esteja em jejum por no mínimo 3 horas, e que tenha escovado os dentes uma hora antes da consulta.
- f) Seu filho ou filha NÃO RECEBERÁ INJEÇÃO de anestésico local.
- g) Essa saliva após recolhida será analisada para que se possa verificar o tipo de peptídeo, anticorpo e bactéria presente.
- h) 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.
- i) A participação neste estudo lhe dá o direito do seu filho ou filha ter, sem custos, profilaxia (limpeza dos dentes) e aplicação tópica de flúor para a prevenção, evitando novas cáries.
- j) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo. Não haverá identificação por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- k) É condição indispensável para participação no estudo que seu filho ou filha não tenha nenhuma doença crônica e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso crônico de drogas ou medicações.
- l) O surgimento de resfriados ou viroses, com conseqüente uso de medicações por período de tempo limitado, não exclui seu filho ou filha do estudo.
- m) Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contactar a Cirurgiã-Dentista. Thyciana Rodrigues Ribeiro (responsável pelo projeto) na Faculdade de Odontologia (sala 1), rua Monsenhor Furtado, s/n, Rodolfo Teófilo ou nos telefone 3366 8408 / 9974 6688. Pode-se ainda contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará no telefone 3366 8338.

Fortaleza, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pai ou responsável



Impressão digital do pai ou responsável, caso não assine

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
Thyciana Rodrigues Ribeiro  
Pesquisadora Responsável

**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 \_\_\_\_\_

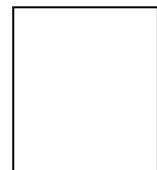
**ESTADO DE SAÚDE GERAL DA CRIANÇA****FAVOR LER E RESPONDER COM ATENÇÃO.**

- 1) O seu filho ou filha se encontra sob tratamento médico?      SIM      NÃO  
 Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. \_\_\_\_\_
- 2) O seu filho ou filha tem alguma doença crônica?      SIM      NÃO  
 Qual? Caso a sua resposta tenha sido SIM. \_\_\_\_\_
- 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.

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



**APÊNDICE C: Ficha de exame dentário**

**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

**EXAME DENTÁRIO**

|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>55</b> | <b>54</b> | <b>53</b> | <b>52</b> | <b>51</b> | <b>61</b> | <b>62</b> | <b>63</b> | <b>64</b> | <b>65</b> |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |

# **ANEXO**

**ANEXO: Aprovação do comitê de ética**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 234/07

Fortaleza, 09 de abril de 2007

**Protocolo COMEPE n° 53/ 07**

**Pesquisador responsável:** Thyciana Rodrigues Ribeiro

**Deptº./Serviço:** Departamento de Odontologia/UFC

**Título do Projeto:** "Estudo do perfil de peptídios salivares de crianças com cárie da primeira infância. Uma visão da saliva como meio diagnóstico"

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. 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 n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 22 de março 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, apresentando uma grafia cursiva e estilizada.

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