

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães

Marina Sousa Azevedo

Pelotas, 2010

MARINA SOUSA AZEVEDO

Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Odontopediatria da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Regina Romano
Co-orientador: Prof. Dr Maximiliano Sergio Cenci

Pelotas, 2010

Dados de Catalogação da Publicação

A994b

Azevedo, Marina Sousa

Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem cárie e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães/ Marina Sousa Azevedo ; orientadora Ana Regina Romano , coorientador Maximiliano S. Cenci.

-Pelotas:UFPEl, 2010.

74f; tab.; fig.

Dissertação (Mestrado) Odontopediatria. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

1.Cárie dentária. 2.Biofilme. 3.Crianças pré-escolares. 4.Desmineral
I.Romano,Ana Regina.(orient.) II.Cenci,Maximiliano (coorient.)
III.Título.

D602

Banca examinadora:

Profª. Drª Ana Regina Romano

Prof. Dr. Carlos Alberto Feldens

Profª. Drª Dione Dias Torriani

Profª. Drª Maria Laura Menezes Bonow (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico a autoria deste trabalho,

Aos meus pais,

Pela educação e formação que me deram.

Ao meu avô Wilmar,

Que está sempre presente.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Universidade Federal de Pelotas** por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Prof. Dr. César Borges.

À **Faculdade de Odontologia** através de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Márcia Bueno Pinto.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em especial ao seu coordenador Prof. Dr. **Flávio** Demarco, por ser um grande incentivador e por desempenhar seu papel de forma extraordinária.

À Coordenadora da área de Odontopediatria no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, Prof^a. Dr^a. **Dione** Dias Torriani, pelo empenho, responsabilidade e dedicação. Seu caráter ético é um exemplo. Minha gratidão pelo aprendizado e enriquecimento científico.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Ana** Regina Romano, à qual admiro e para quem agradeço de maneira especial, pois sempre me incentivou a seguir este caminho e acreditou na minha capacidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Maximiliano** Sergio Cenci, pela sua incansável disposição em ajudar, por toda dedicação, por difundir seu conhecimento, pelo esforço em conjunto para realização desta dissertação. Exemplo de professor e pesquisador. Obrigada também a Prof^a. Dr^a. **Tatiana** Pereira-Cenci que sempre me recebeu bem na casa de vocês.

Ao **Laboratório de Microbiologia** na pessoa do Prof. Dr. Rafael Lund.

Ao **Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais** (CDC-Bio) na pessoa do Prof. Dr. Evandro Piva.

À Prof^a. Dr^a **Fernanda** Pappen pelas contribuições na minha qualificação de projeto de dissertação.

À Prof^a. Dr^a **Maria Laura** Menezes Bonow, não só pelas suas sugestões na qualificação do projeto de dissertação, mas também pela contribuição na minha formação Odontopediátrica.

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela convivência e pelo aprendizado.

À colega de Mestrado **Françoise Hélène van de Sande Leite**, pela imensa contribuição com este trabalho, pelo agradável convívio e pela amizade.

Um agradecimento especial para a colega e amiga **Marília Leão Goettems**, pelo convívio divertido e harmonioso.

À todos os **colegas** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas pela boa convivência.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, **Josiane Machado da Silva**, por ser sempre solícita.

Aos funcionários **Graça, Tati, Seu Airton e Seu Ricardo** por estarem sempre prontos a prestar qualquer auxílio.

Ao aluno de graduação **Vinicius** que participou deste trabalho diretamente.

Aos alunos de graduação **Carolina, Tamires e Tiago** sempre dispostos a ajudar.

Ao **João** pelo apoio e paciência.

À minha babá e segunda mãe, **Neli** que está sempre dando a maior força.

À minha irmã, **Juliana Azevedo**, com quem pude dividir não só o quarto e o computador, mas também meus anseios durante esta jornada.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta Dissertação de Mestrado.

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

RESUMO

AZEVEDO, Marina Sousa. **Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães.** 2010. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Os microrganismos pertencentes à microflora oral residente, os quais são organizados em comunidades complexas, o biofilme, atuam diretamente no processo cárie dentária. É necessário compreender o grau com que o ambiente nutricional e físico-químico do biofilme influenciam no desenvolvimento da placa em indivíduos que diferem em seu ambiente bucal. Nesse contexto, modelos de biofilme poderiam ser usados para responder a questões específicas relacionadas à cárie. O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que biofilmes de microcosmo crescidos a partir do inóculo de crianças livres de cárie (LC), com cárie na primeira infância (CPI) e com com CPI severa (CPI-S) dariam a mesma resposta cariogênica sob uma exposição regular de sacarose, em um modelo de biofilme padronizado. Além disso, biofilmes de microcosmos formados a partir da saliva de crianças e de suas mães foram comparados, considerando-se resposta cariogênica e composição microbiana. Três crianças de cada grupo: LC; CPI; CPI-S e suas mães foram selecionadas. Os pares foram examinados e a condição dentária registrada. Amostras de saliva foram coletadas e avaliadas quanto à composição microbiana. O biofilme de microcosmos foi iniciado a partir da coleta de saliva, crescida sobre discos de esmalte bovino em saliva artificial enriquecida com mucina (DMM) por 10 dias em placas de 24 micropoços em condição de anaerobiose. Os biofilmes cresceram com e sem sacarose sob um regime semi-dinâmico previamente testado. O DMM foi renovado diariamente e aferições do pH dos sobrenadantes foram registradas do DMM com e sem sacarose. No décimo dia os biofilmes foram coletados e a composição da microbiota foi avaliada por métodos de cultura. A perda mineral do esmalte foi obtida através da porcentagem de mudança da microdureza de superfície para cada disco de esmalte (%PDS). A relação entre as variáveis de desfecho estudadas (pH, microbiota e %PDS) das mães e de seus filhos foi estimada através do teste de correlação de Spearman. Comparações estatísticas independentes entre mudança da microdureza de superfície, pH e microbiota do biofilme foram conduzidas para cada grupo e condição (exposição a sacarose) e analisadas utilizando ANOVA duas vias, seguido do Teste de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Os grupos sob a condição de desafio cariogênico mostraram: maior contagem de acidúricos totais, *S. mutans* e lactobacilos totais, valores mais baixos de pH do DMM e maior perda mineral do que o grupo sem desafio cariogênico. Diferenças entre os grupos não foram significantes, com exceção do pH do DMM com sacarose para as crianças ($p=0,005$), do pH do DMM puro ($p=0,004$) e da contagem de acidúricos totais ($p=0,037$) para as mães. Houve correlação entre os biofilmes das crianças e de suas mães na condição de desafio cariogênico. Assim, o crescimento de biofilme de microcosmos originados a partir do inóculo de crianças com e sem cárie na primeira infância promovem resposta cariogênica similar sob exposições regulares de sacarose. Além disso, a presença do desafio cariogênico foi determinante para existência de correlação na resposta cariogênica no biofilme de microcosmos entre o inóculo de mães e seus filhos.

Palavras-chave: Biofilme. Cárie dentária. Criança pré-escolar. Desmineralização. *In vitro*.

ABSTRACT

AZEVEDO, Marina Sousa. 2010. **Biofilms generated from saliva of children without and with early childhood caries: response of cariogenic challenge and correlation with their mothers.** 74p. Master's degree thesis – Graduation Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS.

Micro-organisms belonging to the resident oral microflora are organized into complex communities, the biofilms, and are the direct cause of the caries process. It is necessary to understand the degree to which biofilm physicochemical and nutrient environments affect the plaque development in individuals differing in their oral environments. In this context, microcosm biofilm models could be used to answer specific questions related to caries. The aim of this study was to test the hypothesis that microcosm biofilms growth from inoculums of caries free children (CF), children with early childhood caries (ECC) and with severe early childhood caries (S-ECC) would provide the same cariogenic response under regular sucrose exposure. Also, microcosm biofilms formed from saliva of children and their mothers considering cariogenic response and microbiota composition were compared. Three children of each group were selected: CF, ECC and S-ECC and their mothers. The mother-child pairs were examined and the dental status was recorded. Saliva samples were collected and screened for microbial composition. Microcosm plaque biofilms were initiated from saliva, growth on bovine enamel discs in artificial saliva enriched with mucin (DMM) for up to 10 days in 24-well microplates under anaerobic conditions. Biofilms were grown with and without sucrose under a semi-dynamic regimen previously tested. DMM was replaced daily and pH measurements were recorded for DMM with sucrose or DMM without sucrose supernatants. On the 10th day, biofilms were collected and microbiota composition was assessed by culture methods. The enamel mineral loss was obtained by the percentual surface microhardness change (%SHC) for each enamel disc. The relationship between outcome variables (pH, microbiota and %SHC) from mothers and children was estimated by Spearman's correlation test, considering each outcome within each caries risk group. Independent statistical comparisons among surface microhardness change, pH and biofilm microbiota were made for group and condition (sucrose exposure) and analyzed using 2-way ANOVA followed by Tukey's test. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. The groups with cariogenic challenge condition showed: higher levels of the total aciduric counts, *S. mutans* and total oral lactobacilli, lower value of pure DMM pH and a higher mineral loss than the group without cariogenic challenge. Differences between groups (CF, ECC and S-ECC) could not be seen, except for DMM pH with sucrose for children ($p=0.005$) and for pure DMM pH ($p=0.004$) and for total aciduric counts ($p=0.037$) for mothers. A correlation was found between microcosm biofilms generated from children and their mothers' inoculums under cariogenic challenge. Therefore, within the limitations of this study, it is possible to conclude that microcosm biofilms growth from inoculums of children with or without severe ECC provide similar cariogenic response under regular sucrose exposure. Moreover, cariogenic challenge was crucial to correlate cariogenic response of microcosm biofilms between the inoculum of mothers and their children.

Keywords: Biofilm. In Vitro. Dental caries. Preschool Child. Demineralization.

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
1 Projeto	11
1.1 Antecedentes e justificativa.....	11
1.2 Objetivos.....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
1.3 Hipóteses.....	16
1.4 Metodologia.....	17
1.4.1 Parte I.....	17
1.4.1.1 Amostra.....	17
1.4.1.2 Entrevista.....	18
1.4.1.3 Inquérito alimentar.....	19
1.4.1.4 Exame clínico.....	19
1.4.1.4.1 Exame Clínico da Criança.....	19
1.4.1.4.2 Exame Clínico da Mãe.....	20
1.4.1.5 Análise da Saliva.....	20
1.4.2 Parte II (Estudo da resposta dos biofilmes ao desafio cariogênico). ..	22
1.4.2.1 Coleta da Saliva.....	22
1.4.2.2 Processamento da Saliva e Condições de Crescimento dos Biofilmes.....	22
1.4.2.3 Análise do crescimento dos Biofilmes e dos Perfis Microbianos... ..	23
1.4.2.4 Análise da perda mineral nos discos de esmalte.....	23
1.4.3 Tratamento estatístico.....	24
1.5 Orçamento.....	25
1.6 Cronograma.....	27
2 Relatório do trabalho de campo	28
2.1 Aspectos éticos.....	28
2.2 Amostra.....	28
2.3 Coleta dos dados.....	29
2.4 Análise da saliva.....	29
2.5 Biofilme.....	32
2.6 Considerações finais.....	33
3 Artigo	34
4 Conclusões	56
Referências	57
Apêndices	62
Anexos	74

1 PROJETO DE PESQUISA

1.2 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

A redução na experiência de cárie dentária é um evento que vem sendo observado mundialmente (MARTHALER, 2004; CAMPUS et al., 2007; GOYAL et al., 2007). No Brasil, a prevalência de cárie em crianças uma diminuição significativa nos últimos anos (NARVAI et al., 2000; TAGLIAFERRO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009). No entanto, a cárie permanece como uma doença comum na infância afetando uma proporção considerável de crianças com prejuízos severos para saúde geral e bucal (DECLERCK et al., 2008).

A cárie dentária está presente em todas as populações, porém existe uma grande variação na sua incidência não só dentro de uma população, como também entre populações (FEJERSKOV; BAELUM, 1998). Na Europa, por exemplo, a prevalência de cárie nas crianças aos cinco anos de idade é de 19,1% nas norueguesas, na Bélgica é de 30,8%, enquanto na Itália, uma diferença significativa é observada quando compararam crianças imigrantes e nativas, onde 75% e 34,2% respectivamente, apresentavam algum sinal de cárie (SKEIE et al., 2008; DECLERCK et al., 2008; FERRO et al., 2007). Outras regiões apresentam disparidade quanto à prevalência na mesma idade. No noroeste do Canadá a prevalência de cárie foi de 69% (LEAKE; JOZZY; USWAK, 2008) e na Arábia Saudita, Wyne (2008) relatou uma prevalência de cárie de 74,8%.

Adicionalmente, um enorme contraste geográfico é observado na distribuição da doença cárie aos 5 anos nas regiões brasileiras, onde as regiões sudeste e sul apresentam índices ceod (dentes decíduos cariados, extraídos ou obturados) mais baixos (2,50 e 2,62, respectivamente) que as demais regiões (centro-oeste, nordeste e norte com ceod de 2,67; 3,21 e 3,22, respectivamente) (SB 2002-2003, 2004).

Outro aspecto observado nas crianças é a tendência à polarização na distribuição da doença cárie, ou seja, uma proporção reduzida de indivíduos com os valores mais altos do índice ceod. Ferreira et al. (2007) demonstraram este fenômeno ao observar que 12% das crianças de 0 a 5 anos concentraram 82% dos

dentes cariados. Estes altos índices de cárie dentária e a variação na sua prevalência apresentam forte associação com fatores socioeconômicos, como a escolaridade materna e a renda familiar, comportamentais, culturais e políticos (DECLERCK et al., 2008; FEJERSKOV, 2004; KIWANUKA; ÅSTRØM; TROVIK, 2004; FERREIRA et al., 2007).

Quando a Cárie dentária acomete bebês tem sido chamada de Cárie na Primeira Infância (CPI) ou *Early Childhood Caries* (ECC), sendo considerada uma doença multifatorial com fatores de risco biológico, psicossocial e comportamental (WYNE, 1999). Do ponto de vista biológico, cárie é uma doença complexa causada por um desequilíbrio fisiológico entre os minerais do dente e o fluido do biofilme (FEJERSKOV; NYVAD, 2003); para a quebra do equilíbrio é necessária uma pressão ecológica como uma dieta rica em açúcar, condições de baixo pH ou redução do fluxo salivar (MARSH, 2006), decorrentes muitas vezes de alterações comportamentais ou mesmo psicossociais.

Neste processo é evidente a participação de microrganismos (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993) e a colonização inicial da cavidade bucal se dá durante e logo após o nascimento, uma vez estabelecidos os primeiros colonizadores sua presença tem um papel importante na defesa do hospedeiro (LI et al., 2005a). Porém, uma sucessão de bactérias aparece posteriormente, algumas acompanhando a erupção dos dentes, como os estreptococos do grupo mutans, (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; CAUFIELD et al., 2000) que apresentam evidências consideráveis de associação à doença cárie dentária (VAN HOUTE, 1994).

Considera-se que exista uma transmissão intrafamiliar deste microrganismo onde a mãe é a principal fonte de transmissão. Li e Caufield (1995) ao verificarem que o genótipo do *S. mutans* encontrado na cavidade bucal das crianças estudadas era idêntico em 71% aos presentes na cavidade bucal materna e que não havia semelhança genotípica entre pai e filho e nem entre marido e mulher, assim comprovaram ser a mãe a maior responsável pela aquisição inicial deste microrganismo pelas crianças.

Outras bactérias que, frequentemente, vêm sendo associadas à cárie, são os lactobacilos (COOGAN et al., 2008). Tanto os lactobacilos quanto os estreptococos do grupo mutans tem sido usados como indicadores de risco para cárie. No entanto, mais de 500 espécies microbianas têm sido identificadas na cavidade bucal (LI et al.,

2005b; MARSH et al. 2006). Assim, outros microrganismos têm sido investigados como potenciais contribuintes do processo cárie dentária e diversos pesquisadores têm sugerido o envolvimento de comunidades mais complexas de espécies bacterianas do que inicialmente se pensou (VAN HOUTE, 1994; BECKER et al., 2002).

É sabido que as bactérias representam apenas um único fator causal na etiologia multifatorial do processo cárie dentária, porém altos níveis bacterianos podem refletir condições de atividade de cárie causada por outros fatores etiológicos. Ollila e Larmas (2008), através de um estudo de coorte verificaram um incremento significativamente maior de cárie após 7 anos nas crianças com teste positivo para lactobacilos e cândida. Becker et al. (2002) utilizando métodos de identificação molecular, confirmaram a associação entre altos níveis de *S. mutans*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* e *S. salivarius* com a doença cárie.

Vários fatores podem predizer as crianças com maior propensão à cárie dentária como a contagem de bactérias na saliva, capacidade tampão e fluxo salivar, lisozimas salivares, número de dentes cariados e restaurados (ALALUUSUA et al., 1990; KIRSTILA et al., 1998; COOGAN et al., 2008). Além disso, tem-se investigado outros fatores de risco mais complexos envolvidos de forma indireta na etiologia da cárie na infância como fatores socioeconômicos, psicológicos e comportamentais (MELLO et al., 2008; PERES et al., 2005).

Entre estes fatores existem constatações de que a educação da mãe, seu CPO-S, experiência de cárie, seu comportamento para com sua saúde bucal e seus hábitos de higiene estão relacionados à saúde bucal de seu filho (ERSIN et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 1996; MATTILA et al., 2008; MATTILA et al., 2000; MOHEBBI et al., 2008; TUUTI et al., 1989). Esses dados corroboram a importância de aspectos adicionais à transmissão de microrganismos para o desenvolvimento de cárie durante a infância. Para isso, os fatores de risco e etiológicos envolvidos no processo cárie dentária, não só de cunho biológico, mas também comportamental, assim como a transmissão de hábitos familiares, devem ser estudados para que estratégias apropriadas possam ser empregadas.

O biofilme dental é o fator direto envolvido na etiologia da doença cárie, e a análise dos mecanismos que envolvem a sua formação e desenvolvimento pode auxiliar em um melhor entendimento do aparecimento e progressão da cárie dentária, assim como a definir o tratamento mais efetivo para a doença.

Adicionalmente, o emprego de modelos de formação de biofilme *in vitro* permite a análise de tais fatores com o controle de variáveis confundidoras, sendo considerado útil para simular condições bucais específicas que ocorrem clinicamente, como pressões ecológicas e desequilíbrios relacionados com a cárie.

Neste contexto, tem-se utilizado modelos de laboratório derivados de ecossistemas naturais com o intuito de simular as condições do ambiente da placa natural, os microcosmos (SISSONS et al., 2007). Esses biofilmes de microcosmos se assemelham ao biofilme natural, e permitem sobrepujar muitas das dificuldades normalmente encontradas quando o biofilme é estudado *in vivo* (aspectos éticos, dificuldade na interpretação dos resultados) (SISSONS, 1997; MCBAIN et al., 2003). Além disso, a reprodutibilidade de tais sistemas tem sido demonstrada (RASIAH et al., 2005; FILOCHE et al., 2007). Para Dalwai, Spratt e Pratten (2006) os modelos *in vitro* de comunidades microbianas associados com saúde e doença são ferramentas valiosas para observar os fatores-chave na instalação da doença cárie.

A aquisição de bons hábitos desde a infância tende a refletir em uma boa saúde bucal no futuro (MELLO et al., 2008), e diante do conhecimento do papel da mãe não só como transmissora de bactérias, mas também como a principal multiplicadora de modelos, hábitos, valores e atitudes perante o seu filho tornam-se necessários estudos que demonstrem tal relação. Esses fatores - hábitos, modelos, valores e atitudes transmitidos pela família e em especial as mães - podem ser tão ou mais importantes do que a transmissão de microrganismos para a iniciação e desenvolvimento da doença cárie, sendo essa a justificativa para a realização deste trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento de biofilmes formados a partir de salivas coletadas de crianças com ou sem cárie e de suas respectivas mães; e avaliar a relação entre cárie dentária em crianças e a transmissibilidade microbiana e de hábitos familiares.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Comparar os perfis microbianos gerados por diferentes tipos de saliva, em pares mãe-filho agrupados da seguinte forma: livres de cárie; experiência passada de cárie; ECC tipo I (baixa severidade de cárie) de Wyne (1999) e ECC tipo III (alta severidade de cárie) de Wyne (1999).

1.2.2.2 Verificar *in vitro* (modelo de biofilme a partir de microcosmos) os efeitos da exposição ou não à sacarose em biofilmes desenvolvidos a partir da microbiota obtida dos quatro grupos e suas respectivas mães;

1.2.2.3 Discutir, a partir dos resultados obtidos com os dois tratamentos (com e sem desafio cariogênico), a relevância da transmissibilidade de hábitos no desenvolvimento da cárie dental em crianças.

1.2.2.4 Avaliar a reprodutibilidade e a viabilidade do modelo de biofilmes proposto para testar hipóteses relacionadas ao estudo da cárie dentária em crianças.

1.3 HIPÓTESES

As seguintes hipóteses serão testadas:

1.3.1 Os padrões bacterianos serão divergentes entre os pares mãe-filho com diferentes condições bucais referentes ao processo cárie dentária.

1.3.2 Frente ao desafio cariogênico, todos os biofilmes formados a partir da saliva dos pares mãe-filho causarão perda mineral e apresentarão maiores proporções de bactérias acidúricas e acidogênicas do que biofilmes não submetidos ao desafio.

1.3.3 Não haverá diferença em termos de cariogenicidade entre biofilmes formados a partir de saliva de crianças com alta severidade de cárie comparada às crianças sem severidade.

1.3.4 A semelhança entre o perfil microbiano de mães e filhos seria resultado não apenas da transmissão de microrganismos, mas também estaria associado aos hábitos familiares.

1.4 METODOLOGIA

1.4.1 PARTE I

Constará da seleção de pares mãe-filho dos quais serão coletados os dados pessoais, história médica e relacionados aos hábitos alimentares, hábitos de higiene, condição da cavidade bucal através de entrevista, inquérito alimentar, exame clínico e salivar.

1.4.1.1 Amostra

Farão parte do estudo doze crianças com idades entre 48 e 71 meses de ambos os sexos e suas respectivas mães, a partir de consentimento livre e esclarecido. As crianças apresentarão diferentes condições bucais referentes ao processo cárie dentária e serão selecionadas três crianças para cada um dos quatro grupos de acordo com a experiência, atividade e severidade de cárie conforme classificação na Figura 1.

Estas crianças serão selecionadas da lista de triagem para atendimento na disciplina de Unidade de Clínica Infantil II da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel) e como critério de seleção nem a mãe nem a criança poderão estar sob tratamento com antimicrobianos.

Implicações éticas

Após aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO-UFPel e com a anuência das mães, depois de esclarecidos os objetivos e procedimentos que serão realizados, com explicação completa e pormenorizada da natureza da pesquisa, elas assinarão, com garantia do sigilo dos dados e esclarecidas de que sua decisão em participar ou não é livre e não acarretará nenhum comprometimento ao tratamento odontológico do seu filho na FO-UFPel, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) conforme explicitado no capítulo IV da resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 196/96 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

As crianças e as mães da amostra receberão orientação para o autocuidado com a saúde bucal, higiene efetiva e consumo racional de açúcar, após terminada a parte 1 da pesquisa e coletada a saliva para o crescimento do biofilme para não haver interferência no estudo. As crianças serão pacientes das Unidades de Clínica

Infantil I e II, para manter a condição de saúde ou para receber educação e reabilitação bucal. As mães serão esclarecidas quanto às suas necessidades bucais, quando estas existirem, e encaminhadas para o Serviço Central de Triagem da Faculdade de Odontologia para receberem atendimento. Casos de urgência serão atendidos pelos pesquisadores participantes da pesquisa.

Figura 1. Classificação dos grupos com os respectivos critérios de inclusão.

Classificação	Crítérios
Grupo I (livres de cárie) ceos 0	Crianças com todos os dentes hígidos, hipoplásicos ou fraturados; ausência dentária por trauma ou outro fator que não seja doença cárie.
Grupo II (experiência passada de cárie)	Crianças com dentes apresentando: mancha branca inativa, cavidade em esmalte e/ou dentina com característica de inatividade (dentina de cor marrom escura ou preta, seca e dura); restaurações de resina composta, amálgama ou cimento de ionômero de vidro sem sinal de lesão de cárie adjacente as restaurações e/ou manchas brancas ativas; ausência dentária por cárie dentária ou outro fator.
Grupo III (ECC tipo I de WYNE, 1999)	Lesões isoladas de cárie envolvendo 1 ou 2 molares e/ou incisivos (WYNE, 1999) com as seguintes características: mancha branca ativa, cavidade em esmalte e dentina com característica de atividade (dentina de cor amarelo claro acastanhado, úmida e de mole a média dureza); restaurações de resina composta, amálgama ou cimento de ionômero de vidro sem ou com sinal de lesão de cárie adjacente as restaurações e/ou manchas brancas ativas; ausência dentária por cárie.
Grupo IV (ECC tipo III de WYNE, 1999)	Lesões de cárie afetando quase todos os dentes incluindo os incisivos inferiores. (WYNE, 1999) com as seguintes características: mancha branca ativa, cavidade em esmalte e dentina com característica de atividade (dentina de cor amarelo claro acastanhado, úmida e de mole a média dureza); restaurações de resina composta, amálgama ou cimento de ionômero de vidro sem ou com sinal de lesão de cárie adjacente às restaurações e/ou manchas brancas ativas; ausência dentária por cárie.

1.4.1.2 Entrevista

A entrevista contendo 63 questões semi-estruturadas e abertas (APÊNDICE B), testadas previamente para avaliar se estão compreensíveis, será executada por um

único entrevistador treinado, dirigido às mães, contendo dados de identificação da mãe e da criança, demográficos e sócio-econômicos, além do histórico médico e odontológico da criança e da mãe e questões relacionadas à qualidade de vida.

1.4.1.3 Inquérito alimentar

Serão coletados dados dos pares mãe-filho. O método que será utilizado para obter informações da dieta será baseado no diário alimentar de acordo com Beighton (1996), ou seja, um relatório de três dias consecutivos (da rotina habitual) preenchidos pela mãe no domicílio (APÊNDICE C). Após, uma entrevista com o propósito de esclarecer e assegurar perfeição do registro será conduzida por um único entrevistador treinado. Este inquérito tem como objetivo fornecer informações sobre a frequência diária de alimentos cariogênicos, lanches entre as refeições, qualidade e consistência dos alimentos, hábitos de alimentação noturna (como mamadeira), dentre outros e será avaliado de acordo com o proposto por Noronha (2005) (ANEXO A).

1.4.1.4 Exame Clínico

As crianças e suas mães serão examinadas por um único examinador, treinado e calibrado (Kappa mínimo de 0,70). As sessões de calibração consistirão no exame de crianças da mesma idade e de adultos, não participantes do estudo, seguindo a mesma metodologia. Os exames serão conduzidos na clínica com luz artificial, ar comprimido, espelhos dentais, rolos de algodão e sonda (preconizada pela Organização Mundial da Saúde) (SKEIE et al., 2008).

1.4.1.4.1 Exame Clínico da Criança

Para avaliar a condição de higiene bucal serão utilizados o índice de placa visível (IPV) e Índice de Sangramento Gengival (ISG). O cálculo do IPV será realizado de acordo com o critério sugerido por Ainamo e Bay (1975) para o qual o biofilme visível clinicamente, em cada face do dente, recebe o escore 1 e a ausência de biofilme detectável clinicamente recebe o escore 0. O índice será obtido somando-se os números de superfícies com biofilme visível, dividindo-se pelo total de superfícies avaliadas e multiplicando-se por 100. O ISG desenvolvido por Løe & Silness (1963) citado por Løe, Theilade e Jensenet (1975), o qual avalia a severidade da inflamação gengival, será utilizado onde cada face receberá um

escore de 0 a 3 que dependerá da aparência da gengiva e da presença ou não de sangramento. (APÊNDICE D).

Para verificar a condição dentária será utilizado o índice ceos (número de superfícies dentárias decíduas cariadas, perdidas e obturadas) modificado em que serão considerados os estágios iniciais da doença cárie, sendo o exame dos dentes conduzido utilizando o sistema ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS), conforme descrito nos apêndices D e E.

1.4.1.4.2 Exame Clínico da Mãe

Para avaliar a higiene bucal e inflamação gengival será empregado o Índice de Placa Visível (IPV) de Silness & Løe (1964) e o Índice de Sangramento Gengival (ISG) de Løe & Silness (1963). Para a condição dentária, será utilizado o mesmo critério usado na criança registrando o índice de superfícies permanentes cariadas, perdidas ou obturadas (CPO-S modificado) (APÊNDICE E).

1.4.1.5 Análise da Saliva

-Fluxo Salivar

As amostras de saliva dos doadores serão coletadas sob supervisão de um profissional em ambiente de consultório após, no mínimo, 2 horas da última refeição sempre pela manhã entre 9-12h (FARSI, 2008). Inicialmente, saliva não estimulada será coletada por 15 minutos em um copo plástico estéril pré-pesado. Após, a saliva será estimulada mecanicamente com o uso de papel parafinado (Parafilm "M"[®], American National CanTM, Chicago, IL, EUA) e será coletada durante 5 minutos em um novo copo plástico estéril pré-pesado. O volume final de saliva será calculado após nova pesagem dos copos contendo saliva, pela subtração do peso inicial. Os dados serão registrados em grama de saliva por minuto, medida equivalente a mL/min (BARDOW et al., 2008).

-pH

O pH será medido da saliva estimulada e não estimulada usando um pHmetro digital, usando a quantidade de 1,0 mL de saliva que será colocada sob o eletrodo para a medição. Serão aguardados 30 segundos até estabilizar a leitura. A precisão do

pHmetro será conferida em intervalos regulares com soluções tampão para assegurar que a leitura estará correta.

-Composição da Microbiota

A composição microbiana será determinada a partir de amostras de saliva estimulada para cada voluntário (mães e filhos). Aproximadamente 1 mL será coletado, e as amostras serão diluídas serialmente em RTF (meio de transporte reduzido) em séries até $1:10^5$ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Agar sangue para contagem de microrganismos totais; agar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans; Agar Rogosa SL para lactobacilos e BHI (brain-heart infusion) com pH ajustado a 4,7 para quantificação de microrganismos totais acidúricos.

As placas serão incubadas em anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) a 37° C por 120 h. As unidades formadoras de colônia (UFC) serão contadas e os resultados expressos em UFC/mL e em porcentagem de estreptococos do grupo mutans, porcentagem de lactobacilos, porcentagem de leveduras e porcentagem de microrganismos acidúricos totais em relação aos microrganismos totais cultiváveis.

1.4.2 PARTE II (Estudo da resposta dos biofilmes ao desafio cariogênico)

1.4.2.1 Coleta da Saliva

Aproximadamente 5 mL de saliva estimulada por papel parafinado (Parafilm "M"[®], American National CanTM, Chicago, IL, EUA) será coletada dos 3 pares mãe-filho de cada grupo, somando 24 amostras. Estes deverão abster-se de higiene oral por 24h (FILOCHE et al., 2007). A saliva será armazenada em recipiente estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia da FO-UFPel.

1.4.2.2 Processamento da Saliva e Condições de Crescimento dos Biofilmes

A partir da coleta da saliva (microcosmos) serão formados biofilmes em placas de micro-poços sobre discos de esmalte bovino com microdureza pré-determinada. Serão realizados 2 experimentos independentes em tempos diferentes, com 3 amostras de saliva para cada voluntário em cada experimento. Os fatores em estudo serão: origem da saliva em dois níveis (mães e filhos); tipos de saliva de acordo com os grupos/experiência de cárie de crianças previamente selecionadas e suas respectivas mães em 4 níveis (descritos acima); a presença de substrato fermentável em 2 níveis (com e sem desafio cariogênico).

Para simular os fluidos orais um meio de cultura semi-definido contendo íons, mucina, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento (DMM) será utilizado (WONG; SISSIONS, 2001). Esse meio de cultura será suplementado com 0,5% de sacarose para promover desafio cariogênico, ou 0,15% de sacarose (ou glucose) para crescimento sem desafio cariogênico (FILOCHE et al., 2007).

A saliva coletada será filtrada em lã de vidro estéril e homogeneizada. Serão inoculados 400 µL sobre cada disco de esmalte estéril dentro de micro-poços em placas de 24 poços. Serão realizadas 3 repetições para cada doador (saliva)/experimento. Após 1h a saliva será cuidadosamente aspirada do fundo dos poços e a cada poço serão adicionados 1,8 mL de meio de cultura (DMM). As placas de micro-poços serão incubadas em uma atmosfera de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) por 10 dias a 37° C sem movimentá-las (WONG; SISSIONS, 2001). O meio de cultura (DMM) será substituído diariamente e os poços suavemente agitados. O sobrenadante será removido de cada um e serão registrados os valores

do pH (FILOCHE et al., 2007). Os biofilmes serão cultivados por 10 dias, e então os espécimes serão coletados para avaliação microbiana e da perda mineral.

1.4.2.3 Análise do crescimento dos Biofilmes e dos Perfis Microbianos

Além da mensuração do pH, será medido o crescimento através do peso úmido (mg). Após 10 dias de crescimento os discos de esmalte serão removidos dos poços e o biofilme aderido foi coletado e depositado em micro-tubos pré-pesados contendo esferas de vidro estéreis e novamente pesados para quantificação do volume de RTF (meio de transporte reduzido) (1 mL/mg de biofilme, p/v) a ser adicionado. Após homogeneização em vortex por 2 minutos as suspensões serão diluídas em RTF em séries até 1.10^6 e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Agar sangue para quantificação de microrganismos totais; agar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans; Agar Rogosa SL para lactobacilos e BHI (brain-heart infusion) com pH ajustado a 4,7 para quantificação de microrganismos totais acidúricos.

As placas de meio inoculadas serão incubadas em anaerobiose a 37° por 96h. As unidades formadoras de colônia (UFC) serão contadas e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso úmido) e em porcentagem de estreptococos do grupo mutans, porcentagem de lactobacilos e porcentagem de microrganismos acidúricos totais em relação aos microrganismos totais cultiváveis. Após remoção da alíquota da suspensão microbiana inicial (original) para quantificação, o espécime será removido da suspensão e esta será centrifugada. O sobrenadante será desprezado e o precipitado será armazenado a -80°C para análises futuras.

1.4.2.4 Análise da perda mineral nos discos de esmalte

Após cada fase experimental a microdureza da superfície do esmalte dos discos submetidos a cada um dos dois tratamentos será mensurada novamente e uma média para cada doador será calculada. Estas análises serão realizadas de acordo com Cury et al. (2000) e a mudança da microdureza da superfície será calculada em porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS). Depois da

análise da mudança da microdureza, todos os discos serão seccionados longitudinalmente no centro para determinar a microdureza da secção longitudinal (CSMH). Esta determinação será realizada de acordo com Cury et al. (2000), mas com as endentações serão realizadas em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μm na superfície externa do esmalte. Os valores de CSMH serão utilizados para o cálculo da área integrada de desmineralização (ΔS) para cada tratamento (SOUSA et al., 2009). As análises serão realizadas com um microdurômetro Future-Tech FM acoplado a um endentador Knoop e uma carga de 50 g ou 25 g por 5 s, para %PDS e CSMH, respectivamente.

1.4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos na entrevista serão submetidos à análise qualitativa, os demais serão inicialmente submetidos à análise exploratória para determinação do método estatístico adequado para cada parte do estudo. Para todos os testes será considerado o valor $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os voluntários serão considerados como unidades experimentais e blocos estatísticos, a fim de diminuir a variabilidade do experimento.

1.5 ORÇAMENTO

Item	Descrição	Quant.	Preço Unitário (R\$)	Total (R\$)
1	Luvas de procedimentos	3 cx	15,00	45,00
2	Máscara	3 cx	10,00	30,00
3	Meio de cultura DMM	-	4610,90	4610,90
4	Agar Mitis Salivarius c/ 500g, Acumedia	2 un	204,50	409,00
5	Rogosa SL Agar c/ 500g, Difco cód, 0480-17	1 un	1228,80	1228,80
6	Agar cérebro e coração c/ 500g, Acumedia	2 un	155,05	310,10
7	Placa de petri descartável 90 x 15mm c/ 10, J, Prolab	50 pct	1,99	99,50
8	Sacarose	2 un	8,55	17,10
9	Ponteira cor amarela 20 a 200µl pct, c/ 1000, Axygen T200Y	5 un	26,94	134,70
10	Ponteira cor azul 100 a 1000µl pct, c/ 1000, Axygen T1000-B	5 un	29,05	145,25
11	Tubo microcentrífuga (eppendorf) 1,5 mL c/ 1000	5 un	19,60	98,00
12	Jarra p/ anaerobiose em PVC rígido cap, 3,5Lt, Mod, JA0401, Permutation	5 un	210,00	1.050,00
13	Anaerobac c/ 10, Probac	2 cx	105,60	211,20
14	Telurito de potássio c/ 25g	1 un	311,00	311,00
15	Micropipeta monocanal vol, Variável 2 a 20µl, mod, LM-20, HTL	3 un	268,00	804,00
16	Micropipeta monocanal vol, Variável 20 a 200µl, mod, LM-200, HTL	1 un	268,00	268,00
17	Micropipeta monocanal vol, Variável 100 a 1000µl, mod, LM-1000, HTL	1 un	283,00	283,00
18	Ponteira cor amarela 20 a 200µl pct, c/ 1000, Axygen T200Y	3 pct	38,90	116,70
19	Ponteira cor azul 100 a 1000µl pct, c/ 1000, Axygen T1000-B	3 pct	41,90	125,70
20	Rack c/ 96 ponteiros 20 a 200µl, Axygen	4 cx	8,99	35,96
21	Rack c/ 96 ponteiros 100 a 1000µl, Axygen	4 cx	11,88	47,52
22	Placa p/ cultura de tecidos fundo chato c/ tampa estéril 24 poços, TPP	100	4,64	460,40
23	Filtro p/ seringa 0,22 µm, área de filtração 6cm ² dim, 27mm x 33mm, TPP	20 un	4,40	88,00
24	Frasco p/ reagente em vidro transparente graduado, c/ tampa azul rosqueavel autoclavavel cap, 250ml, Boeco	2 un	12,99	25,98
25	Frasco p/ reagente em vidro transparente graduado, c/ tampa azul rosqueavel autoclavavel cap, 500ml, Boeco	2 un	16,05	32,10
26	Frasco p/ reagente em vidro transparente graduado, c/ tampa azul rosqueavel autoclavavel cap, 1000ml, Boeco	4 un	22,60	90,40
27	Placa de petri descartável 90 x 15mm c/ 10, J, Prolab	20	1,99	39,8
28	Proveta graduada de vidro c/ base hexagonal plástica cap, 500ml, Satelit	2 un	28,60	57,20
29	Proveta graduada de vidro c/ base hexagonal plástica cap, 1000ml, Satelit	1 un	38,20	38,20
30	Sacarose, frascos com 1 Kg	2 fras	10,70	21,40
31	Bacitracina (para microbiologia) Purex 5g, Inlab	1 un	399,80	399,80

32	Tubos tipo Falcon 15 mL c/50	5 cx	30,00	150,00
33	Tubos tipo Falcon 50 mL c/50	5 cx	30,00	150,00
34	Sonicador Sonifier Modelo 250 Digital 200 Watts/110V	1 un	20500,00	20500,00
35	Congressos (SBPqO, ORCA, ...)	2	-	5000,00
36	Papel (1 pacote com 500 unidades)	1 pct	12,00	12,00
37	Despesas ressarcimento voluntários	24	50,00	1200,00
TOTAL R\$			38.646,71	

Fontes de financiamento

PRODOC/ CAPES (R\$12.000,00 ano); Edital Universal/ CNPQ (R\$19.986,00); recursos dos pesquisadores.

2 RELATÓRIO TRABALHO DE CAMPO

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças metodológicas realizadas no decorrer do desenvolvimento da pesquisa e aspectos relevantes ocorridos durante a coleta de dados. Os demais aspectos metodológicos podem ser consultados no projeto original no capítulo anterior. O relatório também apresenta dados que não foram utilizados na elaboração do artigo, mas que auxiliarão o seu entendimento.

2.1 Aspectos Éticos

O Projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel) sob o parecer n 064/2008. Os sujeitos da pesquisa ou seus responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

2.2 Amostra

A amostra foi selecionada em setembro de 2009 durante a triagem para 150 vagas na Unidade de Clínica Infantil II da FO-UFPel. Destas, 22 crianças foram pré-selecionadas de acordo com sua idade (48-71 meses) e examinadas por um único avaliador. Se a criança não apresentasse nenhuma resistência ao exame o telefone era coletado para contato posterior. Desta pré-seleção, nove pares de mãe-filho foram chamados de acordo com a condição de cárie da criança seguindo os critérios de Drury et al. (1999), alterado do projeto devido a ausência de crianças que se enquadravam no critério de Wyne (1999) para cárie severa, no qual o(s) incisivo(s) inferior(e)s deveria(m) apresentar lesão de cárie. Outra alteração foi que o grupo experiência passada de cárie foi eliminado do estudo, visto que na amostra pré-selecionada não havia o mínimo de 3 crianças com esta condição.

Assim, os grupos foram classificados da seguinte maneira de acordo com os critérios de Karjalainen et al. (2001):

I=Livres de cárie (LC): ceos =0 (n=3)

II=Baixa severidade de cárie (CPI): ceos=1-4 (n=3)

III=Cárie severa (CPI-S): ceos \geq 4 (n=3)

2.3 Coleta dos dados

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto para padronizar a entrevista e a coleta dos dados clínicos. A calibração de um único profissional (pós-graduando em odontopediatria), o qual realizou os exames e a entrevista, constou de um treinamento teórico dos critérios de diagnóstico e o exame de clínico de 3 pares mãe/filho. O valor médio do coeficiente kappa, calculado comparando com o padrão ouro (um professor especialista/doutor), foi de 0,83 para o IPV, de 0,89 para o ISG e 0,91 para o ceos modificado conforme ICDAS (ISMAIL et al., 2008) para a criança; e de 0,85, 1,0 e 0,97 para IPV, ISG e CPOS modificado, respectivamente, para a mãe.

Para orientar na descrição das variáveis e na associação entre os fatores de risco, com base nos dados coletados na entrevista, diário alimentar e exames clínicos foi construído o modelo hierárquico entre cárie na infância e sua transmissibilidade (Fig. 1).

Os dados coletados no exame clínico, dados de análise da saliva e alguns dados da entrevista e diário alimentar foram reunidos de acordo com os grupos e apresentados na Tab. 1.

2.4 Análise da saliva

Com relação ao fluxo salivar, a metodologia foi parcialmente alterada pela dificuldade encontrada com as crianças em coletar saliva durante longo período de tempo. Dessa forma, saliva estimulada por papel parafinado (Parafilm "M"®, American National Can™, Chicago, Illinois, EUA) foi coletada em tubos estéreis pré-pesados, a saliva produzida no primeiro minuto foi desprezada e durante os 5 minutos subseqüentes toda saliva foi coletada. O fluxo salivar foi calculado somente para saliva estimulada. Conseqüentemente, o pH também foi somente mensurado da saliva estimulada.

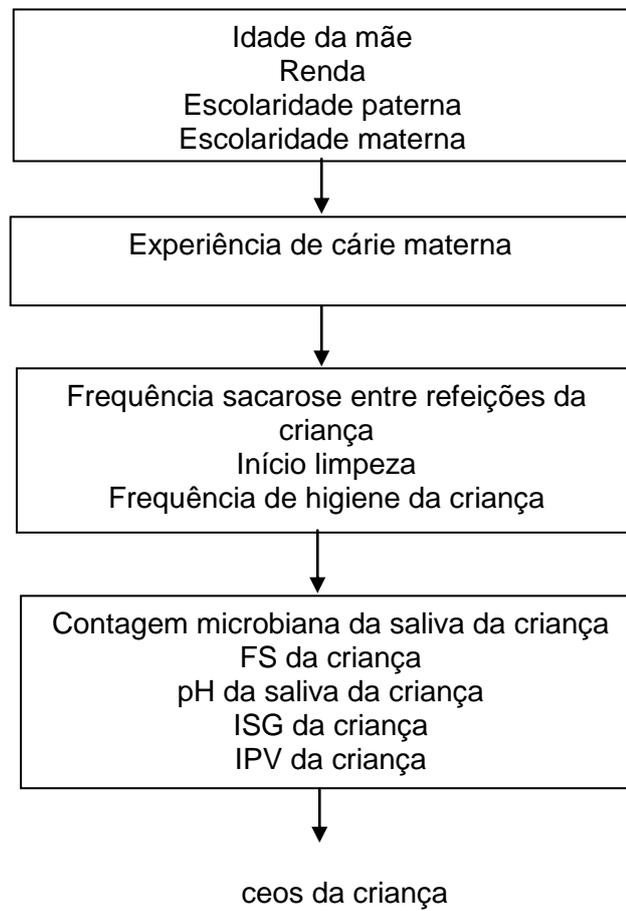


Figura 1. Ilustração do modelo de avaliação dos fatores avaliados e envolvidos no processo cárie

Tabela 1. Média das características clínicas, comportamentais e sócio-demográficas e *baseline* da saliva das crianças e suas mães de acordo com grupo, Pelotas, RS, 2010.

Criança X Mãe	Desfecho	Grupo da criança			
		LC (I)	CPI (II)	CPI-S (III)	
Criança	ceos	0	5,3	26,7	
	Superfície cariada	0	5,3	24,3	
	Mancha branca por superfície	0	1,33	2,67	
	ceod	0	2	10	
	Dente cariado	0	2	9,3	
	IPV (%)	3,6	7,3	4,8	
	ISG	0	0	0,06	
	FS	0,4	0,7	0,4	
	pH saliva	7,9	8,0	8,0	
	Contagem microbiana				
	Microorganismos totais*	8,4	7,9	7,9	
	Totais acidúricos*	7,6	7,8	7,3	
	<i>S. mutans</i> *	5,0	5,2	6,3	
	Lactobacilos*	6,1	6,6	6,3	
	Frequência de higiene	3	2,33	2,33	
	Início limpeza criança (meses)	2,3	6,3	14,7	
	Sacarose entre refeições	4	5,3	3,2	
	Escolaridade materna (anos)	11,3	9,3	9,3	
	Escolaridade paterna (anos)	11	10,3	9	
	Mãe	IPV (%)	16,0	31,9	30,9
ISG		0,04	0,04	0,13	
CPOS		58,7	53,7	8,3	
Superfície cariada		0	8,3	0,7	
Mancha branca por superfície		0	0	1	
CPOD		17	16,7	4	
Dente cariado		0	2,6	0,7	
FS		1,5	1,1	2,6	
Contagem microbiana					
pH saliva		7,8	7,8	7,8	
Microorganismos totais*		8,1	7,9	8,1	
Totais acidúricos*		7,1	7,3	7,4	
<i>S. mutans</i> *		6,4	5,7	6,3	
Lactobacilos*		5,6	5,8	5,2	
Sacarose entre refeições		2	3,2	2,4	
Renda (salário mínimo)		3,1	2,3	1,2	
Idade (anos)	38,3	37,7	27,7		

* log 10

2.5 Biofilme

Foi utilizado um modelo de biofilme *in vitro* descrito por Filoche, Soma e Sissons (2007) com modificações. Estas modificações foram testadas em um estudo prévio (Van de SANDE, 2009) onde biofilmes foram formados sobre discos de esmalte bovino tendo como inóculo saliva humana. Um meio definido enriquecido com mucina (DMM) foi empregado (WONG; SISSONS, 2001). Diversos fatores foram analisados para se determinar um modelo capaz de reproduzir um desafio cariogênico com padrão de resposta semelhante aos modelos de estudo *in situ*. Foram testadas diversas concentrações de sacarose, tempo de crescimento e regime de suplementação de sacarose (com e sem desafio cariogênico). As análises foram compostas por: aferições diárias de pH; determinação de desmineralização por microdureza de superfície; composição microbiológica do biofilme (diluição e plaqueamento).

Dessa forma, determinou-se que o padrão de resposta adequado para promover desafio cariogênico neste estudo foi o modelo de biofilme *in vitro* onde o meio DMM tinha concentração de 1% de sacarose, em um modelo semi-dinâmico, por um período de crescimento de 10 dias. O DMM puro foi determinado como controle (sem desafio cariogênico). As concentrações de sacarose no meio foram diferentes do previsto porque o estudo piloto foi realizado posteriormente à qualificação do projeto original.

Foram realizadas 3 repetições para cada doador em cada uma das condições do meio, resultando em crescimento de 108 biofilmes independentes.

O grupo com desafio cariogênico ficou incubado em anaerobiose por 6h com o DMM com 1% de sacarose. Após este período, uma nova troca foi realizada com um enxágüe prévio com solução salina estéril e a inoculação do meio DMM puro, o qual permanecia nas 18h seguintes também em anaerobiose, com trocas diárias.

Após 10 dias de crescimento o biofilme aderido foi coletado e adicionou-se o volume de RTF (meio de transporte reduzido) (1 mL/mg de biofilme, p/v) determinado. Após homogeneização em vortex a solução foi serialmente diluída em RTF em séries de até 1.10^6 e imediatamente inoculadas em duplicata nos meios de cultura descritos no projeto.

Além da identificação das colônias através de sua morfologia. Colônias características de estreptococos mutans foram transferidas para tubos contendo o

meio Triptona Soja Caldo (TSB), incubadas a 37°C por 48 horas e fez-se a identificação bioquímica baseada na fermentação do manitol, sorbitol, rafinose e melibiose (SHKLAIR; KEENE,1974).

Tabela 2. Média por grupo da contagem microbiana do biofilme (\log_{10}) sob as duas condições de crescimento

Grupos	Sem desafio cariogênico				Com desafio cariogênico				
	Totais	Acidúricos	S. mutans	Lactobacilos	Totais	Acidúricos	S. mutans	Lactobacilos	
Filhos	LC	6,67	5,74	1,75	4,64	6,45	5,66	3,85	5,20
	CPI	6,33	4,59	3,63	1,00	6,93	5,77	3,98	5,68
	CPI-S	6,60	6,00	2,42	2,60	6,92	6,66	5,08	5,63
Mães	LC	6,70	4,92	2,42	2,63	7,36	5,87	4,07	5,43
	CPI	7,23	5,33	3,54	4,01	7,16	6,38	4,88	5,61
	CPI-S	6,48	4,62	3,58	4,13	7,09	6,68	4,73	6,26

Após a coleta de biofilme, os discos de esmalte foram submetidos à nova leitura de dureza de superfície para o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície. A dureza interna não foi realizada até o momento.

2.6 Considerações finais

Embora o projeto tenha sofrido algumas alterações em sua metodologia, estas não prejudicaram o seu desenvolvimento. Pelo contrário propiciaram melhora na qualidade do estudo.

3 ARTIGO

Título: § Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães

Autores:

Azevedo, Marina Sousa. Cirurgiã-dentista, aluna do Mestrado em Odontopediatria. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Romano, Ana Regina. Doutora em Odontopediatria. Professora do Departamento de Odontologia Social e Preventiva, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Cenci, Maximiliano Sergio. Doutor em Cariologia. Professor do Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

*** Autor para correspondência:** Marina Sousa Azevedo

Endereço: Rua Carlos Gomes, 23 CEP 96.055-450 Pelotas/RS/Brasil

Telefone: 53- 92410477/53- 32734101

e-mail: marinasazevedo@hotmail.com

Contagem de palavras: 3309

Número de tabelas e figuras: 6

Resumo

Biofilmes gerados a partir da saliva de crianças sem e com cárie na primeira infância: resposta ao desafio cariogênico e correlação com os de suas mães

Objetivo: Testar se biofilmes de microcosmo crescidos a partir do inóculo de crianças sem e com cárie na primeira infância (CPI) dariam a mesma resposta cariogênica sob exposição regular de sacarose, em modelo de biofilme padronizado. Comparar os biofilmes de microcosmos formados da saliva das crianças com de suas mães.

Métodos: Os biofilmes foram iniciados a partir da saliva de 3 doadores para cada grupo de crianças: livres de cárie (LC), CPI (CPI) e CPI severa (CPI-S) e de suas mães. Foram crescidos, em triplicata (n= 108) sobre discos de esmalte bovino em saliva artificial enriquecida com mucina (DMM), com e sem sacarose, sob um regime semi-dinâmico. As variáveis foram: pH dos sobrenadantes, composição microbiana do biofilme e porcentagem de microdureza de superfície (%PDS), analisadas de forma independente para grupo e condição utilizando ANOVA duas vias e Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para comparar os biofilmes dos filhos e de suas mães.

Resultados: A condição de desafio cariogênico mostrou: maior contagem de acidúricos totais, *S. mutans* e lactobacilos totais, valores mais baixos de pH do DMM e maior perda mineral independente do grupo do doador, exceto pH do DMM para as crianças CPI-S ($p=0,005$). Houve correlação entre os biofilmes das crianças e de suas mães na condição de desafio cariogênico.

Conclusão: O crescimento de biofilme de microcosmos originados a partir do inóculo de crianças com e sem CPI promovem resposta cariogênica similar sob exposições regulares de sacarose. Além disso, a presença do desafio cariogênico foi determinante para existência de correlação na resposta cariogênica no biofilme de microcosmos entre o inóculo de mães e seus filhos

Introdução

Cárie é definida como uma doença infecciosa e crônica, sendo uma das doenças mais prevalentes em seres humanos (1). Quando a cárie acomete bebês e crianças pré-escolares é chamada de Cárie na primeira infância (CPI) (2) e sua incidência varia não só dentro de uma população, como também entre populações (3). Na Europa a prevalência de cárie nas crianças aos cinco anos de idade varia de 19,1% a 75% dependendo da população estudada (4,5), enquanto no Brasil, a prevalência nesta mesma faixa etária é de 40% (6).

Várias linhas de evidências sugerem fortemente que a infecção precoce por estreptococos do grupo mutans (EGM) é um dos importantes fatores predisponentes da CPI (7-9). O principal reservatório de quem a criança adquire os EGM é a mãe (10,11), porém pode ser adquirido de outras fontes humanas e a aquisição pode ocorrer via transmissão vertical ou horizontal. Assim, as práticas destinadas a minimizar a transmissão materna de EGM para a criança podem não ser eficazes na prevenção de CPI (12). Altos níveis salivares de *S. mutans* nas mães têm sido relacionados com maior número de crianças com cárie (13). Também foi verificado que o nível quantitativo de *S. mutans* salivar estava, de forma significativa, relacionado com o índice de cárie nas mães (13,14).

Além disso, fatores genéticos, comportamentais, culturais, sociais e ambientais têm sido apontados como fatores etiológicos da cárie dentária (15-18), porém a causa direta são os microrganismos pertencentes à microflora oral residente, os quais são organizados em comunidades complexas, o biofilme (19).

A transição na composição da placa entre condição de saúde e doença é impulsionada por uma resposta dos membros da comunidade microbiana às alterações ambientais, resultando na seleção de componentes previamente presentes em menor quantidade na microflora (20). No entanto, ainda é necessário compreender o grau com que o ambiente nutricional e físico-químico do biofilme influencia no desenvolvimento da placa e para isso modelos de biofilme são usados para responder a questões específicas relacionadas à cárie (21-23).

Biofilmes de monocultura e biofilmes formados a partir de consórcios constituídos por uma pequena diversidade de espécies, não representam a complexidade e diversidade da placa natural. No entanto, a cultura de biofilme de

microcosmos derivados da microflora oral natural parece refletir a complexidade, a diversidade e heterogeneidade das placas *in vivo* (22,23).

Indivíduos diferem quanto ao seu ambiente bucal e a composição de sua microbiota também é intrinsecamente diferente, sendo que, estas diferenças persistem durante o desenvolvimento de placas complexas originadas de microcosmos (23,24). Também, as respostas da microbiota da placa, formação de biomassa e do pH à suplementação de sacarose têm se mostrado diferentes entre as pessoas (23,25). Isto sugere que o indivíduo pode ter diferenças na progressão da cárie e no resultado ao tratamento, de acordo com o grau de responsividade à sacarose. No entanto, o quanto estas diferenças individuais afetam a resposta do biofilme cariogênico em modelos de biofilme não é ainda completamente compreendido.

Não há registro na literatura sobre como biofilmes formados a partir do inóculo de crianças com e sem CPI e de suas mães respondem a um mesmo desafio cariogênico sob um modelo controlado de biofilme *in vitro*, especialmente por não haver registro na literatura, pode auxiliar nestes esclarecimentos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que biofilmes de microcosmo crescidos a partir do inóculo de crianças livre cárie (LC), com CPI e com CPI severa dariam a mesma resposta cariogênica sob uma exposição regular de sacarose, em um modelo de biofilme padronizado. Além disso, comparar o biofilme de microcosmo formado a partir da saliva de crianças com o biofilme formado a partir da saliva de suas mães, considerando-se resposta cariogênica (queda de pH e perda de mineral) e composição microbiana.

Material e Métodos

Seleção da Amostra e Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil (protocolo nº 064/2008).

Nove crianças e suas mães foram selecionadas de uma lista crianças que aguardavam atendimento na Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, em setembro de 2009. Os critérios de seleção dos pares mãe-filho eram boa saúde geral, crianças com idades entre

48-71 meses, que atendessem a uma das classificações de Karjalainen et al. (26) e que, juntamente com suas mães, não tivessem recebido tratamento com antibióticos há pelo menos três meses. Todas as mães aceitaram participar e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

O exame clínico das condições dentárias foi realizado para classificar as crianças nos grupos. O número de superfícies dentárias decíduas cariadas, perdidas e restauradas (ceos) foi utilizado para a criança e, para a mãe foi o número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPOD). Ambos de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (27). Os exames foram realizados utilizando um espelho e sonda preconizada pela Organização Mundial da Saúde sob a luz do refletor em equipo odontológico, sendo conduzido por um único examinador, treinado e calibrado com valor médio de Kappa= 0,91 para as crianças e de 0,97 para as mães.

Como dado complementar foi aplicada uma entrevista às mães sendo consideradas informações demográficas e socioeconômicas da família.

Condição de crescimento do biofilme e análise do pH

Os biofilmes (n=108, no total) (Figura1) foram desenvolvidos como previamente descrito por Filoche et al. (23) modificado por van de Sande (28) em placas de 24 micropoços sobre discos estéreis de esmalte bovino de aproximadamente 6 milímetros de diâmetro, o meio de crescimento empregado foi uma saliva artificial a base de mucina (DMM) (29). Os discos de esmalte foram obtidos de incisivos bovinos e tiveram suas superfícies planificadas e polidas com lixas de carborundum (com granulações de 320, 600, 1200 e 2500) em politriz. O grupo desafio cariogênico recebeu uma DMM com 1% de sacarose (DMM+s) por 6 horas, após os discos foram lavados por 10 segundos em solução salina estéril e transferidos para uma nova placa com DMM por 18 horas, enquanto que o grupo sem desafio cariogênico recebeu DMM por 24 horas, a cada dia (Figura 2) (28).

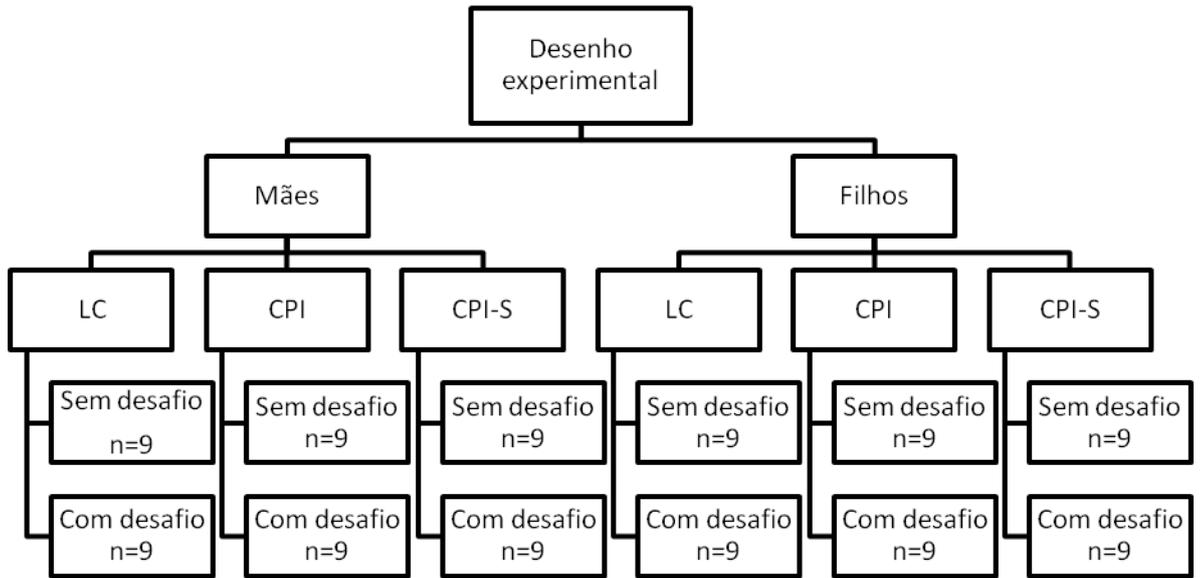


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental

TEMPO	6h	18h
COM DESAFIO CARIOGÊNICO	DDM+S	DMM
SEM DESAFIO CARIOGÊNICO	DMM	

Figura 2. Tempo de exposição diária à saliva artificial a base de mucina pura (DMM) e com 1% de sacarose (DDM+S)

Para obter o inóculo de saliva das crianças com ou sem CPI e de suas mães, aproximadamente 3 mL de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National Can™, Chicago, IL, EUA) foi coletada pela manhã, 2 horas após a última refeição, sendo que os mesmos se privaram de higiene bucal por 24 horas antes da coleta. Aproximadamente 1 mL de saliva coletada foi reservada para observação dos níveis salivares de microrganismos totais, acidúricos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos.

Para o crescimento do biofilme alíquotas de 0,4mL de saliva fresca, homogeneizada de cada doador foram inoculadas sobre cada disco de esmalte sendo que, para cada condição (com e sem desafio cariogênico), havia 3 discos para cada doador. Após uma hora, a saliva foi delicadamente aspirada, sendo adicionados 1,8 mL de meio de crescimento de acordo com as condições de cada grupo. As placas foram incubadas anaerobicamente (5-10% CO₂, menos de 1% O₂)

a 37°C por 10 dias. O meio foi renovado diariamente e os discos de esmalte foram transferidos para os meios frescos. A aferição do pH foi realizada com um pHmetro digital (Quimis 50w – Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brazil; V621 electrode – Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil) de cada um dos poços das placas contendo o sobrenadante logo após a remoção dos discos contendo biofilme

Análise da composição microbiana do biofilme

Após 10 dias de crescimento, o biofilme formado sobre os discos de esmalte foi coletado com um instrumento plástico estéril e colocado em microtubos pré-pesados contendo pérolas de vidro estéreis. O peso úmido de cada amostra foi determinado e adicionado a cada microtubo um meio de transporte reduzido (RTF) (1mL/mg de biofilme, v/p). Em seguida, os biofilmes foram agitados em vortex durante 2 minutos, serialmente diluídos em RTF (10^0 - 10^6) e foram plaqueados em duplicata nos meios Agar sangue (para contagem de microrganismos totais), Agar Infusão Cérebro e Coração com pH ajustado para 4,8 (para contagem de acidúricos totais), Agar Mitis Salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (para o grupo mutans) e Agar Rogosa (para lactobacilos totais). Todas as placas forma incubadas a 37°C sob condição de anaerobiose (5-10% CO₂, menos de 1% O₂) e após 96 horas as unidades formadoras de colônia foram contadas por um único operador treinado com o auxílio de um microscópio estereoscópico e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por mg.

Análise da Microdureza

A determinação da microdureza da superfície de todos os discos de esmalte foi realizada por um único leitor treinado e cego quanto aos grupos em estudo, através de 3 edentações (Knoop diamond, 50 g, 5 s, HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) antes do experimento (PDS). Após a coleta do biofilme, a microdureza foi novamente avaliada (PDS2) e porcentagem de mudança da microdureza de superfície foi calculada [%PDS= 100(PDS2-PDS/PDS)] (30).

Análise Estatística

A relação entre mães e filhos com as variáveis de resposta avaliadas (%PDS, pH e microbiota do biofilme) foi estimada pelo teste de correlação de Spearman.

Comparações estatísticas independentes entre %PDS, do pH e da microbiota do biofilme foram realizadas para o grupo e condição (exposição a sacarose) e analisadas usando ANOVA de dois fatores seguido do teste de Tukey, avaliando os dados das crianças e de suas mães separadamente. As hipóteses de igualdade de variâncias e distribuição normal dos erros foram verificadas para todas as variáveis de resposta testadas e aqueles que não satisfizeram foram transformados (31). O dados de %PDS foram elevados a 0.2 e os de pH do DMM foram ranqueados para as mães e as crianças. A contagem de microrganismos totais e contagem acidúricos totais para as mães e os dados de estreptococos mutans e lactobacilos totais para as mães e as crianças foram transformados em log10. Para todas as análises foi utilizado o programa SAS versão 8.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Na tabela 1 encontra-se o resumo da caracterização dos doadores: Nove crianças (6 meninos e 3 meninas, com idade entre 54 e 71 meses) e suas mães distribuídos três pares em cada grupo: crianças livres de cárie (LC), com CPI (CPI) e com CPI severa (CPI-S).

Tabela 1. Médias das informações (desvio padrão) gerais das crianças de acordo com os grupos

Fatores	Desfecho	Grupo da criança		
		LC	CPI	CPI-S
Determinantes para a classificação	Idade média (meses)	65 (8,72)	64 (8,89)	67,7 (3,21)
	ceos	0 (0)	5,3 (2,52)	26,7 (6,43)
	Superfícies cariadas	0 (0)	5,3 (2,52)	24,3 (2,52)
	Mancha branca por superfície ceod	0 (0)	1,33 (1,53)	2,67 (3,06)
Dados <i>baseline</i> saliva da criança	Microorganismos totais ($\times 10^7$)	2,44(2,28)	0,88 (0,45)	0,83 (0,42)
	Totais acidúricos ($\times 10^6$)	3,81 (5,20)	6,71(10,02)	2,05 (3,42)
	<i>S. mutans</i> ($\times 10^4$)	0,99 (0,12)	1,68 (1,22)	20,6 (28,01)
	Lactobacilos ($\times 10^5$)	1,31 (1,07)	3,99 (5,47)	1,82 (2,33)
Dados socioeconômicos e demográficos	Renda familiar (salário mínimo)	3,1 (1,06)	2,3 (1,78)	1,2 (0,17)
	Escolaridade paterna (anos)	11,3 (4,00)	9,3 (2,08)	9,3 (2,83)
	Escolaridade materna (anos)	11 (0,58)	10,3 (1,53)	9 (2,89)
	Idade materna(anos)	38,3 (8,62)	37,7(11,15)	27,7 (7,09)
Experiência de cárie materna	CPOD	17 (10,53)	16,7 (6,35)	4 (4,35)
	Dentes cariados	0 (0)	2,6 (3,06)	0,7 (0,58)
	Dentes perdidos	10 (15,62)	7 (7,55)	1 (1)
	Dentes restaurados	7 (7)	7 (4)	2,3 (4,04)
	Mancha branca por dente	0 (0)	0 (0)	1 (0,58)
Dados <i>baseline</i> saliva da mãe	Microorganismos totais ($\times 10^7$)	1,23 (1,00)	0,85 (0,41)	1,14 (0,78)
	Totais acidúricos ($\times 10^6$)	1,24 (1,07)	2,18 (2,74)	2,28 (3,87)
	<i>S. mutans</i> ($\times 10^4$)	24,8(41,31)	4,92 (0,80)	19,05(21,46)
	Lactobacilos ($\times 10^5$)	0,41 (0,45)	0,64 (0,52)	0,15 (0,22)

* LC=livres de cárie; CPI=cárie na primeira infância; CPI-S=cárie na primeira infância severa

A tabela 2 mostra as médias e desvio padrão e a tabela 3 mostra os resultados do ANOVA para as variáveis de desfecho estudadas em todos os grupos para os pares mãe-filho na condição com e sem desafio cariogênico. A porcentagem de perda de microdureza de superfície (%PDS) dos discos de esmalte das mães e dos filhos não diferiu estatisticamente entre os grupos (LC, CPI e CPI-S) ($p > 0,05$), mas na condição com desafio cariogênico houve uma perda mineral significativamente maior do que aquelas tratadas somente com DMM (sem desafio cariogênico) ($p < 0,001$) (Figura 3).

Tabela 2. Média (desvio padrão) para todas as variáveis de desfecho estudadas nos pares mãe-filho quanto a condição (com e sem desafio cariogênico) e grupos (livres de cárie, cárie na primeira infância e cárie na primeira infância severa)

Desfecho		Sem desafio cariogênico			Com desafio cariogênico		
		LC	CPI	CPI-S	LC	CPI	CPI-S
Filho	% PDS	-9,99 (10,02)	-6,04 (6,60)	-3,27 (3,04)	-86,69 (9,11)	-85,32 (3,93)	-82,86 (7,81)
	pH DMM	7,41 (0,12)	7,43 (0,11)	7,45 (0,07)	7,11 (0,04)	7,10 (0,10)	7,20 (0,05)
	pH DMM+S	.	.	.	4,44 (0,12)	4,34 (0,11)	4,54 (0,03)
	Totais	4625000 (4227883,63)	2153125 (2703847,7)	3935714,29 (7122702,22)	2822222,22 (1768537,73)	8511111,11 (6574894,38)	8247222,22 (4711197,51)
	Acidúricos	550038,9 (1132274)	39313,89 (49293,72)	1006454 (1651339)	458857,1 (580797,5)	585752,8 (576240)	4571944,4 (4377699,8)
	<i>S. mutans</i>	55,6 (109,17)	4300,333 (7884,90)	260,6 (362,44)	7042,17 (12806,33)	9629,5 (19999,75)	120000,3 (125936,1)
	Lactobacilos	43278,44 (124442,8)	1(0)	400,8 (893,98)	156708,3 (340946,5)	476250,1 (453297,7)	429444,7 (494757,9)
	Mãe	% PDS	-8,07 (8,32)	-10,30 (6,23)	-8,72 (9,47)	-89,62 (5,08)	-75,72 (28,61)
pH DMM		7,31 (0,10)	7,37 (0,20)	7,39 (0,13)	7,05 (0,04)	7,13 (0,13)	7,19 (0,07)
pH DMM+S		.	.	.	4,34 (0,19)	4,36 (0,09)	4,41 (0,13)
Totais		4971428,57 (8861990,8)	17163888,9 (43366479,9)	3025000 (4718961,09)	23138888,9 (35630944,9)	14525000 (19185631)	12361111,1 (16411748,4)
Acidúricos		83933,33 (203830,8)	212730,6 (291207,7)	41750 (49374,37)	734722,2 (591896,4)	2426278 (3407602)	4840375 (6797023,7)
<i>S. mutans</i>		263 (400,78)	3459 (8108,94)	3792,333 (9165,39)	11696,17 (18529,59)	75417,17 (137843,94)	53750,17 (65531,32)
Lactobacilos		429,1429 (553,15)	10333,67 (13671,65)	13417 (21566,52)	267250,1 (351904,9)	402861,3 (604162,2)	1824167 (3594666)

Tabela 3. Resultados do ANOVA (valores de p) para todas as variáveis estudadas nos pares mãe-filho quanto à condição (com e sem desafio cariogênico) e grupos (livres de cárie, cárie na primeira infância e cárie na primeira infância severa)

	Variável	Condição	Grupo	Interação Grupo- Condição
Filho	% PDS	<0,001	0,067	0,971
	pH DMM	<0,001	0,063	0,506
	pH			
	tratamento	<0,001	0,005	0,109
	Totais	0,004	0,374	0,113
	Acidúricos	0,007	0,153	0,429
	<i>S. mutans</i>	0,031	0,284	0,104
	Lactobacilos	<0,001	0,759	0,013
Mãe	% PDS	<0,001	0,709	0,043
	pH DMM	<0,001	0,004	0,370
	pH			
	tratamento	<0,001	0,293	0,931
	Totais	0,001	0,678	0,649
	Acidúricos	<0,001	0,037	0,061
	<i>S. mutans</i>	0,017	0,695	0,596
	Lactobacilos	<0,001	0,395	0,545

A porcentagem de perda de microdureza de superfície (%PDS) dos discos de esmalte das mães e dos filhos não diferiu estatisticamente entre os grupos (LC, CPI e CPI-S) ($p>0,05$), mas na condição com desafio cariogênico houve uma perda mineral significativamente maior do que aquelas tratadas somente com DMM (sem desafio cariogênico) ($p<0,001$) (Figura 3).

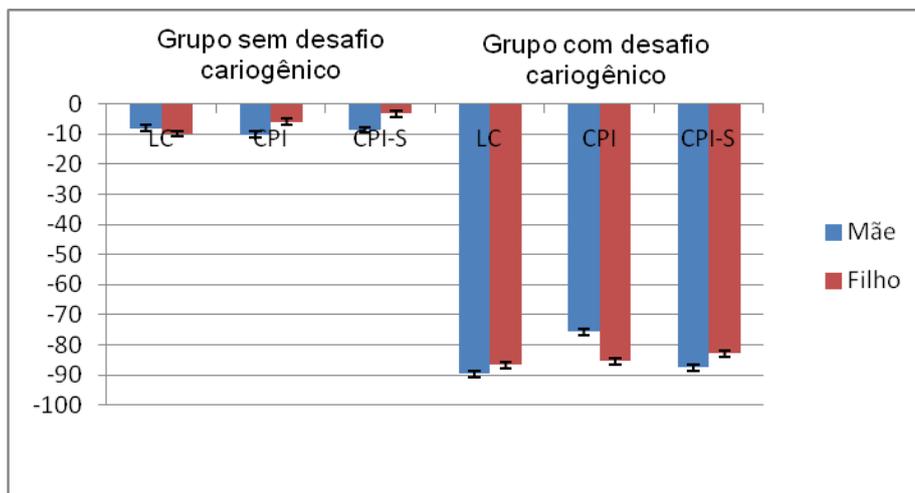


Figura 3. Média e desvio padrão da porcentagem de perda de microdureza de superfície dos pares mãe-filho de acordo com a condição (com e sem desafio cariogênico) entre os grupos livres de cárie (LC), cárie na primeira infância (CPI) e cárie na primeira infância severa (CPI-S).

O pH do DMM puro das placas de microcosmos que receberam suplementação prévia com sacarose por 6 horas (com desafio cariogênico) mostraram valores menores do que o DMM puro na condição sem desafio cariogênico ($p<0,001$) (Figura 4). Diferenças estatísticas entre os grupos para as médias do pH do DMM não foram observadas para os filhos ($p=0,063$), mas diferiram para as mães ($p=0,004$). A média de pH do DMM com 1% de sacarose foi o menor observado ($p<0,001$). Para as crianças a média de pH do DMM com 1% de sacarose diferiu estatisticamente entre os grupos e o menor valor de pH foi verificado no grupo CPI ($p=0,005$).

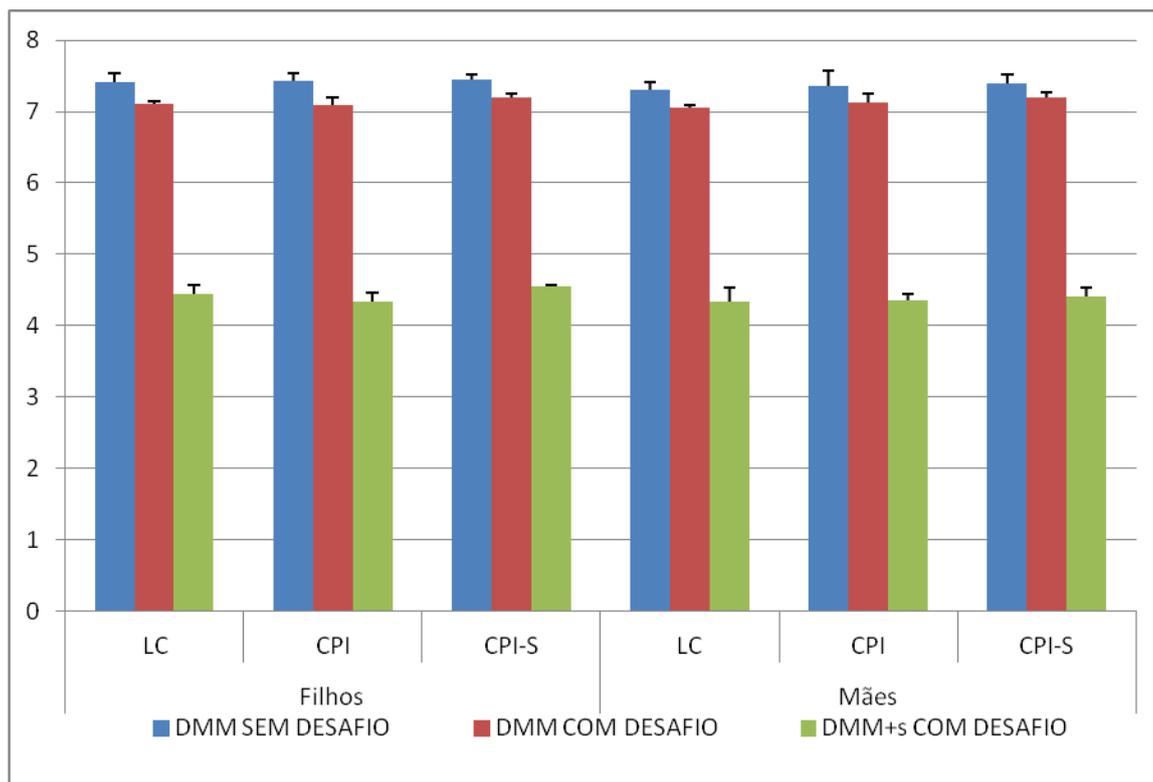


Figura 4. Média e desvio padrão do pH do DMM puro no grupo sem desafio cariogênico, do DMM puro no grupo com desafio cariogênico e do DMM com 1% de sacarose no grupo com desafio cariogênico por grupo entre os pares mãe-filho nos grupos livres de cárie (LC), cárie na primeira infância (CPI) e cárie na primeira infância severa (CPI-S).

Com relação à composição da microbiota do biofilme, a figura 5 mostra que teve uma mudança substancial nas placas de microcosmos suplementadas com sacarose. Após 10 dias de crescimento, um aumento na contagem de acidúricos totais, *S. mutans* e lactobacilos totais foram observadas nas placas dos pares mãe-filho sob desafio cariogênico.

No conjunto, diferenças observadas na composição microbiana dos biofilmes das crianças foram estatisticamente associadas à presença ou ausência de desafio cariogênico e não pelo grupo a que pertenciam. Para as mães houve uma diferença estatisticamente significativa para contagem de acidúricos totais entre os grupos, para os quais as mães das crianças com CPI-S tiveram níveis mais altos (5,25), seguidos dos grupos CPI (5,17) e LC (4,46).

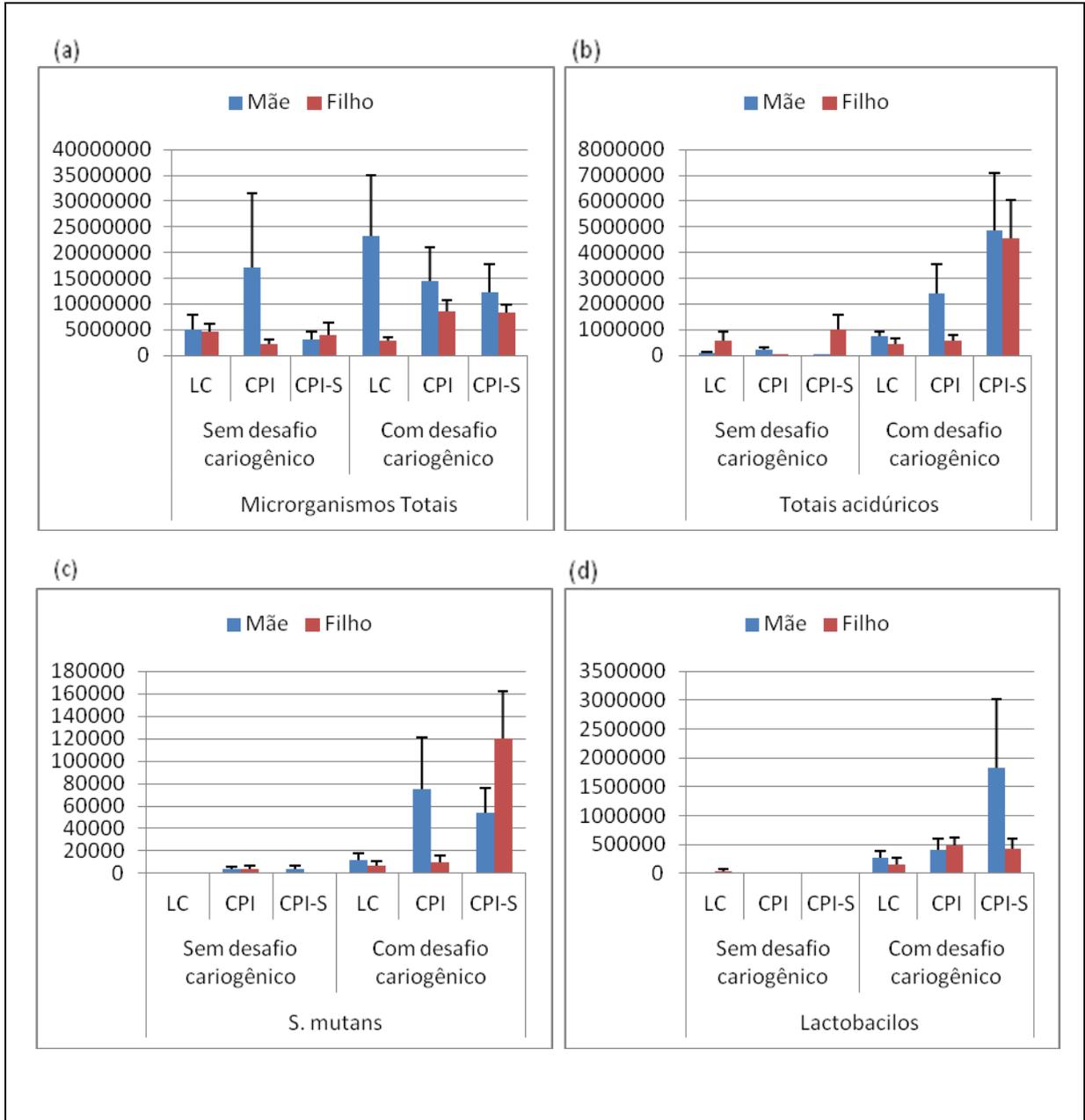


Fig. 5. (a-d) Médias da composição microbiana dos biofilmes dos pares mãe-filho crescidos por 10 dias em saliva artificial com e sem desafio cariogênico nos grupos livres de cárie (LC), cárie na primeira infância (CPI) e cárie na primeira infância severa (CPI-S). As barras de erro representam o erro padrão.

Ao comparar os biofilmes de microcosmos formados da saliva das crianças com de suas mães (Tabela 4), houve correção de Spearman positiva significativa para %PDS ($p=0,0248$) na condição sem desafio cariogênico e para pH do DMM ($p=0,000$), pH do DMM com 1% de sacarose ($p=0,0121$), contagem de acidúricos totais ($p=0,0301$) e lactobacilos ($p=0,000$) na condição com desafio cariogênico.

Tabela 4. Correlação (Spearman) das variáveis de desfecho estudadas da média dos biofilmes das mães com a média dos seus filhos sob as condições de sem e com desafio cariogênico

Variáveis de desfecho	R	P
Sem desafio cariogênico		
%PDS	0,717	0,0248
pH DMM	0,6	0,0769
Microorganismos		
Totais	0,533	0,124
Acidúricos	0,45	0,204
<i>S. mutans</i>	0,348	0,497
Lactobacilos	0,156	0,662
Com desafio cariogênico		
%PDS	0,417	0,243
pH DMM	0,9	0,000
pH tratamento	0,767	0,0121
Microorganismos		
Totais	-0,25	0,491
Acidúricos	0,7	0,0301
<i>S. mutans</i>	0,754	0,103
Lactobacilos	0,881	0,000

Discussão

Este estudo, com base na literatura consultada, foi o primeiro a verificar a resposta cariogênica de biofilme de microcosmos originados a partir da saliva de crianças com e sem cárie e a correlacionar biofilme de microcosmos de mães e filhos considerando sua capacidade em levar a perda mineral em um modelo de biofilme controlado e simplificado. O modelo *in vitro* utilizado tem mostrado reproduzir a variabilidade e heterogeneidade de placas *in vivo*, simulando a complexidade do ambiente bucal, além de superar as dificuldades dos experimentos *in vivo*. Este modelo também é capaz de fornecer placas de biofilme reprodutíveis,

que são estabelecidas a partir de cada doador salivar, com a dinâmica populacional da placa natural (23).

Além disso, a fim de avaliar a resposta a desmineralização do esmalte ao desafio cariogênico, modificações no modelo de Filoche et al. (2007) foram pré-testadas com diversas concentrações de sacarose, tempo de crescimento do biofilme e regime de suplementação de sacarose. Estabeleceu-se que um regime semi-dinâmico com uma suplementação de DMM+s por 6h/dia e DMM sem sacarose por 18h/dia foi um modelo capaz de produzir adequado desafio cariogênico e lesões de cárie em esmalte.

A composição da microbiota de placas *in vivo* e *in vitro* tem mostrado ser afetada pela exposição à sacarose e pelas condições ácidas associadas (22,23). Da mesma forma, após 10 dias de desenvolvimento da placa diferenças na composição da microbiota puderam ser vistas entre DMM com e sem 1% de sacarose. A exposição à sacarose aumenta a população de lactobacilos e *S. mutans* no biofilme em estudos *in situ* (32) e *in vivo* (33). Similarmente, nesta investigação níveis mais elevados de bactérias cariogênicas foram observados em todos os grupos submetidos ao desafio cariogênico em comparação com o controle, como esperado. Indivíduos que frequentemente consomem açúcar na sua dieta em geral têm níveis elevados de bactéria cariogênica na placa e estão em maior risco de desenvolver cárie (34).

Seria esperado que diferentes graus de resposta à sacarose fossem percebidos entre biofilmes de microcosmos desenvolvidos a partir do inóculo de saliva com diferenças em sua composição (23), mas os resultados desta investigação não encontraram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. Indivíduos com e sem cárie tiveram respostas similares considerando perda mineral e queda de pH sob uma mesma condição de crescimento nutricional. Da mesma forma, estatisticamente não houve diferenças quanto à composição microbiológica do biofilme, porém observou-se um maior crescimento de *S. mutans* e acidúricos totais no grupo de crianças com cárie severa sob desafio cariogênico (figura 3b/c), sugerindo que a experiência de cárie, especialmente com características de atividade e se severa, merece estudos complementares.

Apesar de, as espécies bacterianas escolhidas para serem investigadas neste estudo serem cultiváveis e detectáveis em meio artificial, em laboratório, métodos de cultura convencional são limitados em sua especificidade e

sensibilidade comparado a métodos moleculares modernos, especialmente para espécies que o cultivo não consegue captar, uma vez que, as evidências mostram que outras bactérias, ou talvez mais corretamente outras populações microbianas, podem estar envolvidas no processo da cárie (35,36). Assim, o método de cultura convencional utilizado pode não ter sido suficientemente sensível para detectar diferenças que poderiam existir se outras espécies de bactérias não cultiváveis fossem investigadas.

Considerando os dados de pH do DMM sem sacarose, os grupos que foram suplementados pelo tratamento com DMM+s por 6h/dia tiveram valores menores de pH do que os grupos suplementados com DMM por 24h/dia (sem desafio cariogênico). Uma explicação para este evento é que a sacarose serve como substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC) na placa dentária e ambos têm um importante papel na cariogenicidade do biofilme. Polissacarídeos extracelulares aumentam a porosidade na matriz da placa dentária e conseqüentemente sua difusibilidade aos substratos, aumentando a acidogenicidade da matriz do biofilme, PIC promovem menores níveis de pH durante os períodos de carência de nutrientes prolongando a exposição das superfícies dentárias aos ácidos orgânicos (37,38). Assim, a exposição à sacarose leva a uma diminuição do pH, favorecendo o crescimento e a seleção de bactérias cariogênicas e, conseqüentemente, levando a uma maior desmineralização.

Placas que iniciaram a partir da saliva de indivíduos cárie-ativos poderiam ser mais eficientes e rápidas em reduzir o valor de pH, no entanto essas placas teriam levado a uma maior perda mineral, o que não foi observado. Uma limitação desta avaliação é que, embora o modelo escolhido permita períodos de baixo pH e pH neutro, o modelo em si não é um modelo de fluxo. Com este, diferentes respostas talvez pudessem ser observadas.

No presente estudo, a desmineralização do esmalte foi observada através da porcentagem de PDS do esmalte bovino, considerado um método bastante sensível para avaliar lesões iniciais de cárie e o esmalte bovino também tem sido uma alternativa aceitável ao esmalte humano (39). Os dados mostraram que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos LC, CPI e CPI-S de crianças e suas mães, porém uma significativa maior perda mineral pôde ser notada no grupo com desafio cariogênico, suportando a Hipótese Ecológica da Placa (34) para cárie. Ou seja, que

sob uma determinada pressão ambiental (condições regulares de açúcar e baixo pH) a população microbiana muda para se tornar indutora de doença.

A saúde bucal das crianças tem sido relacionada às condições de saúde bucal da família, especialmente das mães. Por esta razão, a saliva das mães foi coletada para verificar alguma relação entre a resposta do biofilme de microcosmos entre as mães e seus filhos. No entanto, neste modelo *in vitro* a correlação encontrada esteve relacionada as condições de presença ou ausência de sacarose, ou seja, na presença de desafio cariogênico tanto as mães como seus filhos apresentaram uma maior queda de pH, contagem de acidúricos totais e lactobacilos. Embora os dados deste estudo forneçam informações limitadas pode-se sugerir que a transmissão mãe-filho para o risco de cárie dentária está mais relacionada a um caráter comportamental do que biológico.

Tem sido relatado que mães tendem a não oferecer a seus filhos comidas que elas não gostem (40) e os hábitos de alimentação materna são fortes indicadores de risco para a CPI (41). Também tem sido demonstrada uma associação entre a regularidade da escovação das mães e a experiência de cárie dos seus filhos (42).

Os resultados sugerem que uma dieta rica em sacarose é capaz de modificar o ambiente, modulando a composição do biofilme. Como os discos de esmalte não sofreram distúrbios mecânicos, pode-se sugerir que os hábitos de dieta e de higiene bucal são fatores-chave de risco comportamental para a cárie dentária. Essa noção é suportada por diferentes estudos epidemiológicos (15,16,42-45).

Em nível individual, bem como populacional essas variáveis (higiene e dieta) serão altamente influenciadas pelas condições socioeconômicas (46). Talvez, por esta razão, muitos estudos têm demonstrado que nível de educação das mães e dos pais, renda familiar e classe social influenciam o índice de cárie nas crianças e adolescentes (15,16, ,47) e que na primeira infância há redução na incidência e severidade de cárie na primeira infância em comunidades de baixa renda quando se realiza um programa de educação alimentar nas mães, durante o primeiro ano de vida da criança (45).

Estes dados confirmam a importância de esclarecer como os aspectos comportamentais (a transmissão de hábitos) e a transmissão de bactérias interferem para o estabelecimento da cárie na primeira infância. Também sugerem que estratégias para prevenção da doença cárie na primeira infância deveriam ser

direcionadas às mães e focadas na transmissibilidade não no âmbito microbiológico, mas na questão comportamental (higiene bucal e dieta) e, por meio desta, atuando na manutenção da homeostase no biofilme.

Portanto, dentro das limitações deste estudo, é possível concluir que o crescimento de biofilme de microcosmos originados a partir do inóculo de crianças com e sem cárie na primeira infância promovem a mesma resposta cariogênica sob exposições regulares de sacarose. Além disso, a presença do desafio cariogênico foi determinante para existência de correlação na resposta cariogênica no biofilme de microcosmos entre o inóculo de mães e seus filhos.

Referências

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):51-9.
2. Poureslami HR, Van Amerongen WE. Early Childhood Caries (ECC): an infectious transmissible oral disease. *Indian J Pediatr*. 2009 Feb;76(2):191-4.
3. Fejerskov O, Baelum V. Changes in prevalence and incidence of the major oral diseases. In: Guggenheim B, Shapiro H (eds). *Oral Biology at the Turn of the Century: Truth, Misconcepts and Challenges*. Basel: Karger, 1998. p 1–11.
4. Skeie MS, Espelid I, Riordan PJ, Klock KS. Caries increment in children aged 3–5 years in relation to parents' dental attitudes: Oslo, Norway 2002 to 2004. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2008 Oct; 36(5):1-10.
5. Ferro R, Besostri A, Meneghetti B, Stellini E. Prevalence and severity of dental caries in 5- and 12-year old children in the Veneto Region (Italy). *Community Dent Health*. 2007 Jun; 24(2):88-92.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Projeto SB Brasil 2003. Condições da Saúde bucal da População Brasileira 2002-2003. Resultados Principais. Brasília-DF 2004.
7. Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. *J Can Dent Assoc*. 2003 May;69(5):304-7.
8. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006 Nov;51(11):1024-8.
9. Al Shukairy H, Alamoudi N, Farsi N, Al Mushayt A, Masoud I. A comparative study of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in mothers and children with severe early childhood caries (SECC) versus a caries free group of children and their corresponding mothers. *J Clin Pediatr Dent*. 2006 Winter;31(2):80-5.
10. Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res*. 1995 Feb;74(2):681-5.
11. Lapirottanakul J., Nakano K., Nomura R., Hamada S., Nakagawa I., Ooshima T. Demonstration of Mother-to-Child Transmission of *Streptococcus mutans* Using Multilocus Sequence Typing. *Caries Res*. 2008Nov;42(6):466–474.
12. Mitchell SC, Ruby JD, Moser S, Momeni S, Smith A, Osgood R, Litaker M, Childers N. Maternal transmission of mutans *Streptococci* in severe-early childhood caries. *Pediatr Dent*. 2009 May-Jun;31(3):193-201.
13. Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009 Jun;37(3):241-9

14. Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatr Dent*. 2006 Mar-Apr;28(2):106-9; discussion 192-8.
15. Hallett KB, O'Rourke PK. Social and behavioural determinants of early childhood caries. *Aust Dent J*. 2003 Mar;48(1):27-33.
16. Peres MA, de Oliveira Latorre Mdo R, Sheiham A, Peres KG, Barros FC, Hernandez PG, Maas AM, Romano AR, Victora CG. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005 Feb;33(1):53-63.
17. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5753-9.
18. Gussy MG, Waters EG, Walsh O, Kilpatrick NM. Early childhood caries: Current evidence for aetiology and prevention. *J Paediatr Child Health*. 2006;42(1-2):37-43.
19. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(1):4-12.
20. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2010 May;55(5):365-73. Epub 2010 Apr 9.
21. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997;11:110-26.
22. Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res*. 2007;41(5):413-22.
23. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Apr;22(2):73-9.
24. Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol*. 2005 Sep;50(9):779-87.
25. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Oct;54(1):27-36. Epub 2008 Jul 18.
26. Karjalainen S, Söderling E, Sewón L, Lapinleimu H, Simell O: A prospective study on sucrose consumption, visible plaque and caries in children from 3 to 6 years of age. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001 Apr;29(2):136-42.

27. WHO. Oral health survey - basics methods 4 edn. Geneva: World Health Organization; 1997.
28. Van de Sande, FH. Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores [Dissertation]. Pelotas (BR): Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas; 2009.
29. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001 Jun;46(6):477-86.
30. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec;34(6):491-7.
31. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS: Statistics for experimenters. New York, Wiley, 1978.
32. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005 Jul;94(1):44-50.
33. Ellen RP, Banting DW, Fillery ED. Streptococcus mutans and Lactobacillus detection in the assessment of dental root surface caries risk. *J Dent Res.* 1985 Oct;64(10):1245-9.
34. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-94.
35. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770-83.
36. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul;42(7):3023-9.
37. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006 Oct;85(10):878-87.
38. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006;40(1):28-32.
39. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995 Nov;9(3):214-30; discussion 231-4.
40. Skinner JD, Carruth BR, Wendy B, Ziegler PJ. Children's food preferences: a longitudinal analysis. *Am Diet Assoc.* 2002 Nov;102(11):1638-47.

41. Longbottom PJ, Wrieden WL, Pine CM. Is there a relationship between the food intakes of Scottish 5(1/2)-8(1/2)-year-olds and those of their mothers? *J Hum Nutr Diet*. 2002 Aug;15(4):271-9.
42. Mattila ML, Rautava P, Sillanpää M, Paunio P. Caries in Five-year-old Children and Associations with Family-related Factors. *J Dent Res*. 2000 Mar;79(3):875-81.
43. Ruottinen S, Karjalainen S, Pienihäkkinen K, Lagström H, Niinikoski H, Salminen M, Rönnemaa T, Simell O. Sucrose intake since infancy and dental health in 10-year-old children. *Caries Res*. 2004 Mar-Apr;38(2):142-8.
44. Mello T, Antunes J, Waldman E, Ramos E, Relvas M, Barros H. Prevalence and severity of dental caries in schoolchildren of Porto, Portugal. *Community Dent Health*. 2008 Jun;25(2):119-25.
45. Feldens CA, Giugliani ERJ, Duncan BB, Drachler ML, Vitolo MR. Long-term effectiveness of a nutritional program in reducing early childhood caries: a randomized trial. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 2010 (Epub ahead of print - DOI 10.1111/j.1600-0528.2010.00540.x).
46. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):182-91.
47. Perera I, Ekanayake L. Social gradient in dental caries among adolescents in Sri Lanka. *Caries Res*. 2008;42(2):105-11.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- Os experimentos realizados e os resultados observados sugerem que o modelo experimental utilizado é reprodutível e adequado para testar hipóteses relacionadas à cárie em Odontopediatria.

- O crescimento do biofilme de microcosmos originados a partir do inóculo de crianças com e sem cárie na primeira infância promovem a mesma resposta cariogênica sob exposições regulares de sacarose.

- Todos os biofilmes sob uma mesma condição de desafio cariogênico responderam com a seleção de uma microbiota cariogênica, queda no pH e perda mineral, independente da sua atividade de cárie inicial.

- O inóculo de mães e crianças promove no biofilme de microcosmos potencial cariogênico distinto, e sua resposta cariogênica é dirigida predominantemente pela presença de carboidratos fermentáveis, sugerindo que a transmissão de hábitos de mãe para filho possa ter papel fundamental na doença cárie na infância.

- Estratégias para prevenção da doença cárie na primeira infância deveriam ser direcionadas às mães e focadas na transmissibilidade não no âmbito microbiológico, mas na questão comportamental (higiene bucal e dieta) e, por meio desta, atuando na manutenção da homeostase no biofilme.

REFERÊNCIAS*

- AINAMO, J.; BAY, Y. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v.25, n.4, p.229-235, dec. 1975.
- ALALUUSUA, S.; KLEEMOLA-KUJALA, E.; GRONROOS, L.; EVALAHTI, M. Salivary caries related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three-year longitudinal study. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.2, p.77–81, apr. 1990.
- ALM, A. On dental caries and caries-related factors in children and teenagers. **Swed Dent J Suppl**, v. 195, p.7-63, 2008.
- BARDOW, Allan et al. The role of saliva. In: Fejerskov, O.; Kidd, E. A. M. **Dental Caries: The disease and its clinical management**. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008. p.189-208.
- BECKER, M. R.; PASTER, B. J.; LEYS, E. J.; MOESCHBERGER, M. L.; KENYON, S. G.; GALVIN, J. L.; BOCHES, S. K.; DEWHIRST, F. E.; GRIFFEN, A. L. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. **J. Clin Microbiol**, v. 40, n.3, p. 1001–1009, mar. 2002.
- BEIGHTON, D.; ADAMSON, A.; RUGG-GUNN, A. Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old english schoolchildren. **Archs oral Biol**, v.41, n.3, p. 271-280, mar. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 de 10 de outubro de 1996.
- CAMPUS, G.; SACCO, G.; CAGETTI, M. G.; ABATI, S. Changing trend of caries from 1989 to 2004 among 12-year old Sardinian children. **BMC Public Health**, v.7, n.28, p.1-6, mar. 2007.
- CARVALHO, J.C.; FIGUEIREDO, M.J.; VIEIRA, E.O.; MESTRINHO, H.D. Caries trends in Brazilian non-privileged preschool children in 1996 and 2006. **Caries Res**,v.43, n.1, p.2-9, 2009.
- 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.
- CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, A. P.; LI, Y.; PAN, Y.; HSU, J.; HARDIN, J. M. Natural History of Streptococcus sanguinis in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4018-4023, july 2000.
- COOGAN, M. M.; MACKEOWN, J. M.; GALPIN, J. S.; FATTI, L. P. Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity, **J Dent**, v.36, n.11, p.1-8, nov. 2008.

- CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v.34, n.6, p. 491– 497, nov./dec. 2000.
- DALWAI, F.; SPRATT, D. A.; PRATTEN J. Modeling Shifts in Microbial Populations Associated with Health or Disease. **Appl Environ Microbiol**, v.72, n.5, p. 3678–3684, may 2006.
- DECLERCK, D.; LEROY, R.; MARTENS, L.; LESAFFRE, E.; GARCIA-ZATTERA, M. J.; VANDEN BROUCKE, S.; DEBYSER, M.; HOPPENBROUWERS, K. Factors associated with prevalence and severity of caries experience in preschool children. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 36, n.2, p.168–178, apr. 2008.
- 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**, Chicago, v.73, n.2, p.105-11, may/aug. 2006.
- FARSI, N. Dental Caries in Relation to Salivary Factors in Saudi Population Groups. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.3, p.16-23, mar. 2008.
- FEJERSKOV, O.; BAELUM, V. Changes in prevalence and incidence of the major oral diseases. In: Guggenheim B, Shapiro H (eds): **Oral Biology at the Turn of the Century: Truth, Misconcepts and Challenges**. Basel: Karger, 1998. p 1–11.
- FEJERSKOV, O.; NYVAD, B. Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. In: Schou L (ed): **Nordic Dentistry 2003 Yearbook**. Copenhagen: Quintessence Publishing, 2003. p.141– 151.
- FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. **Caries Res**, v.38, n.3, p.182–191, may/june 2004.
- FERREIRA, S.H.; BÉRIA, J. U.; KRAMER, P. F.; FELDENS, E. G.; FELDENS, C. A. Dental caries in 0- to 5-year-old Brazilian children: prevalence, severity, and associated factors. **Int J Paediatr Dent**, v.17, n.4, p.289–296, july 2007.
- FERRO, R.; BESOSTRI, A.; MENEGHETTI, B.; STELLINI, E. Prevalence and severity of dental caries in 5- and 12-year old children in the Veneto Region (Italy). **Community Dent Health**, v.24, n.2, p.88-92, june 2007.
- FIGUEIREDO, M. C.; FRITSCHER, A. M. G.; ARAUJO, D. F. Avaliação do CPOS modificado, do índice de placa visível e de sangramento gengival em 30 pares mãe-filho. **Cecade News**, v.4, n.1 e 2, p. 35-45, jan./ago.1996.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol**, v.22, n.2, p.73–79, apr. 2007.
- GOYAL, A. K.; GAUBA, H.; CHAWLA, M.; KAUR, A. N. D.; KAPUR, A. Epidemiology of dental caries in Chandigarh school children and trends over the last 25 years. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 25, n.3, p.115, july/sept. 2007.

- ISMAIL, A. I.; SOHN, W.; TELLEZ, M.; WILLEM, J. M.; BETZ, J.; LEPKOWSKI, J. Risk indicators for dental caries using the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). **Community Dent Oral Epidemiol**, v.36, p.55–68, feb. 2008.
- KARJALAINEN, S.; SÖDERLING, E.; SEWON, L.; LAPINLEIMU, H.; SIMELL, O. A prospective study on sucrose consumption, visible plaque and caries in children from 3 to 6 years of age. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.29, n.2, p.136–42, 2001.
- KIRSTILA, V.; HAKKINEN, P.; JENTSCH, H.; VILJA, P.; TENOVOU, J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic microorganisms: a two-year cohort study. **J Dent Res**, v.77, n.1, p.73–80, jan. 1998.
- KIWANUKA, S. N.; ÅSTRØM, A. N.; TROVIK, T. A. Dental caries experience and its relationship to social and behavioural factors among 3–5-year-old children in Uganda. **Int J Paediatr Dent**, v.14, n.5, p.336–346, sep. 2004.
- LEAKE, J.; JOZZY, S.; USWAK, G. Severe Dental Caries, Impacts and Determinants Among Children 2–6 Years of Age in Inuvik Region Northwest Territories, Canada. **J Can Dent Assoc**, v. 74, n. 6, July/aug. 2008.
- LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The Fidelity of Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants from Their Mothers **J Dent Res**, v.74, n.2, p.681-685, feb. 1995.
- LI, Y.; CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, A. P.; WIENER, H. W.; VERMUND, S. H. Mode of Delivery and Other Maternal Factors Influence the Acquisition of Streptococcus mutans in Infants. **J Dent Res**, v.84, n.9, p.806-811, sep. 2005.
- LI, Y.; KU, C.Y.S.; XU, J.; SAXENA, D.; CAUFIELD, P.W. Survey of Oral Microbial Diversity using PCR-based Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **J Dent Res**, v.84, n.6, p.559-564, june 2005.
- LOE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. **Acta Odontol Scand**, v.21, p.533-551, dec. 1963.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**, v.36, p.177-87, may/june 1965.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.15; n.6 (Suppl I):S14, june 2006.
- MARTHALER, T. M. Changes in dental caries 1953-2003. **Caries Res**, v.38, n.3, p.173-181, may/june 2004.
- MATTILA, M-L.; RAUTAVA, P.; SILLANPAA, M.; PAUNIO, P. Caries in Five-year-old Children and Associations with Family-related Factors. **J Dent Res**, v.79, n.3, p.875-881, mar. 2000.
- MATTILA, M-L.; PAIVI, R.; SIRKKA, J.; ANSA, O.; MATTI S. Childhood caries is still in force: a 15-year follow-up. **Acta Odontol Scand**, v.66, n.3, p.189-92, june 2008.

MELLO, T.; ANTUNES, J.; WALDMAN, E.; RAMOS, E.; RELVAS, M.; BARROS, H. Prevalence and severity of dental caries in schoolchildren of Porto, Portugal. **Community Dent Health**, v.25, n.2, p.119-25, june 2008.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R.G.; GILBERT, P. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. **J Appl Microbiol**, v.94, n.4, p.655–664, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Projeto SB Brasil 2003. Condições da Saúde bucal da População Brasileira 2002-2003. Resultados Principais. Brasília-DF 2004.

MOHEBBI, S. Z.; VIRTANEN, J. I.; MURTOMAA, H.; VAHID-GOLPAYEGANI, M.; VEHKALAHTI, M. M. Mothers as facilitators of oral hygiene in early childhood. **Int J Paediatr Dent**, v.18, n.1, p.48–55, jan. 2008.

NARVAI, P. C.; CASTELLANOS, R. A.; FRAZÃO, P. Dental caries prevalence in permanent teeth of schoolchildren in the Municipality of Sao Paulo, Brazil, 1970-1996. **Rev Saude Publica**, v.34, n.2, p.196-200, apr. 2000.

NICOLAU, B.; MARCENESA, W.; BARTLEYA, M.; SHEIHAM, A. A Life Course Approach to Assessing Causes of Dental Caries Experience: The Relationship between Biological, Behavioural, Socio-Economic and Psychological Conditions and Caries in Adolescents. **Caries Res**, v.37, n.5, p.319–326, sep./oct. 2003.

NORONHA, Júlio Carlos. Plano de tratamento. In: Toledo, A. **Odontopediatria. Fundamentos para a prática clínica**. 3a ed. São Paulo: Editorial Premier, 2005. p.43-52.

OLLILA, P.S.H.; LARMAS, M.A. Long-term predictive value of salivary microbial diagnostic tests in children. **Eur Arch Paediatr Dent**, v.9, n.1, p.25-30, mar. 2008.

PERES, M. A.; LATORRE, M. R. D. O.; SHEIHAM, A.; PERES, K. G. A.; BARROS, F. C.; HERNANDEZ, P. G.; MAAS, A. M. N.; ROMANO, A. R., VICTORA, C. G. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.33, n.1, p.53–63, feb. 2005.

RASIAH, I. A.; WONG, L.; ANDERSON, S. A.; SISSONS, C. H. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. **Arch Oral Biol**, v.50, n.9, p.779—787, sep. 2005.

RODRIGUES, C. S.; SHEIHAM, A. The relationships between dietary guidelines, sugar intake and caries in primary teeth in low income Brazilian 3 year-olds: a longitudinal study. **Int J Paediatr Dent**, v.10, n.1, p.47-55, mar. 2000.

SILNESS, J.; LOE, H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. **Acta Odontol Scand**, v.22, p.533-551, feb. 1964.

SISSONS, C.H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**, v.11, n.1, p.110-126, apr. 1997.

SISSONS, C. H.; WONG, L.; SHU, M. Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. **Arch Oral Biol**, v.43, n.2, p.93-102, feb. 1998.

SISSONS, C.H.;ANDERSON, S. A.; WONG, L. A.; COLEMAN, M. J.; WHITE, D. C. Microbiota of Plaque Microcosm Biofilms: Effect of Three Times Daily Sucrose Pulses in Different Simulated Oral Environments. **Caries Res**, v.41, n.5, p.413-422, 2007.

SKEIE, M. S.; ESPELID, I.; RIORDAN, P. J.; KLOCK, K. S. Caries increment in children aged 3–5 years in relation to parents' dental attitudes: Oslo, Norway 2002 to 2004. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.36, n.5, p.1-10, oct. 2008.

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; VASCONCELOS, S. M.; MELO, M. A.; BELTRÃO, HC.; RODRIGUES, L.K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralization. **J Dent**, v.37, n.1, p.44-51, jan. 2009.

TAGLIAFERRO, E. P. S.; MENEGHIM, M. C.; AMBROSANO, G. M. B.; PEREIRA, A. C.; SALES-PERES, S. H. C.; SALES-PERES, A.; BASTOS, J. R. M. Distribution and prevalence of dental caries in Bauru, Brazil, 1976-2006. **Int Dent J**, v.58, n.2, p.75-80, apr. 2008.

TUUTTI, H.; LAHTI, S.; HONKALA, E.; MÄÄTTÄ, T. Comparison of dental caries experience of the parents of caries - free and caries active children. **J Paediatr Dent**, v.5, p.93-98, 1989.

VAN DE SANDE, Françoise. **Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Dentística)- Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**, v.73, n.3, p.672-681, mar. 1994.

WHITE, D. J.; FEATHERSTONE, J. D. B. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. **Caries Res**, v. 21, n.6, p. 502–512, 1987.

WONG, L.; SISSONS, C. H. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol**, v.46, n.6, p. 477–486, aug. 2001.

WYNE, A. H. Early childhood caries: nomenclature and case definition. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.27, n.5, p.313–315, oct. 1999.

WYNE, A. H. Caries Prevalence, Severity, and Pattern in Preschool Children. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.3, p.24-31, mar. 2008.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você e seu filho (a) estão convidados a participar, como voluntários, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Alertamos que não existem riscos envolvidos neste estudo e em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Esclarecemos que a participação é decorrente de sua livre decisão, após receber todas as informações que julgar necessária, e que poderá ser a qualquer tempo, retirada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação de biofilmes de crianças com ou sem cárie e sua relação com a transmissibilidade de microrganismos e de hábitos familiares

Pesquisadores participantes:

Mestranda Marina Sousa Azevedo

Profa. Dra. Ana Regina Romano
Pesquisadora responsável

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Prezadas mães a nossa pesquisa tem como objetivo principal avaliar a influência da mãe nos hábitos do seu/sua filho(a) e a relação com a doença cárie dentária. Para isso será realizado uma entrevista, um exame clínico detalhado onde serão avaliados os dentes e gengiva sua e de do seu/sua filho(a), assim como, será necessária a coleta da saliva para análise posterior em laboratório. Estes exames serão realizados na própria Faculdade de Odontologia, com toda técnica, segurança e higiene, conforme normas da Organização Mundial da Saúde e do Ministério da Saúde. Além disso, vocês levarão para casa um diário alimentar onde preencherão, durante 3 dias, tudo o que for consumido por você seu filho. Será preservada a identidade dos participantes, e os resultados individuais não serão divulgados. A participação de vocês é de extrema importância, pois os resultados obtidos permitirão planejar ações que irão ajudar a melhorar a sua saúde e de seus filhos.

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 92410477



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO E
RESPONSÁVEL LEGAL

Eu, _____,
RG/CI _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo sobre *a transmissibilidade da doença cárie dentária*, como sujeito, assim como meu filho(a) _____. Fui devidamente informada e esclarecida sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/tratamento.

Pelotas, ____ de _____ de 2009.

Assinatura

APÊNDICE B – ENTREVISTA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



I ENTREVISTA PARA A MÃE

1. Sua idade em anos? anos	IDADE_____
2. Escolaridade da mãe em anos de estudo:anos	ESCM_____
3. Escolaridade do pai em anos de estudo:anos	ESCP_____
4. Renda familiar mensal (todos membros economicamente ativos)reais	RENDA_____

Agora algumas perguntas sobre sua gravidez

5. Como foi seu parto? (0) normal (1) cesária	PART_____
6. Tempo de gestação? (1) de 20 a 37 semanas (parto prematuro) (2) de 37 a 41 semanas (parto a termo) (3) acima de 42 semanas (parto pós-termo)	TEMP_____
7. A senhora tomou bebidas com álcool durante a gestação do/a <NOME> ? (0) Sim (1) Não	ALCO_____
8. A senhora fumou durante a gestação do/a <NOME> ? (0) Sim (1) Não	TABAC_____
9. Fez uso de algum antibiótico durante a gravidez do/a <NOME>? (0) Sim (1) Não	ANTI_____

Agora algumas perguntas sobre o seu filho

10. Qual foi o peso do seu filho(a) ao nascer?g (1) ≤2500g (2) >2500g	PESO_____
11. Qual o peso atual do seu filho?g	PESOA_____
12. Tomou xarope para tosse por longo período? (0) sim (1) não	XAROP_____
13. Fez ou faz uso de algum outro medicamento? (0) sim (1) não	MEDIC_____
14. SE SIM, quais?.....	QUAL_____
15. Tem irmãos, quantos? (0) sim,irmão(s) (1) não	IRMAO_____
16. Se tem, em que ordem de nascimento ele(a) está? (escrever o número)	ORDEM_____
17. Mais alguém além da senhora e o pai cuidou dele: No primeiro ano de vida? (0)sim,..... (1) não No segundo ano de vida? (0)sim,..... (1) não No terceiro ano de vida? (0)sim,..... (1) não	1ANO_____ 2ANOS_____ 3ANOS_____
18. Atualmente, quais turnos ele fica com a senhora de segunda a sexta? (pode marcar mais de um) (0) manhã (1) tarde (2) noite (3) 2 turnos (4) 3 turnos	TURNO_____
19. SE outra pessoa cuida, quem é? (0) niguém, além da mãe (1) pai (2) avó (3) outro parente,..... (4) escolinha (5) babá (6) outro.....	FICA_____

Agora algumas perguntas relacionadas à alimentação do seu filho

20. Ele (a) mamou somente no peito? (0) sim (1) não	MAM_____
21. Até que mês de vida?meses	MÊS_____
22. E a mamadeira, utilizou para dar leite ao/a <NOME>? (0) nunca usou, se não, pule	

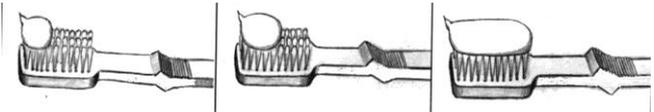
para questão X (1) sim (2) Ainda usa	MAMLE_____
23. SE SIM ou ainda usa, por quanto tempo ?meses	TEMAM_____
24. Com que freqüência faz uso da mamadeira? (1) Menos de 1 vez/dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4) 5 a 6 x/dia (5) Mais de 6 x/dia	FREMA_____
25. E a noite, o <NOME> usa/usou a mamadeira?(ler opções) (1) Mamadeira para dormir (2) Dormia/dorme com a mamadeira (3) Usa(va) a mamadeira várias vezes durante a noite	NOIT_____
26. A senhora costuma fornecer outros líquidos na mamadeira? (1) sim (2) não, copo com canudinho, se não, pule para X	LIQU_____
27. Com que freqüência faz uso da mamadeira com refrigerantes? (0) nunca usou (1) Menos de 1x/dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4) 5 a 6 x/dia (5) Mais de 6 x/dia	REFRI_____
28. Com que freqüência faz uso da mamadeira com sucos artificiais, naturais e/ou chás com açúcar ou similar (mel, açúcar mascavo)? (0) nunca usou (1) Menos de 1x/dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4) 5 a 6 x/dia (5) Mais de 6 x/dia	AÇUC_____
29. Com que freqüência faz uso da mamadeira com sucos naturais sem adição de açúcar ou similar (mel, açúcar mascavo)? (0) nunca usou (1) Menos de 1x/dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4) 5 a 6 x/dia (5) Mais de 6 x/dia	SAÇUC_____
30. Com que freqüência faz uso da mamadeira com água pura ou chá sem açúcar ou similar (mel, açúcar mascavo) ? (0) nunca usou (1) Menos de 1x/dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4) 5 a 6 x/dia (5) Mais de 6 x/dia /dia	AGUA_____
31. Com que freqüência seu filho(a) come doces, sobremesas? (0) não come (1) menos de uma vez por dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4))Mais de 4x/dia /dia	DOCE_____

E com relação ao uso da chupeta

32. Fez uso da chupeta? (0) sim (1) não, se não pule para questão 36	CHUP_____
33. Se sim, ainda usa? (0) sim (2) não	CHSN_____
34. Utiliza(va) doce (ex. mel) na chupeta? (0) nunca (1) algumas vezes (2) sempre	DOCE_____
35. Limpa(va) a chupeta na sua boca? (0) nunca (1) algumas vezes (2) sempre	BOCA_____

Agora algumas questões relacionadas a higiene bucal do seu filho

36. Com que idade foi iniciada a limpeza/escovação da boca dele(a)?meses (0) antes de um ano de idade (1) entre 1 e 2 anos (3) depois dos 2 anos de idade	LIMP_____
37. O que era usado para limpar? (0) escovas de dente (2) gaze, pano etc. (3) nada	USA_____
38. Quem executava a escovação da criança? (0) a criança sozinha (1) a criança com alguém olhando (2) com ajuda de um adulto (3) o adulto	QUEM_____
39. Atualmente, quem executa a escovação da criança? (0) a criança sozinha (1) a criança com alguém olhando (2) com ajuda de um adulto (3) o adulto	QUEMH_____
40. Quantas vezes os dentes da criança são limpos por dia? (0) menos de uma vez /dia	VEZES_____

(1/2/3/4 escrever o número de vezes) vezes/ dia	
41. Você usa pasta de dente (dentífrico) para limpar os dentes do seu filho? (0) sim (1) não, se não pule para a pergunta 45	PAST_____
42. Se sim, esta pasta de dente contém flúor? (0) sim (1) não	FLUOR_____
43. Do desenho a seguir, qual é a quantidade utilizada em cada escovação? (1) 1/3 das cerdas (2) 1/2 das cerdas (3) todas as cerdas	DOSE_____
	
44. Quantas vezes por dia você usa pasta de dente (no seu filho)? (0) menos de uma vez /dia (1/2/3/4 escrever o número de vezes) vezes/ dia	VEZPD_____
45. Você usa fio dental ou linha para limpar entre os dentes do seu filho? (0) sim (1) não	FIO_____
46. Se sim, quantas vezes por semana você usa o fio dental ou linha? (0) menos de uma vez/semana (1/2/3 escrever o número de vezes) vezes/ semana (10) uma vez por semana	VEZPS_____

Agora algumas questões relacionadas a tua saúde bucal

47. O que você acha da sua saúde bucal? (0) Excelente/Muito boa (1) Boa (2) Médio (3) Ruim	SAUD_____
48. Você tem alguma preocupação com seus dentes? (0) Muita (1) Alguma (2) Pouca (3) Nenhuma	DENT_____
49. Você sente/sentiu alguma dor causada pelos seus dentes? (0) Muita (1) Alguma (2) Pouca (3) Nenhuma dor	DOR_____
50. A sra. alguma vez consultou um dentista ? (0) sim (1) não	CONSU_____
51. Se sim, quando foi a última consulta?meses	ULT_____
52. Qual o motivo da consulta? (0) revisão (1) restauração/obturação (2) dor (3) retirar algum dente (4) aparelho (5) prevenção (6) outro motivo.....	MOTI_____
53. Quantas vezes a sua boca é limpa por dia ? (0) menos de uma vez /dia (1/2/3/4 escrever o número de vezes) vezes/ dia	VEZESM_____
54. Você usa pasta de dente (dentífrico) para limpar os seus dentes?(0) sim (1) não	PASTM_____
55. Quantas vezes por dia você usa pasta de dente ? (0) menos de uma vez /dia (1/2/3/4 escrever o número de vezes) vezes/ dia	VEZPDM-_____
56. Do desenho anterior, qual é a quantidade utilizada em cada escovação? (1) 1/3 das cerdas (2) 1/2 das cerdas (3) todas as cerdas	DOSEM_____
57. Você usa fio dental ou linha para limpar entre os dentes? (0) sim (1) não	FIOM_____
58. Se sim, quantas vezes por semana você usa o fio dental ou linha? (0) menos de uma vez/dia (1/2/3/4 escrever o número de vezes) vezes/ dia (10) uma vez por semana	VEZPSM_____
59. Com que frequência você come doces, sobremesas? (0) não come	DOCEM_____

(1) menos de uma vez por dia (2) 1 a 2x/dia (3) 3 a 4x/dia (4))Mais de 4x/dia /dia	
---	--

Algumas perguntas finais

60. Você recebeu alguma orientação de como fazer para que seu o filho(a) não tenha a doença cárie dentária? (1) Não (2) Sim	PREV_____
61. SE SIM, por quem? (1) dentista (2) pais (3) folder/palestra (4) obstetra	QUEM_____
62. Você sabia que as bactérias que causam a doença cárie são transmitidas da mãe para o filho? (1) Sim (2) Não	TRANS_____
63. Como a senhora acha que isto ocorre? (1) não sabe (1) saliva (2) sangue (3) placenta (4) outro.....	TCOMO_____

APÊNDICE D - FICHA CLÍNICA DA CRIANÇA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



CONDIÇÃO DE HIGIENE BUCAL

IPV (Índice de Placa Visível)

55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75

IPV=

Valores	Critério
0	Sem placa detectável clinicamente
1	Com placa detectável clinicamente

ISG (índice de Sangramento Gengival)

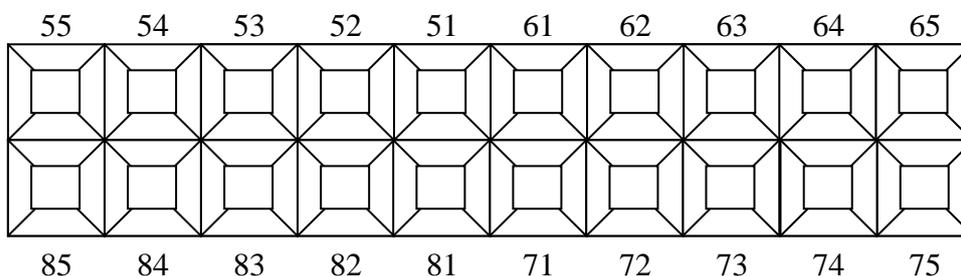
55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75

ISG=

Aparência	Sangramento	Valores
Normal	Sem sangramento	0
Mudança leve na cor e edema moderado com mudança desprezível na textura	Sem sangramento	1
Vermelhidão, hipertrofia, edema e brilho	Sangramento a sondagem/pressão	2
Marcada vermelhidão, hipertrofia, edema, ulceração	Sangramento espontâneo	3

CONDIÇÃO DENTÁRIA

ceos modificado/ ICDAS



Descrição dos códigos (ISMAIL et al., 2008)

0 Superfície Sadia

Não deve apresentar nenhuma evidência de cárie (nenhuma alteração nem mudança questionável na translucidez do esmalte após secagem com ar por 5 segundos).

Superfícies com defeitos de desenvolvimento como hipoplasia de esmalte, fluorose, alterações regressivas dos dentes (atrição, abrasão, erosão) e manchas intrínsecas e extrínsecas serão registradas como sadias.

1 Primeira mudança visível no esmalte

Quando visto molhado não deve apresentar nenhuma mudança de coloração atribuída à atividade do processo cárie dentária, mas após secagem com ar por 5 segundos uma opacidade de cárie é visível e incompatível com a aparência clínica do esmalte sadio.

2 Mudança perceptível visível no esmalte

Quando visto molhado apresenta uma opacidade de cárie ou discoloração não compatível com a aparência clínica do esmalte sadio (Nota: a lesão permanece visível quando seca). Esta lesão pode ser detectada quando vista diretamente pela vestibular ou lingual. Além disso, quando vista por oclusal, a opacidade ou discoloração pode ser vista como uma sombra limitada ao esmalte, vista pela crista marginal.

3 Perda inicial do esmalte devido à cárie sem dentina exposta

Uma vez seco por 5 segundos o esmalte apresenta perda de sua integridade, vista por vestibular ou lingual. Estas lesões também podem apresentar uma sombra de dentina discolorida embaixo da crista marginal.

4 Superfície não cavitada com uma sombra escurecida subjacente da dentina

A lesão aparece como uma sombra escurecida de dentina com uma aparência intacta da crista marginal, faces vestibular ou lingual de esmalte. A área escurecida é um sombreado intrínseco que pode aparecer com uma coloração acinzentada, azulada ou amarronzada.

5 Cavidade perceptível com dentina visível

Cavitação no esmalte opaco ou discolorado com dentina exposta de acordo com o julgamento do examinador.

6 Cavidade extensa perceptível com dentina visível

Perda evidente da estrutura dentária, a extensão da cavidade pode ser em profundidade ou largura e a dentina é claramente visível nas paredes de fundo e laterais. A crista marginal pode ou não estar presente. Uma cavidade extensa envolve pelo menos a metade da superfície dentária e possivelmente atingindo a polpa.

APÊNDICE E – FICHA CLÍNICA DA MÃE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



CONDIÇÃO DA HIGIENE BUCAL

IPV (Índice de Placa Visível)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Valores	Critério
0	Sem placa
1	Uma película de placa aderida a margem da gengiva livre e na área adjacente do dente. A placa só pode ser vista in situ com a aplicação de uma solução evidenciadora ou usando a sonda na superfície do dente.
2	Acúmulo moderato de depósito amolecido/macio dentro da bolsa gengival, ou no dente e margem gengival onde pode ser vista à olho nu.
3	Abundância de substância amolecida dentro da bolsa gengival e/ou sobre o dente ou margem da gengiva.

IPV=

ISG (Índice de Sangramento Gengival)

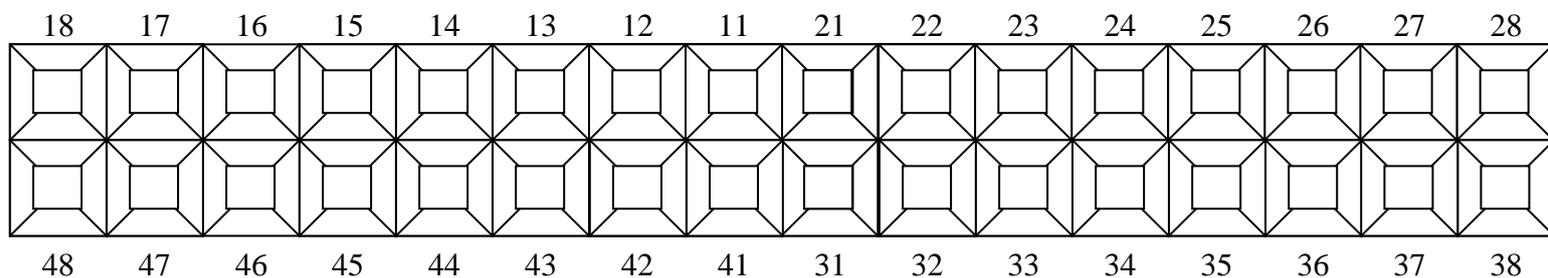
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Aparência	Sangramento	Valores
Normal	Sem sangramento	0
Mudança leve na cor e edema moderado com mudança desprezível na textura	Sem sangramento	1
Vermelhidão, hipertrofia, edema e brilho	Sangramento a sondagem/pressão	2
Marcada vermelhidão, hipertrofia, edema, ulceração	Sangramento espontâneo	3

ISG=

CONDIÇÃO DENTÁRIA

CPO-S modificado/ ICDAS



Descrição dos códigos (ISMAIL et al., 2008)

0 Superfície Sadia

Não deve apresentar nenhuma evidência de cárie (nenhuma alteração nem mudança questionável na translucidez do esmalte após secagem com ar por 5 segundos).

Superfícies com defeitos de desenvolvimento como hipoplasia de esmalte, fluorose, alterações regressivas dos dentes (atrição, abrasão, erosão) e manchas intrínsecas e extrínsecas serão registradas como sadias.

1 Primeira mudança visível no esmalte

Quando visto molhado não deve apresentar nenhuma mudança de coloração atribuída à atividade do processo cárie dentária, mas após secagem com ar por 5 segundos uma opacidade de cárie é visível e incompatível com a aparência clínica do esmalte sadio.

2 Mudança perceptível visível no esmalte

Quando visto molhado apresenta uma opacidade de cárie ou discoloração não compatível com a aparência clínica do esmalte sadio (Nota: a lesão permanece visível quando seca). Esta lesão pode ser detectada quando vista diretamente pela vestibular ou lingual. Além disso, quando vista por oclusal, a opacidade ou discoloração pode ser vista como uma sombra limitada ao esmalte, vista pela crista marginal.

3 Perda inicial do esmalte devido à cárie sem dentina exposta

Uma vez seco por 5 segundos o esmalte apresenta perda de sua integridade, vista por vestibular ou lingual. Estas lesões também podem apresentar uma sombra de dentina discolorida embaixo da crista marginal.

4 Superfície não cavitada com uma sombra escurecida subjacente da dentina

A lesão aparece como uma sombra escurecida de dentina com uma aparência intacta da crista marginal, faces vestibular ou lingual de esmalte. A área escurecida é um sombreado intrínseco que pode aparecer com uma coloração acinzentada, azulada ou amarronzada.

5 Cavidade perceptível com dentina visível

Cavitação no esmalte opaco ou discolorado com dentina exposta de acordo com o julgamento do examinador.

6 Cavidade extensa perceptível com dentina visível

Perda evidente da estrutura dentária, a extensão da cavidade pode ser em profundidade ou largura e a dentina é claramente visível nas paredes de fundo e laterais. A crista marginal pode ou não estar presente. Uma cavidade extensa envolve pelo menos a metade da superfície dentária e possivelmente atingindo a polpa.

ANEXO A - Índice de consumo de sacarose proposto por Noronha (2005):

<p>1ª. ETAPA</p>	<p>Identificação dos alimentos que contêm sacarose.</p>
<p>2ª. ETAPA</p>	<p>Valores numéricos serão atribuídos para o momento da ingestão da sacarose e para a consistência desse alimento.</p> <p style="text-align: center;">MOMENTO DA INGESTÃO</p> <p>Se a ingestão ocorrer durante as refeições principais (café da manhã, almoço, jantar) será atribuído o valor = 1; Se ocorrer nos intervalos das refeições, será atribuído valor = 2.</p> <hr/> <p style="text-align: center;">CONSISTÊNCIA:</p> <p>Não-pegajosa, isto é, não retentiva, será atribuído valor= 1, Pegajosa, valor = 2.</p>
<p>3ª. ETAPA</p>	<p>Todos os valores obtidos a cada dia serão somados. A média dos valores totais diários (soma dos valores totais obtidos em cada um dos três dias, dividida por 3) representará o índice de consumo de sacarose, que será considerado:</p> <p>SATISFATÓRIO se ≤ 7</p> <p>ou</p> <p>INSATISFATÓRIO se > 8.</p>