

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Maria Cristina Prado Vasques Cunha

**PREVALÊNCIA DE CÁRIE: RELAÇÃO COM
FATORES FÍSICO-QUÍMICOS SALIVARES E
FATORES DE VIRULÊNCIA DE
*Streptococcus mutans***

Taubaté
2018

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Maria Cristina Prado Vasques Cunha

**PREVALÊNCIA DE CÁRIE: RELAÇÃO COM
FATORES FÍSICO-QUÍMICOS SALIVARES E
FATORES DE VIRULÊNCIA DE
*Streptococcus mutans***

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de Concentração: Biologia Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Soleo Ferreira dos Santos

Taubaté
2018

**Ficha catalográfica elaborada pelo
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

C972p Cunha, Maria Cristina Prado Vasques
Prevalência de cárie: relação com fatores físico-químicos salivares e fatores de virulência de Streptococcus mutans / Maria Cristina Prado Vasques Cunha. -- 2018.
71 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos, Instituto Básico de Biociências.

1. Streptococcus mutans. 2. Fatores de virulência. 3. Cárie dentária. 4. Saliva. I. Universidade de Taubaté. II. Título.

CDD 617.601

Elaborada por Angela de Andrade Viana - CRB8/8111

MARIA CRISTINA PRADO VASQUES CUNHA

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Prado Scherma - Universidade de Taubaté/UNITAU

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito – Faculdade de
Pindamonhangaba/FAPI

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcos Augusto do Rego – Universidade do Vale do
Paraíba/UNIVAP

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão – Universidade de Taubaté/UNITAU

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Silvana Soleo Ferreira dos Santos – Universidade de
Taubaté/UNITAU

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família, base sólida da minha existência.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque sem a sua presença em minha vida não seria possível chegar até aqui.

À Universidade de Taubaté pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos pela orientação deste trabalho e por acreditar em mim.

Às queridas amigas Juliana Santos, Isabela Amêndola e Tais Browne de Miranda por todo carinho e suporte nas coletas e análises laboratoriais.

Às queridas alunas do curso de Odontologia Amanda Freitas Prieto, Larissa Brito Ribeiro e Rafaela Ayello Gome, pelo auxílio nas coletas e exame clínico.

À Profa. Dra. Maria Cecília Barbosa de Toledo pelo auxílio nas análises estatísticas, e por ter sempre me incentivado neste caminho acadêmico.

Às queridas Maitê, Cristiane e Marisa que me deram todo o suporte no Laboratório de Microbiologia – IBB/UNITAU e também pelas risadas diárias.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli por ceder o espaço do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Odontologia da UNITAU.

Ao Prof. Dr. Davi Aquino por auxiliar nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira e Dra. Patrícia Pimentel de Barros por possibilitarem o aprendizado dos testes moleculares específicos no laboratório de Biologia Molecular da UNESP – São José dos Campos.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Cárie dentária é uma doença multifatorial que vem sendo combatida ao longo dos anos, porém ainda permanece como um problema de saúde pública. *Streptococcus mutans* é considerado seu principal agente etiológico por sua capacidade de formar biofilme, produzir polissacarídeos extracelulares e ácidos. Variáveis relacionadas a este microrganismo como capacidade de aderência e produção de mutacinas, bem como fatores relacionados ao hospedeiro como a capacidade tamponante (CT) da saliva e a velocidade do fluxo salivar (FS) têm sido investigados para delinear sua real relação com a ocorrência da cárie dentária e possibilitar sua prevenção. O objetivo desse estudo foi detectar a presença de Ag I/II e produção de mutacinas em *Streptococcus mutans* recuperados de escolares de 12 anos e correlacionar estes fatores de virulência com prevalência de cárie nessa população. Foram também estudadas a relação entre o índice de cárie e os parâmetros salivares CT e FS. Participaram da pesquisa 94 escolares de quatro regiões periféricas do município de Taubaté, SP. Depois de aplicado um questionário foi realizado a avaliação clínica para o índice de CPO-D e coletada a saliva para análises do FS e CT de todos os indivíduos e para as análises moleculares (n= 82, PCR convencional) para a presença de cepas de *S. mutans* Ag I/II positivas ou negativas e detecção da capacidade de produzir mutacinas I, II e III. Setenta e seis escolares apresentaram positividade para *S. mutans*. Desses 65,8% apresentaram Ag I/II e 9,2% capacidade de produção de mutacina I. Não foram observadas correlações entre o índice de CPO-D e os fatores de virulência, Ag I/II (rô de Spearman=-0,054) e Mutacina I (rô de Spearman=0,064). Não foram encontradas cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas II e III na população estudada. Houve diferença significativa entre as regiões para o índice de CPO-D (p=0,0405), FS (p=0,0051) e CT (p<0,01), entretanto não foi observado resultado significativo para a correlação entre CPO-D e CT e entre FS e CT. Os escolares da Região Sul apresentaram menor média de CPO-D (1,4), os melhores índices de FS (4,7) e também relataram o maior número de escovações dentárias diárias (3 ou mais) e foram, em média, aqueles que tiveram as mais recentes visitas ao cirurgião dentista. Embora 65,8% das cepas clínicas de *S. mutans* detectadas possuíssem Ag I/II, não houve correlação com índice de cárie dos escolares. A velocidade do FS assim como a frequência de escovação e cuidados profissionais dos dentes influenciou na menor prevalência de cárie

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; fatores de virulência; cárie dentária; saliva

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial disease that has been combated over the years, but it still remains a public health problem. *Streptococcus mutans* is considered its main etiological agent for its ability to form biofilm, to produce extracellular polysaccharides and acids. Variables related to this microorganism as adhesion capacity and production of mutacins, as well as factors related to the host such as saliva buffer capacity (BC and salivary flow velocity (SF) have been investigated to delineate their real relation with the occurrence of dental caries and enable their prevention. The objective of this study was to detect the presence of Ag I/II and production of mutacins in *Streptococcus mutans* recovered from 12 year old schoolchildren and to correlate these virulence factors with prevalence of caries in this population. The relationship between the caries index and the salivary parameters BC and SF were also studied. A total of 94 students from four peripheral regions of the city of Taubaté, SP, participated in the study. After a questionnaire was applied, the clinical evaluation for the DMFT index and saliva were collected for SF and BC analyzes of all individuals and for the molecular analyzes (n = 82, conventional PCR) of the presence of *S. mutans* strains. positive or negative Ag I/II and detection of the ability to produce mutacins I, II and III. Seventy-six schoolchildren presented positivity to *S. mutans*. Of these, 65.8% presented Ag I/II and 9.2% mutacin I production capacity. No correlation was observed between the DMFT index and the virulence factors, Ag I/II (Spearman's $r_s = -0,054$) and mutacin I (Spearman's $r_s = 0.064$). Strains of *S. mutans* producing mutacins II and III were not found in the studied population. There was a significant difference between the regions for the DMFT index ($p = 0.0405$), SF ($p = 0.0051$) and BC ($p < 0.01$), but no significant result was observed for the correlation between DMFT and BC and between SF and BC. The children of the South Region had a lower mean DMFT (1.4), the better SF index (4.7) and also reported the highest number of daily toothbrushes (3 or more) and were, on average, those who had the most recent visits to the dental surgeon. Although 65.8% of the *S. mutans* strains detected had Ag I/II, there was no correlation with the caries index of the students. The SF speed as well as the frequency of tooth brushing and professional care influenced the lower prevalence of caries.

Keywords: *Streptococcus mutans*; virulence factors; dental caries; saliva

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO A. RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTIGENO I/II E PRODUÇÃO DE MUTACINAS POR *Streptococcus mutans* E PRESENÇA DE CÁRIE

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo. **29**

Tabela 2 - Tabela descritiva com os indivíduos participantes das diferentes regiões de estudo, de acordo com as variáveis: índice de CPO-D, presença (+) ou ausência (-) de *S. mutans* na saliva e presença (+) ou ausência (-) de cepas de *S. mutans* produtoras de Antígeno I/II, Mutacinas I, II e III. **30**

Tabela 3 - Presença ou Ausência de Antígeno I/II e Mutacina I em duas categorias de indivíduos: Com Cárie e Sem Cárie. **32**

Tabela 4 - Valores de dentes cariados, perdidos e obturados (%) em escolares das diferentes Regiões estudadas. **33**

Tabela 5 - Índice de CPO-D médio, presença ou ausência de cepas produtoras de Antígeno I/II (Ag I/II) e Mutacina I (Mut I) relacionado ao sexo em escolares de 12 anos de idade de Taubaté, SP, 2017. **35**

Tabela 6 - Valores dos testes estatísticos Mann-Whitney e Correlação de Spearman. **35**

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do *S. mutans* (479pb) isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 – controle positivo da reação, Coluna 3 a 13 – isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação. **36**

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene de antígeno I/II (942pb) em *S. mutans* isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 a 13 – isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação. **37**

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene de mutacina I (750pb) em *S. mutans* isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 a 13 – isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação. **38**

CAPÍTULO B. FLUXO SALIVAR E CAPACIDADE TAMPONANTE COMO INDICADORES DE SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM ESCOLARES

Figura 1 - Gráfico do índice de CPO-D de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste).	53
Figura 2. Gráfico do índice do FS de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste).	54
Figura 3 - Gráfico do índice da CT de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste).	55
Tabela 1 - Distribuição de frequência, CPO-D médio, segundo o sexo em escolares de 12 anos de idade de Taubaté, SP, 2017.	56
Tabela 2 - Categorias de velocidade do Fluxo Salivar dos escolares, em porcentagem, nas diferentes regiões estudadas.	57
Tabela 3 - Correlação entre Capacidade Tampão, velocidade de Fluxo Salivar e CPO-D.	58
Tabela 4 - Valores de dentes cariados, perdidos e obturados (%) em escolares das diferentes Regiões estudadas.	59
Tabela 5. Resultados da Capacidade Tampão de saliva das crianças com cárie e sem cárie (porcentagem de indivíduos).	60
Tabela 6. Frequência de escovação, segundo os escolares das diferentes Regiões estudadas.	61
Tabela 7. Última visita ao dentista segundo resposta dos escolares das diferentes Regiões estudadas.	62

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2. CAPÍTULOS.....	16
2.1 CAPÍTULO A.	16
2.2 CAPÍTULO B.....	39
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a doença humana mais prevalente, e os custos associados a ela são enormes (Keyes, 1960; Caulfield et al., 1993; Caulfield, 1997; Listl et al., 2015; Manji et al., 2018). Sua origem multifatorial é caracterizada pela desmineralização dos tecidos mineralizados que compõem o corpo dental, em decorrência de um desequilíbrio da microbiota residente da cavidade bucal pela presença frequente de carboidratos fermentáveis (Bowden & Hamilton, 1998; Marsh, 1999; Takahashi & Nyvad, 2011; Faustova et. al., 2018). Tal processo é potencializado quando se trata de um hospedeiro susceptível, cujos fatores que contribuam para a reorganização (Buischi & Axelsson, 1997, Grigalauskienė et. al., 2015) ou a “neutralização” (Seow, 1998) do biofilme dentário cariogênico sobre a superfície do dente não estejam sendo eficientes.

Embora seja possível que a atividade de cárie na dentição decídua seja diretamente dependente do aumento nos níveis de estreptococos do grupo mutans e do seu estabelecimento precoce na cavidade bucal (Köhler et al., 1988; Fujiwara et al., 1991), em um grupo pequeno de crianças afetadas por estes estreptococos, uma redução subsequente dos níveis bucais destes microrganismos parece estar acompanhada ao não desenvolvimento da doença (Mattos-Graner et al., 2001). Além disso, estreptococos do grupo do grupo mutans podem ser detectados em altos níveis até mesmo em crianças livres de cárie (Carlsson et al., 1985; Matee et al., 1993; Mattos-Graner et al., 2001).

Para estudos relacionados com a saúde bucal a saliva apresenta-se como um material de diagnóstico fácil de coletar, transportar e armazenar (Kubala et al., 2018). A saliva constitui um fator de extrema importância para a manutenção da homeostase na boca (devido ao conteúdo de componentes orgânicos e inorgânicos) (Kubala et. al., 2018). Também é responsável pela proteção da superfície das membranas mucosas contra fatores biológicos, mecânicos e químicos (Martínez-Delgado, 2013).

A composição da saliva se caracteriza por 99,5% de água, 0,3% de proteína e 0,2% de substâncias inorgânicas e orgânicas. Os constituintes inorgânicos mais comuns são sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloretos e carbonatos, enquanto os componentes orgânicos incluem amilases, peroxidases,

lipases, mucinas, lisozima, lactoferrina, calicreínas, cistatinas e hormônios (Dodds et. al., 2005).

Também possui capacidade tamponante, ou seja, se acidificarmos ligeiramente o ambiente, a saliva torna-se uma solução insaturada e formam-se hidrogenofosfatos de cálcio facilmente solúveis, o que diminui a suscetibilidade dos dentes à cárie quando o pH dessa secreção está entre 6,8 e 7,2, ela se torna uma solução saturada de fosfato de cálcio, o que resulta em remineralização rápida e eficaz do esmalte dentário. (Dodds et. al., 2005; Bretas et. al., 2008).

Dentre os componentes orgânicos que fazem parte da cavidade oral, é necessário destacarmos a presença de muitas espécies de microrganismos como bactérias e fungos. Esses microrganismos formam o que denominamos como microbiota bucal, estabelecendo relações ecológicas complexas entre si. A microbiota bucal pode ser dividida em quatro nichos principais, representados pelo biofilme dentário, sulco gengival, dorso da língua e mucosa da boca (Jorge, 2012, Grigaluskienė et. al., 2015).

Uma etapa importante na colonização bacteriana e no estabelecimento de muitos quadros infecciosos, relacionada a uma maior proteção contra o sistema imune e contra agentes antimicrobianos, é a formação de biofilme (Donlan & Costerton, 2002; Davies, 2003), que pode ser definido como aglomerado microbiano imerso em uma matriz de polissacarídeos extracelulares, que confere aderência e permite a multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre a superfície dos dentes, na presença de um substrato (Cvitkovitch et. al., 2003; Lopez et al., 2010).

Acredita-se que a matriz formada por polissacarídeos, na qual o biofilme fica embebido torna mais fácil a formação de microambientes mais ácidos que favorecem a sobrevivência de bactérias acidúricas e acidogênicas como *S. mutans*, *Actinomyces* e lactobacilos, e conseqüentemente ocorra a modulação da atividade microbiana, virulência e a patogênese da cárie dental (Alaluusua et al., 1996; Kamiya et al., 2005; Koo et al., 2013; Klein et al., 2015).

Por meio do processo conhecido como *quorum sensing* ocorre um aumento na produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras auto indutoras. Por conta do aumento da densidade bacteriana, essas moléculas auto indutoras podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que

regulam várias funções como motilidade, virulência, e até mesmo a produção de matriz exopolissacarídica (EPS) (Hoiby et al., 2011).

As espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* secretam várias proteínas extracelulares que podem estar envolvidas na colonização de superfícies orais, sendo importantes na segunda fase do desenvolvimento do biofilme dental e em atividades metabólicas que levam à iniciação da lesão de cárie dentária (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1985).

A patogenicidade de *S. mutans* está diretamente relacionada ao seu metabolismo (Lemos & Burne, 2008), ou seja, sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) e de tolerar o ambiente ácido (aciduridade). Tal fato pode tornar esta espécie significativamente mais numerosa no biofilme cariogênico (Lemos & Burne, 2008). É importante destacar que além dessas características, a aumentada capacidade de adesão e colonização da superfície dos dentes tornam *S. mutans* um importante agente etiológico da cárie (Banas & Vickerman, 2003).

A característica de adesão está intimamente relacionada ao consumo de sacarose, e é mediada principalmente pela ação de moléculas de adesão. A enzima glicosiltransferase (GTF) é responsável por metabolizar glucanos solúveis e insolúveis em água, dando origem à matriz, que permite a colonização bacteriana sobre a hidroxiapatita do dente, e o consequente estabelecimento da cárie dentária (Bowen & Koo, 2011). Esse processo também envolve as proteínas conhecidas como adesinas de superfície, da família de adesinas SpaP, também chamadas de antígenos I e II (Agl/II) ou de P1, além de proteínas de ligação a glucano (Gbps) (Banas & Vickerman, 2003; Banas, 2004).

O antígeno I/II não é importante apenas para a adesão inicial do *S. mutans* ao hospedeiro, mas também para a adesão entre bactérias e colonização secundária.

S. mutans também é capaz de produzir mutacinas, proteínas com ação bacteriostática, que inibem o crescimento de microrganismos competidores na cavidade oral, além de sua elevada habilidade em aderir ao dente e tolerar o estresse ácido. De acordo com sua estrutura química, as mutacinas podem ser classificadas em dois grupos: as lantibióticas (mutacinas I, II e III) e as não-lantibióticas (mutacinas IV e V) (Caufield et al., 1993).

Os Lantibióticos geralmente exercem sua atividade antimicrobiana apenas contra as espécies Gram-positivas, perturbando a integridade da membrana citoplasmática por meio da formação transitória de poros, que é, em alguns casos, facilitada pela ancoragem ao lipídio precursor do peptidoglicano II, inibindo a biossíntese da parede celular (Hécharde & Sahl, 2002; Twomey et al., 2002; Chatterjee et al., 2005; Patton & van der Donk, 2005; Bonelli et al., 2006; Breukink & de Kruijff, 2006)

As mutacinas I possuem o mais amplo espectro de atividade (Caulfield et al., 1985; Kreth et al., 2005; Nguyen et al., 2009) e sua produção é rigorosamente controlada por vias regulatórias complexas codificadas por 25 genes (Tsang et al., 2005). Essa proteína é termoestável e biologicamente ativa sob um amplo espectro de pH (4 a 10) (Novak et al., 1994; Qi et al., 2001; Tsang et al., 2005).

A mutacina II influencia o nível energético da célula por conta da inibição do desempenho de enzimas essenciais na produção de energia metabólica. Esta incluído no seu mecanismo de ação a despolarização transitória do potencial elétrico e do gradiente de pH transmembrana, bem como o esgotamento do estoque intracelular de ATP, levando a morte bacteriana sem a visualização de lise (Chikindas et al., 1995; Dufour et al., 2007).

A mutacina III é ativa especialmente contra patógenos resistentes a medicamentos, entre eles *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina. Essa mutacina, junto com as mutacinas I e II fazem parte da classe dos lantibióticos e apresentam potencial para serem utilizadas em terapias antibióticas devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas (Parrot et al., 1990, Kamiya et al., 2005).

A mutacina IV inibe o crescimento dos colonizadores primários da superfície dentária (estreptococcus bucais do grupo mitis) favorecendo, assim, a instalação do *S. mutans* (Qi et al., 2001; Hale et al., 2005; Kamiya et al., 2005; Kreth et al., 2005; Liu et al., 2013). Alguns pesquisadores acreditam que a capacidade de adsorção das moléculas dessa proteína à superfície da bactéria, por meio de receptores específicos, caracterizaria o fator responsável pelo seu reduzido espectro de ação (Merrit & Qi, 2012).

A mutacina V possui atividade antimicrobiana mais ampla, agindo principalmente em estreptococos mitis, lactococos e micrococcos (Galvão et al., 2017).

Além dos fatores de virulência, já citados neste texto, como a antígeno I/II e as mutacinas, muitos estudos sobre a saúde da cavidade oral utiliza propriedades físico-químicas como a Capacidade Tamponante da saliva (CT) e o Fluxo Salivar (FS) (Mandel et al., 1984; Moura et al., 2008; Jawed et al., 2011; Sakeeenabi & Hiremath, 2011; Mejía-Rubalcava et al., 2012; Martínez-Delgado et al., 2013; Castro et al., 2015). Os valores de CT indicam o equilíbrio no pH da saliva, que é mantido por sua vez pelo equilíbrio nas concentrações de tampões como o bicarbonato, ácido carbônico, ácido fosfórico e ureia, enquanto cálcio e fosfato estão envolvidos na remineralização dos dentes (Dodds et. al., 2005). A CT da saliva é um importante fator de resistência à cárie dental, já o FS controla a microbiota da cavidade oral por meio de ação mecânica, proporcionando uma limpeza nos dentes, e pode ser medida de forma estimulada e não estimulada. Os valores de FS podem nos mostrar a velocidade de produção e da viscosidade dos fluidos. Portanto, o FS assim como CT pode estar relacionado com o grau de ocorrência de cárie na população.

De acordo com acima exposto, este trabalho teve como objetivo detectar a presença dos genes codificadores para Ag I/II e mutacinas em *Streptococcus mutans* recuperados de escolares de 12 anos e correlacionar estes fatores de virulência com prevalência de cárie, por meio do índice de CPO-D, nessa população. Procurou também estabelecer relação entre o índice de CPO-D e os fatores físico-químicos salivares CT e FS.

2 CAPÍTULOS

2.1 CAPÍTULO A. RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTIGENO I/II E PRODUÇÃO DE MUTACINAS POR *Streptococcus mutans* E PRESENÇA DE CÁRIE

Enviado para Caderno de Saúde Pública (CSP – Qualis A2) no dia 04/07/2018.

RESUMO

O biofilme dentário é composto por um grupo heterogêneo de microrganismos que ao longo do tempo pode dar origem à doença cárie, cujo mais importante agente etiológico é *Streptococcus mutans*. Este microrganismo pode possuir variados fatores de virulência que o tornam mais capacitado para aderir ao dente (presença de antígeno I/II), formar biofilme, competir com outras espécies (produção de mutacinas) e causar a lesão cariosa. O objetivo desse estudo foi detectar a presença dos genes codificadores de Ag I/II e mutacinas em *S. mutans* recuperados de escolares de 12 anos e correlacionar estes fatores de virulência com a prevalência de cárie nessa população. Participaram da pesquisa 82 escolares de quatro regiões periféricas do município de Taubaté, SP. Foi realizada a avaliação clínica para o índice de CPO-D e coletada a saliva para análises moleculares (PCR convencional) para presença de cepas de *S. mutans* Ag I/II positivas ou negativas e detecção da capacidade de produzir mutacinas I, II e III. Setenta e seis escolares apresentaram positividade para *S. mutans*. Desses 65,8% apresentaram Ag I/II e 9,2% capacidade de produção de mutacina I. Não foram encontradas cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas II e III na população estudada. Não foram observadas correlações entre o índice de CPO-D e os fatores de virulência Ag I/II (rô de Spearman=-0,054) e mutacina I (rô de Spearman=0,064). A maior parte das cepas clínicas de *S. mutans* expressaram Ag I/II e, uma pequena parcela, a capacidade de produção de mutacina I, entretanto não houve correlação com o índice de cárie dos escolares.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, fator de virulência, aderência bacteriana, mutacina, cárie dentária

ABSTRACT

The dental biofilm is composed of a heterogeneous group of microorganisms that over time can give rise to caries disease, whose most important etiological agent is *Streptococcus mutans*. This microorganism may have a variety of virulence factors that make it more capable of adhering to the tooth (presence of I/II antigen), forming biofilm, competing with other species (mutacin production) and causing carious lesion. The objective of this study was to detect the presence of Ag I/II and production of mutacins in *S. mutans* recovered from schoolchildren of 12 years and to correlate these virulence factors with the prevalence of caries in this population. A total of 82 students from four peripheral regions of the city of Taubaté, SP, participated in the study. The clinical evaluation for the DMFT index and the saliva for molecular analyzes (conventional PCR) for the presence of *S. mutans* Ag I/II strains positive or negative and detection of the capacity to produce mutacins I, II and III. Seventy-six schoolchildren presented positivity to *S. mutans*. Of these, 65.8% presented Ag I/II and 9.2% mutacin I production capacity. No mutacin II and III producing strains were found in the study population. No correlation was observed between the DMFT index and the Ag I/II (Spearman's $r = -0.054$) and mutacin I (Spearman's $r = 0.064$) virulence factors. Most clinical strains of *S. mutans* expressed Ag I/II and, a small portion, the production capacity of mutacin I, however, there was no correlation with the caries index of the students.

Keywords: *Streptococcus mutans*, virulence factor, bacterial adherence, mutacin, dental caries

INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da OMS de 2003, a cárie dentária afeta de 60% a 90% das crianças e adultos em idade escolar, o que a torna uma das doenças mais comuns em todo o mundo¹. É uma doença multifatorial e *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico^{2,3,4;5}. O sucesso e estabelecimento de *S. mutans* depende de muitos fatores, os quais incluem fatores de virulência das cepas, microbiota competitiva, dieta, constituição genética, comportamento e imunidade do hospedeiro⁶.

A patogenicidade de *S. mutans* está diretamente relacionada ao seu metabolismo e sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) e de tolerar o ambiente ácido (aciduridade) e isso pode tornar esta espécie significativamente mais numerosa no biofilme cariogênico⁷, bem como a produção de mutacinas, que são proteínas antibacterianas (bacteriocinas) capazes de inibir o crescimento de outras bactérias Gram positivas genética e ecologicamente relacionadas.

De acordo com sua estrutura química, as mutacinas foram classificadas em dois grupos: as lantibióticas (mutacinas I, II e III) e as não-lantibióticas (mutacinas IV e V)^{8,9}.

No que diz respeito à capacidade de aderência, podemos salientar que *S. mutans* possui três proteínas de superfície de grande importância, que auxiliam na fixação às superfícies dentárias. Estes incluem glucosiltransferases (GTFs), proteínas de ligação a glucanos (GBPs) e antígeno I/II (AgI/II)¹⁰, também conhecidas como adesinas de superfície da família de adesinas SpaP.

A família de antígenos I/II são polipeptídeos associados à parede celular que se tornam amplamente distribuídos na superfície celular de muitos estreptococos¹¹. O antígeno I/II não é importante apenas para a adesão inicial de *S. mutans* ao hospedeiro, mas também para a adesão inter-bacteriana e colonização secundária. Além do envolvimento na formação do biofilme dentário, o Ag I/II parece ter um papel crítico na resposta inflamatória do hospedeiro, especialmente na periodontite¹².

Em se tratando do acompanhamento da saúde bucal, a verificação de dentes cariados, perdidos e obturados (Índice CPO-D) ainda é um método que, pela abrangência, é o mais aceito e recomendado pela Organização Mundial da

Saúde (OMS) para diferentes faixas etárias e, em especial, para crianças com idade escolar¹³.

Com base nos valores do índice CPO-D na idade de 12 anos, foi verificada uma consistente tendência de queda na prevalência da doença entre escolares no período de 1968 – 1996 no Brasil. Entre 1980 e 1996 a redução nos valores do índice CPO-D aos 12 anos foi da ordem de 57,8%¹⁴.

O mais recente levantamento epidemiológico de saúde bucal promovido pelo Ministério da Saúde confirmou essa tendência de declínio de cárie nos escolares brasileiros¹⁵. Entretanto, pouco se conhece sobre a relação entre esses índices nos municípios brasileiros, já que os dados publicados pelo Ministério da Saúde demonstram um panorama geral e não uma identidade de cada município. Ainda são poucos os estudos brasileiros sobre saúde bucal, no que se refere a prevalência de cárie, quando comparados a países desenvolvidos e ainda mais raros os estudos realizados por município.

De acordo com o exposto acima o presente estudo teve como objetivo detectar a presença de genes codificadores de Ag I/II e de mutacinas em *S. mutans* recuperados de escolares de 12 anos e correlacionar estes fatores de virulência com a prevalência de cárie nessa população.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) sob o protocolo no 60709416.4.0000.5501 e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Taubaté (UNITAU).

Foi realizado um estudo epidemiológico analítico transversal, cuja população foi constituída por um total de 82 escolares de 12 anos de idade, regularmente matriculados nas escolas urbanas da rede municipal de ensino de Taubaté-SP.

Para a escolha das escolas municipais, foi levada em consideração a divisão dos bairros em Regiões: Norte, Sul, Leste e Oeste. Foi escolhido um bairro representativo de cada uma das regiões: Parque Aeroporto (Norte); São Gonçalo (Sul); Água Quente (Leste) e Jardim Santa Tereza (Oeste). Todos os bairros

escolhidos se tratam de bairros de periferia de nível socioeconômico baixo e com acesso limitado a serviços odontológicos.

Após a seleção das escolas, também realizada por representatividade no bairro, foi requerida a autorização da Secretaria Municipal de Educação e, em seguida, foram feitos os primeiros contatos com os diretores das respectivas escolas para explicar como se daria o estudo proposto. Com o consentimento prévio dos diretores iniciou-se a seleção, por meio das listas de presença, de escolares de ambos os sexos. Em um contato prévio com os alunos selecionados foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais ou responsáveis diretos de acordo com a letra “a”, do item IV.3, da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e o Termo de Assentimento do Menor segundo a Resolução 466/12 Conselho Nacional de Saúde, para o consentimento do próprio aluno.

A coleta de dados foi realizada mediante um questionário prévio direcionada a cada escolar visando traçar o seu perfil em relação a gênero, escolaridade e prevenção em saúde bucal. A coleta de saliva foi realizada por meio da estimulação por mastigação de Parafilm® “M” (Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago IL, USA). Em procedimento prévio, o Parafilm® foi cortado em pequenos pedaços de 4cmX4cm e devidamente esterilizados em fluxo laminar com luz Ultra-Violeta (Fluxo laminar Veco, Campinas, SP) pelo período de 15 minutos para cada lado. As crianças foram orientadas a eliminar a secreção salivar sem degluti-la num frasco plástico milimetrado e esterilizado (tubo Falcon em Polipropileno graduado 15 mL), devidamente identificado. Os frascos foram recolhidos e fechados de forma hermética e acondicionados em caixas de isopor com Gelox®. No Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Taubaté, foi separado 1 ml de saliva para congelamento e estudo posterior.

O exame clínico intra-bucal de cada estudante foi feito por uma única examinadora, previamente calibrada, auxiliada por uma anotadora. Tal exame foi realizado por meio de inspeção visual, com o escolar sentado em uma cadeira, de frente para a examinadora em salas com boa iluminação, escolhidas de forma prévia pelo(a) diretor(a). Foram utilizados equipamentos de proteção individual (luvas, gorros, máscaras) e espátulas de madeira, gazes descartáveis e espelhos bucais.

Para a avaliação da prevalência de cárie dentária foi utilizado o Índice CPO-D, segundo critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Para verificar da presença de *S. mutans* e os fatores de virulência, 500 µL de cada amostra de saliva, descongelada a temperatura ambiente, foi homogeneizada (agitador de tubos tipo Vortex®, Phoenix, AP56, Araraquara, São Paulo, BR) e centrifugados por 10 minutos (4690×g). Após remoção do sobrenadante, 200µL de matriz comercial de extração e purificação de DNA (Instagene, Bio-Rad®) foram adicionados ao pellet formado. Após homogeneização por 10 segundos, o material foi mantido em banho-maria por 30 minutos a 56°C. O material foi novamente homogeneizado por 30 segundos e mantido por mais dez minutos em banho-maria a 100°C. A conclusão do processo de extração e purificação ocorreu pela homogeneização por 30 segundos e centrifugação (4690×g) por três minutos.

O método de PCR utilizado para a identificação da espécie de *S. mutans* foi baseado no protocolo descrito por Chen et al (2007)¹⁶.

A reação de amplificação para a detecção da presença do gene codificador de Antígeno I/II e capacidade de produzir mutacina I, II, III foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 10 a 20 ng de DNA, para amplificação foi utilizada o reagente GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega, São Paulo, BR), a ele foi adicionado 0,3 µL de cada iniciador (10 µM/µL). Os primers utilizados são descritos na Tabela 1.

As condições para a realização da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 s, anelamento de 60°C para *S. mutans* e 56°C para os demais primers por 45s, extensão de 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 10 min. Para isso foi utilizado o termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1,5% em TAE, corados com 0.5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualizados em um transiluminador UV (Gibco BRL, modelo TFX 20M, LIFE TECHNOLOGIES, EUA). Para o registro e arquivamento foi utilizado o sistema de foto documentação KODAK Digital Science.

Os dados foram tabulados e analisados pelo Software Estatístico SPSS com nível de significância 5%. O teste aplicado foi Mann Whitney para a

comparação entre duas variáveis independentes e o teste de Correlação de Spearman para a indicação de presença ou não de correlação entre as variáveis.

RESULTADOS

Setenta e seis escolares apresentaram positividade para *S. mutans*. Desses 65,8% apresentaram o gene codificador de Ag I/II e 9,2% capacidade de produção de mutacina I (Figuras 1, 2 e 3 e Tabela 2). Não foram encontradas cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas II e III na população estudada.

A presença ou ausência de antígeno I/II e mutacina I em indivíduos com e sem cárie pode ser observada na tabela 3.

A prevalência de cárie na população estudada (n=82) foi de 45,12% com média do CPO-D de 2,4. Os valores do CPO-D, por região, são apresentados na tabela 4.

Não foi observada relação entre o gênero dos escolares com as médias de CPO-D ($p=0,5054$) ou presença de Ag I/II ($p=0,935$) e mutacina I ($p=0,668$) (Tabela 5). Embora a região Leste tenha apresentado o maior índice de CPO-D (3,2), foi a única região a não apresentar escolares portadores de cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas I.

Não houve correlação entre o índice de CPO-D e a presença ou ausência de cepas de *S. mutans* com antígeno I/II e/ou capacidade de produzir mutacina I (teste não paramétrico para comparação de variâncias Mann-Whitney e o teste de Correlação de Spearman, Tabela 6).

DISCUSSÃO

O presente estudo não demonstrou correlação entre os índices de CPO-D e a presença ou ausência de cepas de *Streptococcus mutans* com o antígeno I/II. Não foram encontrados na literatura estudos que correlacionem o índice de CPO-D com Ag I/II, porém Yang et al., (2018)¹⁷ demonstraram que o Ag I/II mediou a interação entre *S. mutans* e *Candida albicans* e que a perda do gene, codificador do Ag I/II, resultou em redução significativa de *C. albicans* em biofilme in vitro e

em modelo invertebrado (*Drosophila melanogaster*) quando associado esses dois microrganismos.

De acordo com Sanui & Gregory (2009)¹⁸ o antígeno I/II parece ser crítico na formação inicial do biofilme, mas uma vez que o biofilme é estabelecido, o antígeno I/II passaria a não ter papel significativo. Também afirma que a presença de imunoglobulinas contra o Ag I/II indica um mecanismo de proteção^{10,19,20,21,22}, entretanto os microrganismos quando em biofilme podem se proteger do ataque imune do hospedeiro diminuindo a expressão do Ag I/II.

Os apontamentos sobre as quantidades de IgA na saliva e o seu papel na resposta imune na cavidade oral, somado ao papel do antígeno I/II na formação do biofilme, pode ser uma explicação para que não fosse observado influência da presença do gene codificador de Ag I/II nos valores do índice de CPO-D.

Em torno de 70 a 100% das cepas isoladas de *S. mutans* produzem ao menos um tipo de mutacina (Parrot et al., 1990; Kamiya et al., 2005) que variam quanto ao espectro de ação inibitória aos microrganismos.

A literatura reporta diferentes frequências de detecção dos genes codificadores de mutacinas; mutAI (29,1% a 53%), mutAII (<10% a 80%), mutAIII (12,7%) em *S. mutans* isolados a partir de biofilme dentário e/ou saliva humana^{9,23,24,25,26,27,28,29}.

Rodrigues et al., (2008)²⁸ em amostras de saliva de pré-escolares (4 a 5 anos de idade), relataram a presença das cepas produtoras de mutacina II em 60% do grupo dos indivíduos que apresentavam experiência de cárie e Valarini et al. (2009)²⁹ demonstraram a presença de 21,4% de cepas de *S. mutans* produtoras de mutacina I/III em uma população de 28 indivíduos adultos (18 a 34 anos) com experiência de cárie. Assim como no presente estudo, Rodrigues et al., (2008)²⁸ e Valarini et al. (2009)²⁹ não verificaram associação entre a presença dos genes das mutacinas e a experiência de cárie do participante.

A baixa frequência de cepas produtoras de mutacina I talvez esteja relacionada ao fator de transmissibilidade dessas cepas. Li et al., (2005)³⁰ realizaram um estudo com o objetivo de relacionar a presença dos genes estruturais de mutA (gene codificador de mutacinas) em cepas clínicas de *S. mutans* com a transmissão materna desses microrganismos. Em uma primeira etapa, foram isoladas duzentas cepas clínicas de *S. mutans* obtidas de vinte pares de mãe-filho chineses com o intuito de determinar os genótipos transmitidos

e não transmitidos verticalmente. As cepas com gene mutAI foram menos transmitidas das mães para os filhos do que as cepas que não apresentam o gene mutAI. Outro resultado demonstrado pelos mesmos autores e que corroboram com o presente estudo, foi a não amplificação dos genes de mutAII e mutAIII pelas amostras estudadas.

As baixas frequências de detecção de alguns desses genes estruturais revelam a existência de uma ampla diversidade genética no locus do gene mutA ou mesmo sua ausência nas amostras testadas^{23,30}.

Longo et al., (2003)²³, não verificaram uma associação entre o espectro inibitório da cepa produtora de mutacina e a incidência de cárie dentária, sugerindo que a produção desse fator de virulência pode não ser relevante para a capacidade da bactéria colonizar o hospedeiro e induzir a doença.

Assim como no presente estudo³¹ observou não haver diferença entre o número de crianças com ou sem experiência de cárie colonizada por genótipos de *S. mutans* produtores de mutacina, ou seja, a presença desse genótipo não influenciou no potencial de desenvolver a doença cárie, colocando em xeque a que a colonização por *S. mutans* produtores de mutacinas poderia indicar indivíduos mais susceptíveis à cárie dentária.

A falta dessa correlação positiva entre a experiência de cárie de crianças e adultos e a virulência relacionada ao Ag I/II e produção de mutacinas de *S. mutans* pode estar relacionada ao fato de que nem sempre a expressão de um gene acarreta a atividade da proteína decodificada²⁶ e também que as mutações genéticas podem alterar e impedir a atividade de certas mutacinas.

Os resultados do presente trabalho reforçam o conceito de que a doença cárie possui um caráter multifatorial^{32,33,34,35} e que cada pessoa tem seu próprio risco de cárie que é determinado pelo microbioma oral e sistema imunológico influenciado por fatores ambientais e genéticos³⁶.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos fatores que influenciam no risco de cárie ainda são estudados nos dias atuais, como a microbiota associada e seus fatores de virulência, composição da saliva, fluxo salivar, capacidade tamponante da saliva, hábitos de

escovação, visitas ao dentista, condição socioeconômica e presença de flúor na água de consumo. Essa biodiversidade determinada pela presença de todos os elementos que influenciam a fisiologia da cavidade bucal em condições naturais e mantem o equilíbrio. Portanto, não é tarefa simples entender o equilíbrio proporcionado por essa biodiversidade, com todos os elementos inseridos num processo complexo e, ao mesmo tempo dinâmico.

Não foi possível, no presente estudo, associar a presença do gene responsável pela codificação do antígeno I/II e da mutacina I, como fatores de risco de cárie para escolares de 12 anos.

REFERÊNCIAS

1. Faustova M. O., Ananieva M. M., Basarab Y. O., Dobrobolska O. V., Vovk I. M., Loban' G. A. (2018) Bacterial factors of cariogenicity (literature review). *Wiad Lek*, 71(2), 378-382.
2. Fontana, M. (2015) The clinical, environmental, and behavioral factors that foster early childhood caries: evidence for caries risk assessment. *Pediatr Dent* 37: 217– 225.
3. Banas, J. A.; Vlckerman, M. M. (2003) Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 14(2), 89-99.
4. Oppenheim, F. G., Salih, E., Siqueira, W. L., Zhang, W., & Helmerhorst, E. J. (2007). Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 22–50.
5. Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 7, 407–450.
6. Hajishengallis, E., Parsaei, Y., Klein, M. I., & Koo, H. (2017). Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Molecular Oral Microbiology*, 32(1), 24–34.
7. Lemos, J. A.; Burne, R. A. (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 154(11), 3247-3255.
8. Caufield, P. M., Cutter, G. R., Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 72(1), 37-45.

9. Qi, F., Chen, P., Caulfield, P. W. (2001). The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol*, 67(1), 15-21.
10. McCarlie, V. W., Hartsfield, J. K., Blum, J. S., González-Cabezas, C., Chin, J. R., Eckert, G. J., ... Gregory, R. L. (2013). Total IgA and IgA reactivity to antigen I/II epitopes in HLA-DRB1*04 positive subjects. *Open Journal of Immunology*, 3(3), 82–92.
11. Brady, L. J., Maddocks, S. E., Larson, M. R., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam, C. C., & Jenkinson, H. F. (2010). The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins: MicroReview. *Molecular Microbiology*, 77(2), 276–286.
12. Son, Y. O., Jeon, Y. M., Kim, Y. S., Park, S. S., Park, S. M., Kim, J. H., & Lee, J. C. (2012). *Streptococcus mutans* GS-5 antigen I/II stimulates cell survival in serum deprived-cultures through PI3K/Akt Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(5), 1724–1732.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Oral health surveys: basic methods. 4. ed. Geneva: ORH/EPID, 1997.
14. Narvai, P. C. (2000) Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciênc. Saúde Colet*, 5, 381-92.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116 p.: Projetos, Programas e Relatórios.
16. Chen, Z., Saxena, D., Caulfield, P.W., Yao, G, Miniq, W., Yihong, L. (2007). Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett*, 272(2), 154-162.
17. Yang, C., Scoffield, J., Wu, R., Deivanayagam, C., Zou, J., & Wu, H. (2018). Antigen I/II mediates interactions between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Molecular Oral Microbiology*, 0–3.
18. Sanui, T., & Gregory, R. L. (2009). Analysis of *Streptococcus mutans* biofilm proteins recognized by salivary immunoglobulin A. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 361–368.
19. Bolton R.W, Hlava G.L. (1982) Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children: correlation with dental caries activity. *J Dent Res.*, 61, 1225– 1228.

20. Challacombe S. J., Lehner T. (1976) Serum and salivary antibodies to cariogenic bacteria in man. *J Dent Res.*, 55, C139–C148.
21. Gregory R. L, Kindle J. .C, Hobbs L.C., Filler S.J., Malmstrom H.S. (1990) Function of anti-*Streptococcus mutans* antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiol Immunol*, 5, 181–188.
22. Cao, X., Fan, J., Chen, J. et al. J. Huazhong (2016) Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 36(6), 416-421.
23. Longo, P., Mattos-Graner, R., Mayer, M. (2003). Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(3), 144-149.
24. Kamiya, R. U., Napimoga, M. H., Holling, J. F., Gonçalves, R. B. (2005). Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* geonotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. *J. Med. Microbiol.*, 54(6), 599-604.
25. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., Qi, F. (2005) Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J. Bacteriol.*, 187(21), 7193-203.
26. Kamiya, R. U., Holfling, J. F., Gonçalves, R. B. (2008). Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. *J. Med. Microbiol.* 57(5), 626-35.
27. Kamiya, R. U., Taiete, T., Gonçalves, R. B.(2011) Mutacins of *Streptococcus mutans*. *Braz. J. Microbiol.*, 42, 1248-58.
28. Rodrigues, M. R., Maciel, S. M., Ferreira, F. B. A., Piovezan, A., Perializi, F. J. S., Poli-Frederico, R. C. (2008). Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. *Ciênc Odontol Bras.*, 11(4), 40-46.
29. Valarini, N., Piovezan, A., Braga, M. P., Ferreira, F. B., Poli-Frederico, R. C. (2009) Análise genético-molecular dos genes para sorotipo e mutacina em *Streptococcus mutans* em uma população adulta. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 11(3), 13-16.

30. Li, S., Liu, T., Xiao, X., Yang, D., Zhuang, H., Liu, Z. (2004). Detection of MutA genes in transmitted strains and nontransmitted strains of mutans streptococci. *Caries Res.*, 39, 417-21.
31. Napimoga, M. H., Höfling, J. F., Klein, M. I., Kamiya, R. U., Gonçalves, R. B. (2005) Transmission diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci.*, 47(2), 59-64.
32. Keyes, P. H. (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. *Arch. Oral Biol.*, 1, 304-20.
33. Bratthall, D. (1992). Caries, views and perspectives. *Scand. J. Dent. Res.*, 100(1), 47-51.
34. Bretas, L. P. (2008). Fluxo Salivar e Capacidade Tamponante da Saliva como Indicadores de Susceptibilidade à Doença Cárie. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(3), 289–293.
35. Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303.
36. Grigalauskiene R., Slabšinskiene E., Vasiliauskiene I. (2015) Biological approach of dental caries management. *Stomatologija*, 17(4), 107-12.
37. Kamiya, R. U., Napimoga, M. H., Rosa, R.T., Höfling, J. F. & Gonçalves, R. B. (2005). Mutacins production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. *Oral Microbiol Immunol.* 20, 20-24.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS. RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTIGENO I/II E PRODUÇÃO DE MUTACINAS POR *Streptococcus mutans* E PRESENÇA DE CÁRIE

Tabela 1. Primers utilizados no estudo.

Primer	Fragmento	*TF	Referência
<i>S. mutans</i>	F: TCGCGAAAAAGATAAACAAAC A R: GCCCCTTCACAGTTGGTTAG	479pb	Chen, et al. 2007
Antígeno I/II	F:AGTGCGAGTAAGGAAG R: TTCACCGCTGCCAAAT	942pb	**Este trabalho
Mutacina I/III	F: AGTTTCAATAGTTACTGTTGC R: GCCAAACGGAGTTGATCTCGT	750/450pb	Kamiya, et al. 2005 ³⁷
Mutacina II	F: AACGCAGTAGTTTCTTTGAA R: TTCCGTAAGTACATAGTGC	444 pb	Kamiya, et al. 2005 ³⁷

*TF = Tamanho do Fragmento

** Retirado do Gene Bank

Tabela 2. Tabela descritiva com os indivíduos participantes das diferentes regiões de estudo, de acordo com as variáveis: índice de CPO-D, presença (+) ou ausência (-) de *S. mutans* na saliva e presença (+) ou ausência (-) de cepas de *S. mutans* produtoras de Antígeno I/II, Mutacinas I, II e III

Indivíduo	Região	CPO-D	<i>S. mutans</i>	MutI	MutIII	MutII	AgI/II
1	N	0	+	-	-	-	+
2	N	2	+	-	-	-	+
3	N	2	+	-	-	-	+
4	N	5	-	+	-	-	-
5	N	0	+	+	-	-	+
6	N	6	+	-	-	-	-
7	N	0	-	-	-	-	-
8	N	1	-	-	-	-	-
9	N	4	+	-	-	-	+
10	N	2	-	-	-	-	-
11	N	0	-	-	-	-	-
12	N	1	-	-	-	-	-
13	N	1	-	-	-	-	-
14	N	6	-	-	-	-	-
15	N	4	-	-	-	-	-
16	N	2	-	-	-	-	-
17	S	0	-	-	-	-	-
18	S	0	+	-	-	-	+
19	S	2	+	-	-	-	+
20	S	2	+	+	-	-	+
21	S	0	+	-	-	-	+
22	S	1	+	-	-	-	+
23	S	0	+	-	-	-	-
24	S	0	+	-	-	-	+
25	S	8	+	-	-	-	+
26	S	2	+	-	-	-	+
27	S	0	+	-	-	-	+
28	S	0	+	-	-	-	+
29	S	1	-	-	-	-	-
30	S	0	+	-	-	-	+
31	S	0	+	-	-	-	+
32	S	1	+	-	-	-	+
33	S	1	+	-	-	-	-
34	S	6	+	-	-	-	+
35	S	0	+	-	-	-	-
36	S	0	+	-	-	-	+
37	S	0	+	-	-	-	-
38	L	0	+	-	-	-	+
39	L	3	+	-	-	-	+
40	L	13	+	-	-	-	-
41	L	8	+	-	-	-	-
42	L	0	-	-	-	-	-
43	L	5	+	-	-	-	+
44	L	2	+	-	-	-	+
45	L	0	+	-	-	-	+
46	L	2	+	-	-	-	-
47	L	1	-	-	-	-	-
48	L	8	+	-	-	-	-
49	L	10	+	-	-	-	+
50	L	2	-	-	-	-	-
51	L	0	+	-	-	-	+
52	L	3	+	-	-	-	-
53	L	0	+	-	-	-	+
54	L	3	-	-	-	-	-
55	L	4	+	-	-	-	+
56	L	5	+	-	-	-	+
57	L	6	+	-	-	-	+
58	L	0	+	-	-	-	+
59	L	3	+	-	-	-	+
60	L	2	+	-	-	-	-
61	O	2	+	-	-	-	-
62	O	0	+	-	-	-	+
63	O	1	+	-	-	-	-
64	O	5	+	+	-	-	+
65	O	3	+	+	-	-	+
66	O	3	+	-	-	-	+
67	O	2	+	-	-	-	+
68	O	5	+	-	-	-	+
69	O	0	+	-	-	-	-
70	O	1	+	-	-	-	+
71	O	0	+	-	-	-	+
72	O	7	+	+	-	-	+
73	O	0	+	+	-	-	+
74	O	6	+	-	-	-	+
75	O	0	+	-	-	-	+
76	O	6	+	-	-	-	+
77	O	2	-	-	-	-	-
78	O	0	+	-	-	-	+
79	O	4	+	-	-	-	+
80	O	1	-	-	-	-	-
81	O	2	+	-	-	-	+
82	O	0	+	-	-	-	-

Tabela 3. Presença ou Ausência de Antígeno I/II e Mutacina I em duas categorias de indivíduos: Com Cárie e Sem Cárie

	Livre de Cárie	Cárie Ativa
Presença de Ag I/II	19 (24,1%)	31 (39,2%)
Ausência de Ag I/II	9 (11,4%)	20 (25,3%)
Presença de Mutacina I	2 (2,44%)	5 (6,10%)
Ausência de Mutacina I	27 (32,92%)	48 (58,54%)

Tabela 4. Valores de dentes cariados, perdidos e obturados (%)I em escolares das diferentes Regiões estudadas

	Região Norte	Região Sul	Região Leste	Região Oeste	Valor de p
N	17	22	23	20	0,0405
Dentes Cariados (%)	47,05 (8)	36,36 (8)	43,48 (10)	55 (11)	0,8017
Dentes Perdidos (%)	11,76 (2)	0 (0)	13 (3)	25 (5)	0,0519
Dentes Obturados (%)	35,3 (6)	18,18 (4)	52,17 (12)	50 (10)	0,0846

Tabela 5. Índice de CPO-D médio, presença ou ausência de cepas produtoras de Antígeno I/II (Ag I/II) e Mutacina I (Mut I) relacionado ao sexo em escolares de 12 anos de idade de Taubaté, SP, 2017

Sexo	Ausência de Mut I	Ausência de Ag I/II	Presença de Mut I	Presença de Ag I/II	Média CPO-D	Valor de <i>p</i> CPO-D	Valor de <i>p</i> Mut I	Valor de <i>p</i> Ag I/II
Feminino	40	17	3	26	2,30	0,5054	0,668	0,935
Masculino	35	13	4	26	2,26			

Tabela 6. Valores dos testes estatísticos Mann-Whitney e Correlação de Spearman

	Ag I/II	Mut I
U de Mann-Whitney	669,000	67,500
Valor de p	0,635	0,483
Coefficiente de Correlação	-0,054	0,064

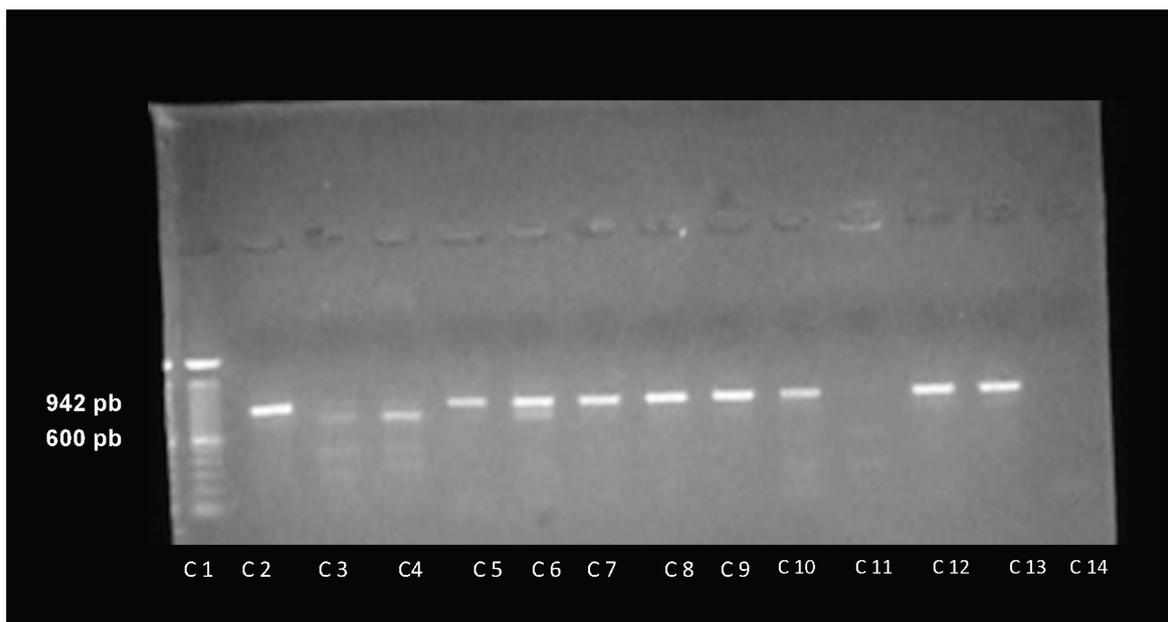


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do *S. mutans* (479pb) isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 – controle positivo da reação, Coluna 3 a 13 – isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação

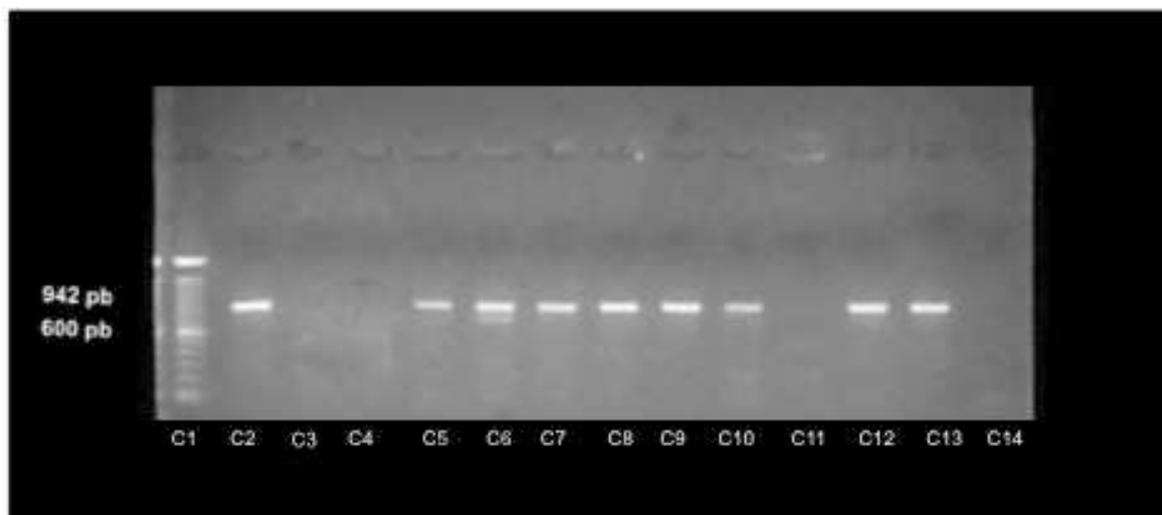


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene de antígeno I/II (942pb) em *S.mutans* isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 a 13 - isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação

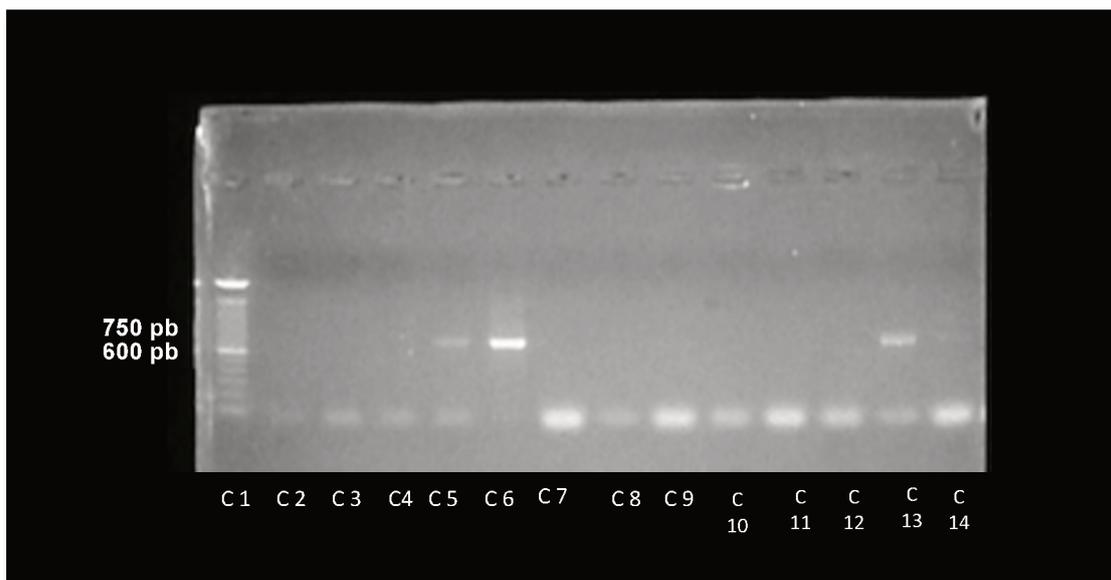


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene de mutacina I (750pb) em *S.mutans* isolados da saliva de escolares de 12 anos. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 1000 pb; Coluna 2 a 13 – isolado de amostra de saliva e Coluna 14 - controle negativo da reação

2.2 CAPÍTULO B. FLUXO SALIVAR E CAPACIDADE TAMPONANTE COMO INDICADORES DE SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM ESCOLARES

Enviado para Caderno de Saúde Pública (CSP – Qualis A2) no dia 04/07/2018.

RESUMO

A saliva é um biofluido que desempenha importante papel na saúde da cavidade oral por meio de seu fluxo e componentes como enzimas, glicoproteínas, tampões e anticorpos. Dentre as muitas patologias bucais está a cárie dentária, que ainda é um problema de saúde pública a ser vencido. Sem dúvida o índice CPO-D é um importante indicador de susceptibilidade, entretanto parâmetros simples e não invasivos como a velocidade do Fluxo Salivar (FS) e Capacidade Tamponante (CT) precisam ser melhor explorados para esta finalidade. Assim, o presente estudo teve como objetivo relacionar o FS e a CT com a incidência da doença cárie em crianças de 12 anos de idade matriculadas em escolas públicas do município de Taubaté, SP. A coleta de saliva para a medida de FS e CT, e índice de CPO-D foi realizada em 94 escolares de 12 anos de quatro regiões periféricas do município de Taubaté, SP. A prevalência de cárie na população estudada foi de 44% e o índice de CPO-D foi de 2,28. Houve diferença significativa entre as regiões para o índice de CPO-D ($p=0,0405$), FS ($p=0,0051$) e CT ($p<0,01$), entretanto não foi observado resultado significativo para a correlação entre CPO-D e CT e entre FS e CT. Índices suplementares como números de escovações por dia e última consulta ao dentista também foram descritas, e, demonstrando que os escolares da Região Sul apresentaram menor índice de CPO-D, maior número de escovações diárias e consultas mais recentes ao dentista. A população de escolares da Região Sul apresentaram os melhores índices de FS e CPO-D. Conclui-se que foi possível correlacionar indicadores como FS e CT com a prevalência de cárie e portanto o risco de cárie em escolares de 12 anos do município de Taubaté, SP.

Palavras-chave: saliva, cárie dental, escolares

ABSTRACT

Saliva is a biofluid that plays an important role in the health of the oral cavity through its flow and decomposers like enzymes, glycoproteins, buffers and antibodies. Among the many oral pathologies is dental caries, which is still a public health problem to be overcome. The DMFT index is undoubtedly an important indicator of the dental condition, however simple and non-invasive parameters such as Salivary Flow (SF) velocity and Buffer Capacity (BC) need to be better explored for this purpose. Thus, the present study had as objective to relate SF and BC with the incidence of caries disease in children of 12 years of age enrolled in public schools in the city of Taubaté, SP. The collection of saliva for SF and BC, and DMFT index was performed in 94 12-year-old schoolchildren from four outlying regions of the municipality of Taubaté, SP. The prevalence of caries in the study population was 44% and the DMFT index was 2.28. There was a significant difference between the regions for the DMFT index ($p = 0.0405$), SF ($p = 0.0051$) and BC ($p < 0.01$), but no significant result was observed for the correlation between DMFT and BC and between SF and BC. Additional indexes such as number of toothbrushes per day and last visit to the dentist were also described, and, showing that the students of the South Region had a lower rate of DMFT, a greater number of daily brushings and more recent dental appointments. The population of schoolchildren in the Southern Region presented the best indexes of SF and DMFT. It was concluded that it was possible to correlate indicators such as SF and BC with the prevalence of caries and therefore the risk of caries in 12-year-old schoolchildren from the city of Taubaté, SP.

Key-words: saliva, dental caries, school children

INTRODUÇÃO

A saliva é um biofluido de constituição complexa, formada por vários eletrólitos e substâncias orgânicas, secretada por todas as glândulas salivares e que umedece toda a cavidade bucal¹. Dentre os componentes da saliva, estão presentes importantes constituintes com função de defesa como a lisozima e os anticorpos, principalmente a IgA². Além do sistema de defesa há componentes como a mucina, que é responsável pela lubrificação e sinalização celular para a formação de barreiras químicas, assim como tampões salivares que evitam as lesões produzidas pelo excesso de ácidos³. Sendo assim, a saliva é um importante bioindicador da saúde da cavidade oral por meio de medidas como a capacidade tamponante da saliva (CT) e o fluxo salivar (FS)^{2,3}.

Os valores de CT indicam o equilíbrio no pH da saliva, que é dependente de concentrações de tampões como o bicarbonato, ácido carbônico, ácido fosfórico e ureia, que coordenam o processo de remineralização dos dentes³, desempenhando um importante papel na resistência à cárie dentária^{1,2}.

O FS auxilia no controle da microbiota oral por meio de ação mecânica. Banha dentes e mucosas proporcionando uma redução de microrganismos pelo processo de deglutição³.

Portanto, o FS assim como CT podem estar relacionados com a incidência de cárie na população^{4;2,3,5,6,7,8,9,10}.

Em se tratando do acompanhamento da saúde bucal do indivíduo, a verificação de dentes cariados, perdidos e obturados (Índice CPO-D) é um método que, pela abrangência, é o mais aceito e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para diferentes faixas etárias. A idade de 12 anos é especialmente importante por ser aquela em que geralmente deixa o Ensino Fundamental I, pois em muitos países esta é a última idade na qual uma amostra confiável pode ser facilmente obtida por meio do sistema escolar. Além disso, é provável que nessa idade todos os dentes permanentes exceto os terceiros molares tenham erupcionado (OMS, 2013)¹¹.

Com base nos valores do índice CPO-D na idade de 12 anos, foi verificada uma consistente tendência de queda na prevalência da doença entre escolares no Brasil entre o período de 1968 - 1996¹². Entre 1980 e 1996 a redução nos valores do índice CPO-D aos 12 anos foi da ordem de 57,8%¹³.

O mais recente levantamento epidemiológico de saúde bucal promovido pelo Ministério da Saúde confirmou essa tendência de declínio de cárie nos escolares brasileiros¹⁴. Entretanto, pouco se conhece sobre a relação entre esses índices nos municípios brasileiros, já que os dados publicados pelo Ministério Saúde demonstram um panorama geral e não uma identidade de cada município. Ainda são poucos os estudos brasileiros sobre saúde bucal quando comparados a países desenvolvidos e ainda mais raros os estudos realizados por município. É importante destacar que os trabalhos com índice de CPO-D, FS e CT têm sido cada vez mais escassos na literatura, mas muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas, já que cada população possui características particulares na prevalência de cárie.

De acordo com o acima exposto, o objetivo do presente estudo foi relacionar a capacidade tampão e o fluxo salivar com a prevalência da doença cárie em crianças de 12 anos de idade matriculadas em escolas públicas do município de Taubaté, SP.

METODOLOGIA

A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) sob o protocolo no 60709416.4.0000.5501 e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Taubaté (UNITAU).

Foi realizado um estudo epidemiológico analítico transversal cuja população foi constituída por adolescentes de 12 anos de idade, regularmente matriculados nas escolas urbanas da rede municipal de ensino de Taubaté-SP, nos meses de abril e maio de 2017.

De acordo com o Censo Escolar realizado no ano de 2016, o município de Taubaté-SP conta com 43 escolas municipais de Ensino

Fundamental, na área Urbana, e um total de 3.404 estudantes com idade na faixa dos 12 anos. A idade de 12 anos foi escolhida por se tratar de idade padrão para comparações internacionais e para controle de tendências da cárie ao longo do tempo.

Para a escolha das escolas municipais, foi levada em consideração a divisão dos bairros em Regiões: Norte, Sul, Leste e Oeste e com base nesse mapa, foi escolhido um bairro representativo de cada uma das regiões: Parque Aeroporto (Norte); São Gonçalo (Sul); Água Quente (Leste) e Jardim Santa Tereza (Oeste). Todos os bairros escolhidos se tratam de bairros de periferia de nível socioeconômico baixo e com acesso limitado a serviços odontológicos.

Após a seleção das escolas, também realizada por representatividade no bairro, foi requerida a autorização da Secretaria Municipal de Educação e, em seguida, foram feitos os primeiros contatos com os diretores das respectivas escolas para explicar como se daria o estudo proposto. Com o consentimento prévio dos diretores iniciou-se a seleção, por meio das listas de presença, dos escolares na idade de 12 anos completos, de ambos os sexos, matriculados regularmente. Em um contato prévio com os alunos selecionados foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais ou responsáveis diretos de acordo com a letra “a”, do item IV.3, da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e o Termo de Assentimento do Menor segundo a Resolução 466/12 Conselho Nacional de Saúde, para o consentimento do próprio aluno.

Foram excluídos do grupo de estudo os escolares que apresentavam dentição mista.

A coleta de dados foi realizada mediante um questionário prévio, direcionada a cada escolar visando traçar o seu perfil em relação a gênero, escolaridade e prevenção em saúde bucal. A coleta de saliva foi realizada por meio da estimulação por mastigação. Para cada criança foi fornecido um fragmento de Parafilm® “M”(Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago IL, USA) de 4 x 4 cm, previamente esterilizados por luz Ultra-Violeta (Fluxo laminar Veco, Campinas, SP). . As crianças foram orientadas a eliminar a saliva sem degluti-la num frasco plástico milimetrado e esterilizado (tubo Falcon em Polipropileno graduado 15 mL), devidamente identificado. Após

esse procedimento, o operador anotou o volume de saliva descontando a espuma eventualmente formada. Para cada participante foi calculado o Fluxo Salivar (FS) (mL/min). Os frascos foram recolhidos e fechados de forma hermética e acondicionados em caixas de isopor com Gelox® para evitar a alteração da composição salivar.

Para a avaliação da Capacidade Tamponante da saliva (CT) 1 mL de saliva foi adicionada em 3 mL de solução de HCl 0,005 N, agitado e o tubo foi mantido aberto durante dez minutos para remoção de CO₂. O pH foi medido em pHmetro (Quimis, Diadema, SP).

Para avaliação do número de dentes cariados, perdidos e obturados foi utilizado o Índice CPO-D, segundo critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde¹¹. O exame clínico intra-bucal de cada estudante foi feito por um único examinador, previamente calibrado auxiliado por um anotador, por meio de inspeção visual, com o escolar sentado em uma cadeira, de frente para a examinadora em salas com boa iluminação. O examinador utilizou luvas, gorros e máscaras descartáveis e o exame foi realizado com o auxílio de espátulas de madeira, gaze e espelhos bucais esterilizados.

Os dados foram tabulados e analisados pelo Software Estatístico Graph Pad Prism 5.5 com nível de significância 5%. Para a análise das variáveis Índice CPO-D, FS e CT foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis. Após a realização do Teste Kruskal Wallis foi aplicado o Teste de Mann Whitney para a visualização das relações que apresentavam significância; e para as correlações entre as variáveis foi realizada a Correlação de Spearman e Regressão Linear.

RESULTADOS

A prevalência de cárie na população total estudada foi de 44% e o índice de CPO-D foi de 2,28. Foi verificada diferença significativa com relação ao Índice CPO-D entre as escolas das diferentes regiões estudadas ($p=0,0405$). Houve diferença significativa entre as Regiões Sul e Leste ($p=0,0209$) e Região Sul e Oeste ($p=0,0310$). Os índices de CPO-D das escolas estudadas por bairro foram: Parque Aeroporto, região Norte, (CPOD

= 2,7); São Gonçalo, região Sul, (CPO-D = 1,4); Água Quente, região Leste, (CPOD = 3,2) e Jardim Santa Teresa, região Oeste, (CPO-D = 2,7) (Figura 1).

Foi realizada uma comparação entre as médias de CPO-D entre os sexos feminino (2,30) e masculino (2,26) utilizando Mann Whitney U test, porém não foi observada diferença significativa ($p=0,5054$) (Tabela 1).

Houve diferença significativa para o Fluxo Salivar (FS) ($p=0,0051$) entre a escola da região Leste (média=3,6) comparada as escolas das regiões Sul (média=4,7) e Norte (média=4,4) (Figura 2). A escola da região Oeste não apresentou diferença significativa para a variável FS (média=3,9) com relação às demais escolas.

Essa diferença estatística também pode ser observada quando categorizamos os alunos em FS normal (1 a 2 mL/minuto), FS acentuadamente diminuída (menor que 0,7 mL/minuto) e Xerostomia (menor que 0,1 mL/minuto) ($p=0,006$, Tabela 2.). A região Leste apresentou uma maior porcentagem (56%) de alunos com FS acentuadamente diminuído quando comparado com as demais regiões, Norte (10,04%), Sul (17,39%) e Oeste (26,09%).

Analisando-se os dados de CPO-D e FS é possível observar uma correlação entre as duas variáveis ($p=0,0833$, Tabela 3), ou seja, na escola da região Sul foi constatado um menor índice de CPO-D (1,4) e um maior valor para FS (4,7); enquanto que para a escola da região Leste foi observado um maior índice de CPO-D (3,2) e um menor valor para FS (3,6). Foi realizada também uma análise da porcentagem de cada parâmetro que compõe a CPO-D, dentes perdido, dentes cariados e dentes obturados (Tabela 4.).

Houve diferença significativa ($p<0,001$, Figura 3) para os valores de Capacidade Tampão (CT) entre todas as escolas, com exceção quando para a escola da região Sul com as escolas das regiões Leste e Norte ($p>0,05$). Para os valores de Capacidade Tampão (CT) não houve diferença significativa entre a escola da região Sul quando comparada as escolas das regiões Leste e Norte.

Entre as variáveis CT e CPO-D não foi observada uma correlação ($p=0,7500$), já que a escola da região Oeste apresentou o maior valor de CT

(5,1) e a escola da região Norte apresentou o menor valor de CT (3,2), mas ambas apresentaram uma mesma média de CPO-D (2,7). Também não houve correlação entre FS e CT ($p=0,1315$).

Apesar de não ter sido possível a visualização de uma diferença significativa na variável CT quando comparada aos valores obtidos entre as regiões, e também na correlação com a variável FS e CPO-D, quando foi realizado o agrupamento entre indivíduos levando em consideração as categorias da CT normal (pH entre 5 e 7), CT limite (pH de 4 a 5) e CT baixa (pH < 4)¹⁵, e comparado com os grupos de indivíduos Com Cárie e Sem Cárie, pode-se observar que um maior número de indivíduos do grupo Com Cárie se enquadram na categoria de CT baixa. Quando realizada a relação entre CT e CPO-D com os parâmetros que compõem o índice de CPO-D (dentes cariados, dentes perdidos e dentes obturados) separadamente, foi possível observar uma relação entre a CT e dentes perdidos. A população estudada na região Oeste apresentou o menor valor para a capacidade tampão (3,2) (Tabela 5.) e também a maior porcentagem de indivíduos com dentes perdidos (26,09%).

Os resultados quanto ao perfil do estudante no que diz respeito a saúde bucal (frequência da escovação e tempo decorrido desde a última consulta ao dentista) podem ser observados nas Tabelas 6. e 7. respectivamente.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo apresentam relevância, principalmente quando nos deparamos com a escassez de informação sobre os índices de cárie em diversos municípios brasileiros, o que reflete um problema em países em desenvolvimento, onde os dados sobre cárie para crianças de 12 anos são escassos^{16,17,18,8}. Além disso, os estudos epidemiológicos realizados em crianças no Brasil não apresentam uniformidade em relação aos critérios de diagnóstico e procedimentos amostrais, o que torna difícil estabelecer comparações. Quando encontramos tais dados na literatura, os mesmos se apresentam de forma

generalizada^{16,19}, como em perspectiva estadual^{20,21,22,23}, porém os municípios ainda precisam contribuir mais com a construção do panorama da prevalência e incidência de cárie.

Para o município de Taubaté, SP poucas foram as contribuições com relação à incidência de cárie nas escolas públicas^{24,25} sendo preciso levar em consideração que já se passaram 14 anos após o último estudo, onde não foram avaliadas as variáveis Fluxo Salivar (FS) e Capacidade Tamponante da saliva (CT).

Levando-se em consideração a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal realizada em 2010, foi encontrada uma média de CPO-D nacional de 2,1, e para o Estado de São Paulo de 1,4. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a escola da Região Sul foi a única a apresentar um Índice de CPO-D menor que a média nacional e igual à média do Estado de São Paulo. A prevalência de cárie encontrada na população de estudantes de 12 anos foi de 44%, sendo que a média nacional para prevalência de cárie relatada pela Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Projeto SBB Brasil 2010 foi de 53%. Porém, o valor encontrado no presente estudo ainda se encontra superior ao relatado para o estado de São Paulo, que foi de 37,6%. É importante destacar que o município de Taubaté está localizado no estado de São Paulo e faz parte do da Região Metropolitana do Vale do Paraíba, que apresentou em 2010 um Índice de Desenvolvimento Humano de 0,781, aproximando-se da faixa de Muito Alto Desenvolvimento Humano²⁷.

Apesar dos resultados do presente estudo demonstrar uma necessidade de redução do índice de cárie em comparação com os valores encontrados para o Estado de São Paulo, quando comparados os dados da última pesquisa no município de Taubaté, SP²⁵ com escolares também de regiões periféricas, com condição socioeconômica baixa e pouco acesso ao serviço odontológico, houve uma redução significativa do índice de CPO-D.

Cortelli et al, 2004²⁵ relataram uma CPO-D de baixo risco de cárie de 4,9, sendo que o maior valor para CPO-D encontrado no presente estudo foi de 3,2 (Região Leste). Porém, os índices das Regiões Norte, Leste e Oeste ainda se encontram acima da média nacional e estadual, demonstrando uma situação de fragilidade com relação à prevalência de cárie na população.

A região Sul se destacou pelo baixo índice de CPO-D (1,4) que pode também estar associado com a frequência de escovação das crianças, já que na região Sul foi observado uma maior frequência das escovações por dia (três a mais vezes por dia). Esta associação entre a frequência de escovação e o índice de cárie não foi encontrada nos estudos de Cypriano et al., 2011²⁸, mas corrobora com os estudos de Ismail & Woosung Shon, 2001²⁹ e Cortelli et al., 2004²⁵. Embora alguns autores²⁷ não deem destaque aos índices suplementares como a frequência de escovação e visitas recentes ao dentista pois se fundamentam no grau de confiança da resposta das crianças e/ou de seus pais, estes resultados no presente estudo mostram-se relevantes ao explicar o menor índice de cárie em escolares da Região Sul.

Os resultados das demais variáveis, FS e CT, apresentaram diferenças estatísticas entre as regiões estudadas. O FS é uma variável muito importante quando se trata de estudos de cárie na população, pois a saliva além de ser a primeira secreção que entra em contato com substâncias endógenas, desempenha um importante papel na manutenção da integridade dos tecidos dentais, devido a presença de cálcio, fósforo e outros íons inorgânicos, tornando o ambiente facilitador para a remineralização de lesões incipientes ou zonas desmineralizadas do esmalte.

Os valores de FS encontrados no presente trabalho, nas diferentes regiões estudadas, puderam demonstrar a importância dessa variável para o controle nos índices de cárie, já que o menor valor de FS foi relatado na Região Leste, mesma região em que foi encontrado o maior índice de CPO-D. O mesmo pode ser observado para a relação contrária, ou seja, o maior valor de FS foi relatado para a mesma Região na qual foi encontrado o menor índice de CPO-D, ou seja, a Região Sul. Com estes resultados, foi possível verificar uma correlação positiva entre estas duas variáveis, FS e índice de CPO-D. Estes resultados corroboram com os estudos de Bretas et. al., 2008³ e Moura et. al., 2008⁵.

Apesar de não ter sido observado correlação entre CT e o índice CPO-D, quando a análise dos parâmetros que compõe o índice de CPO-D foram analisados separadamente, observou-se que o maior número de dentes perdidos foi apresentado pelos alunos da escola localizada na região Leste, a mesma população de escolares que apresentaram o valor de CT mais baixo.

Esta relação pode ser explicada pelo fato de que crianças na faixa etária de 12 anos apresentam como a maior causa da perda de dentes a incidência de cárie. A incidência de cárie está diretamente relacionada com o aumento de microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* sp., que apresentam como principal característica a produção de ácido por meio do metabolismo de carboidratos^{30,31}. O aumento na incidência de cárie pode causar a perda do dente além de interferir no pH da cavidade oral, e conseqüentemente diminuir a CT da saliva.

Embora não tenhamos encontrado diferença estatística significativa entre os indivíduos com e sem cárie devemos considerar que o índice de CPO-D embora seja uma técnica mundialmente reconhecida e utilizada é um teste visual, portanto os indivíduos com ausência de cárie descritos nesse trabalho eventualmente poderiam ter cáries iniciais interproximais que somente poderiam ser detectadas por exames radiográficos.

A literatura tem evidenciado correlação positiva entre FS e CT^{17,18}, já no presente estudo não foi observado correlação entre o FS e CT ($p=1315$), o que corrobora com os resultados de Laine & Pienihakkinen (2000)³¹ e Bretas et. al., 2008³.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração que todas as Regiões selecionadas se tratam de bairros de periferia de nível socioeconômico baixo e que todo o município de Taubaté, SP recebe água fluoretada, conclui-se que o risco de cárie observada neste estudo pode estar correlacionado com o Fluxo Salivar (FS), Frequência de escovações diárias e com as visitas ao dentista. Sendo assim, os resultados relatados neste trabalho evidenciam correlações significativas entre o indicador físico-químico da saliva FS com os índices de CPO-D.

Este trabalho teve como ponto forte a pesquisa de fatores que podem estar relacionados diretamente com o risco de cárie., entretanto que futuros estudos correlacionando a condição da saúde bucal de escolares de diferentes regiões socioeconômicas, assim como estabelecer correlação com

outras variáveis, será válido para se obter uma leitura ainda mais representativa do risco de cárie na população de escolares de 12 anos do município de Taubaté, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kubala, E., Strzelecka, P., Grzegocka, M., Lietz-Kijak, D., Gronwald, H., Skomro, P., & Kijak, E. (2018). A Review of selected studies that determine the physical and chemical properties of saliva in the field of dental treatment. *BioMed Research International*, 1, 1-13.
2. Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: A review. *Journal of Dentistry*, 33(3), 223–233.
3. Bretas, L. P. (2008). Fluxo Salivar e Capacidade Tamponante da Saliva como Indicadores de Susceptibilidade à Doença Cárie. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(3), 289–293.
4. Mandel, M. J., York, N., & Sreebny, L. M. (1984). Salivary Flow and Dental Caries, *Rev. Odonto Ciênc*, 56–69.
5. Moura, C., Cavalcanti, A. L., & Bezerra, P. K. M. (2008). Prevalência de cárie dentária em escolares de 12 anos de idade , Campina Grande, Paraíba, Brasil : enfoque socioeconômico. *Rev. Odonto Ciênc.*, 23(3), 256–262.
6. Martínez-delgado, C. M. (2013). Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva, 15(6), 867–877.
7. Jawed, M., Shahid, S. M., Qader, S. A., & Azhar, A. (2011). Dental caries in diabetes mellitus: Role of salivary flow rate and minerals. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 25(3), 183–186.
8. Sakeenabi, B., & Hiremath, S. (2011). Dental caries experience and salivary Streptococcus mutans, lactobacilli scores, salivary flow rate, and salivary buffering capacity among 6-year-old Indian school children. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 1(2), 45.
9. Mejía-Rubalcava, C., Alanís-Tavira, J., Argueta-Figueroa, L., & Legorreta-Reyna, A. (2012). Academic stress as a risk factor for dental caries. *International Dental Journal*, 62(3), 127–131.

10. Castro, C., Bruzamolín, C. D., Duda, J. G., Brancher, J. A., Pizzatto, E., & Pizzatto, E. (2015). Epidemiological study to determine factors associated with dental caries in schoolers, 12(3), 5–12.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Oral health surveys: basic methods. 5. ed. Geneva: ORH/EPID, 2013.
12. Pinelli, C. (2000). Reprodutibilidade de um teste microbiológico para estreptococos do grupo *mutans*, *Pesq. Odont. Bras.*, 13–18.
13. Narvai, P. C., Biazevic, M. G. H., Junqueira, S. R., & Pontes, E. R. C. J. (2001). Diagnóstico da cárie dentária: comparação dos resultados de três levantamentos epidemiológicos numa mesma população. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 4(2), 72–80.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116 p.: Projetos, Programas e Relatórios.
15. Jorge AOC. Microbiologia e Imunologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier, 369p. 2012.
16. de Yankilevich, E. R., & Battellino, L. J. (1992). Prevalencia de la caries dental en escolares de nivel primario de una región metropolitana de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 26(6), 405–413.
17. Ramírez-Puerta, B. S., (2012) Molina-Ochoa, H. M., & Álvarez-Sánchez, L. G. (2013). Dental caries experience in permanent teeth in 12 year-old children of Andes municipality (Colombia), *CES Odontología*, 26(2), 11.
18. Patricia, C., Florentín, B., López, J. F., Florentín, J. M., Yanina, N., Ayala, G., Pérez, M. B. (2016). Artículos Original Salud bucal en nativos Maká de 12 a 15 años , Mariano Roque Alonso , Paraguay. *Revista de Odontopediatria Latinoamericana*, 6(1), 1-14.
19. Silva, J. V. da, Machado, F. C. de A., & Ferreira, M. A. F. (2015). As desigualdades sociais e a saúde bucal nas capitais brasileiras. *Ciência & Saúde Coletiva*, 20(8), 2539–2548.
20. Peres KGA, Bastos JRM, Latorre RDO. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev. Saúde Pública* 2000; 34(4):402-8.

21. Freysleben GR, Peres MAA, Marcenes W. (2000) Prevalência de cárie dentária e CPO-D médio em escolares de 12 e 13 anos nos anos de 1971 e 1997, região Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 34(3): 304-8.
22. Baldani M.H, Narvai P.C, Antunes J.L.F. (2002) Cárie dentária e condições socioeconômicas no Estado do Paraná, Brasil, 1996. *Cad. Saúde Pública*, 18, 755 - 63.
23. Lucas, S. D., Portela, M. C., & Mendonça, L. L. (2005). Variações no nível de cárie dentária entre crianças de 5 e 12 anos em Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(1), 55–63.
24. Prado, J. S., Aquino, D. R., Cortelli, J. R., & Cortelli, S. C. (2001). Condição dentária e hábitos de higiene bucal em crianças com idade escolar. *Revista Biociências*, 7(1), 63–69.
25. Cortelli, S. C., Cortelli, J. R., Prado, J. S., Aquino, D. R., & Jorge, A. O. C. (2004). Fatores de risco a cárie e CPOD em crianças com idade escolar. *Ciência Odontológica Brasileira*, 7(2), 75–82.
26. O'Sullivan, E.A & Curzon, M.E.J. (1999). Salivary Factors Affecting Dental Erosion in Children E.A. *Caries Research*, 34, 82-87.
27. IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONOMICA APLICADA. Cooperação brasileira para o desenvolvimento internacional (Cobradi) 2005-2009. Brasília: Ipea, 2010.
28. Cypriano, S., Hugo, F. N., Sciamarelli, M. C., Tôrres, L. H. do N., Sousa, M. da L. R. de, & Wada, R. S. (2011). Fatores associados à experiência de cárie em escolares de um município com baixa prevalência de cárie dentária. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(10), 4095–4106.
29. Ismail, A.I & Woosung, S. (2001) The impact of universal access to dental care on disparities in caries experience in children. *J. Am. Dent. Assoc.*, 132(3), 295- 303.
30. Thibodeau, E.A, O'Sullivan, D.M. (1996) Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. *C Dent Oral Epidemiol*, 24, 164–8.
31. Llana-Puy M.C, Montañãna-Llorens, C., Forner-Navarro, L. (2000) Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. *ASDC J Dent Child*, 67, 42–6.

FIGURAS E TABELAS. FLUXO SALIVAR E CAPACIDADE TAMPONANTE COMO INDICADORES DE SUSCEPTIBILIDADE À CÁRIE EM ESCOLARES.

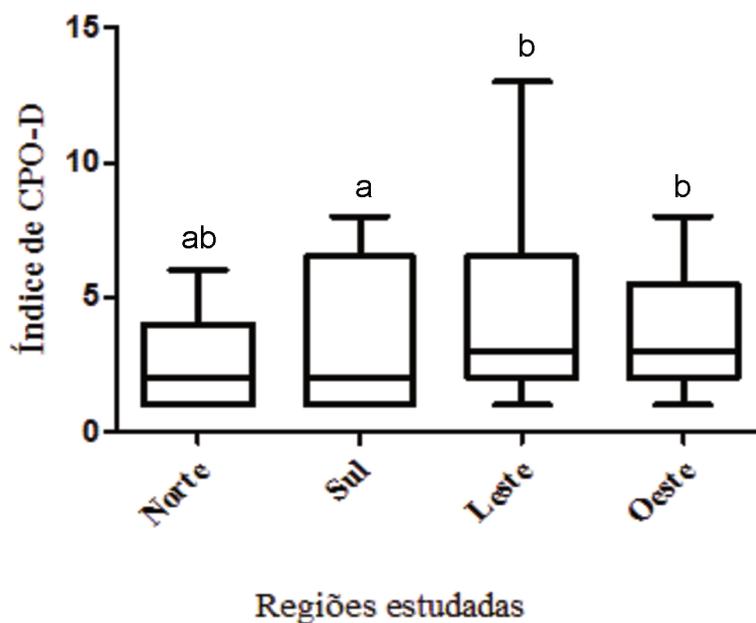


Figura 1. Gráfico do índice de CPO-D de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste)

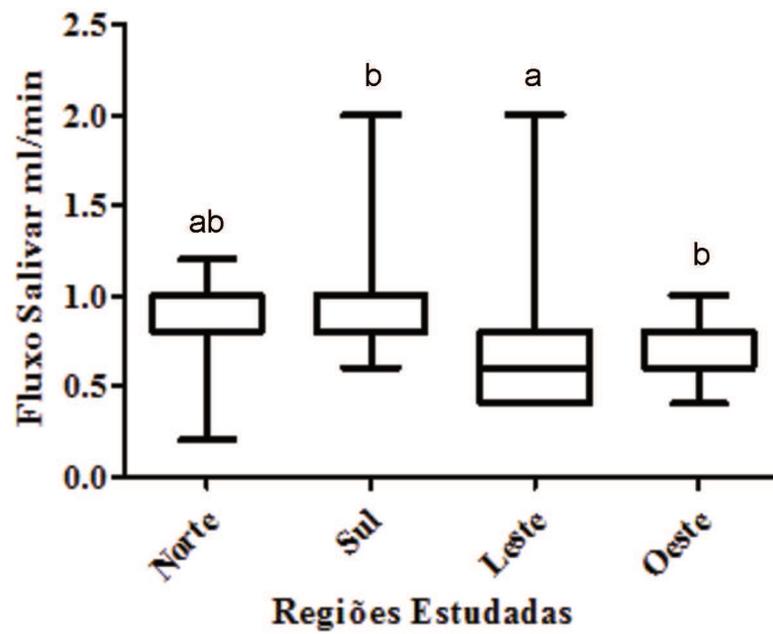


Figura 2. Gráfico do índice do FS de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste)

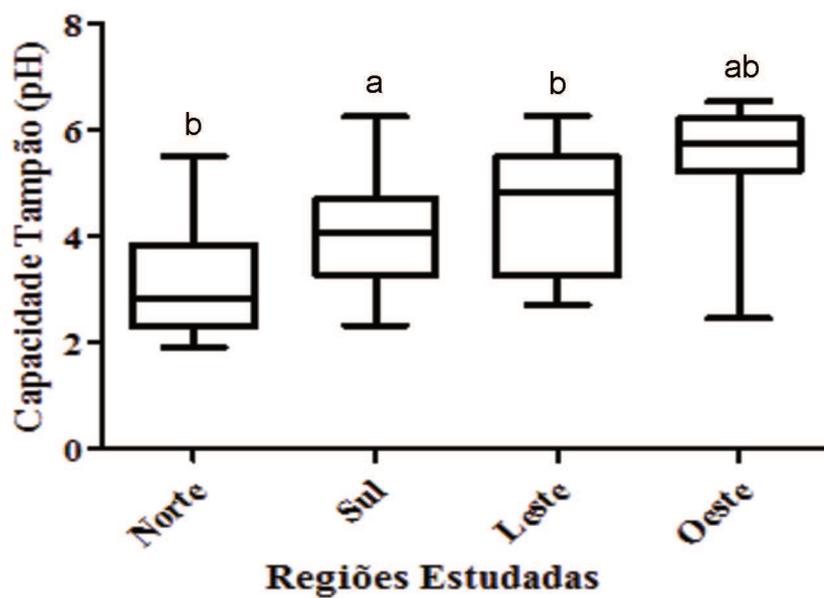


Figura 3. Gráfico do índice da CT de escolares de 12 anos nas Regiões estudadas (Norte, Sul, Leste, Oeste)

Tabela 1. Distribuição de frequência, CPO-D médio, segundo o sexo em escolares de 12 anos de idade de Taubaté, SP, 2017

Sexo	Média CPO-D	<i>p</i>
N	47	47
Feminino	2,30	0,5054
Masculino	2,26	

Tabela 2. Categorias de velocidade do Fluxo Salivar dos escolares, em porcentagem, nas diferentes regiões estudadas

	Região Norte	Região Sul	Região Leste	Região Oeste
N	23	23	25	23
Normal	89,96 (20)	82,61 (19)	44 (11)	73,91 (17)
Acentuadamente diminuída	10,04 (3)	17,39 (4)	56 (14)	26,09 (6)
xerostomia	0	0	0	0

$p = 0,006$ *categorização baseada em JORGE, 2012.

Tabela 3. Correlação entre Capacidade Tampão, velocidade de Fluxo Salivar e CPO-D

		Capacidade Tampão	CPO-D	Fluxo Salivar (ml/5min)
Capacidade Tampão	Coefficiente de Correlação de Spearman		0,3162	-0,9487
	Valor de p	1,00	0,7500	0,0833
CPO-D	Coefficiente de Correlação de Spearman	0,3162		-0,9487
	Valor de p	0,7500	1,00	0,0417
Fluxo Salivar (ml/5min)	Coefficiente de Correlação de Spearman	-0,9487	-0,9487	
	Valor de p	0,0833	0,0417	1,00
	N	94	94	94

Tabela 4. Valores de dentes cariados, perdidos e obturados (%) em escolares das diferentes Regiões estudadas

	Região	Região	Região	Região	Valor
	Norte	Sul	Leste	Oeste	de <i>p</i>
N	23	23	25	23	
Prevalência de cárie					
(%)	15,96 (9)	10,64 (9)	18,09 (12)	18,09 (12)	0,8017
Dentes Perdidos					
(%)	8,7 (2)	0 (0)	12 (3)	26,09 (6)	0,0519
Dentes Obturados					
(%)	34,78 (8)	21,74 (5)	48 (12)	26,09 (12)	0,0846

Tabela 5. Resultados da Capacidade Tampão de saliva das crianças com cárie e sem cárie (porcentagem de indivíduos)

Capacidade Tampão	Livre de Cárie (%)	Cárie Ativa (%)
Normal	38,10	40,50
Limite	35,70	14,30
Baixa	26,20	45,20

*categorização baseada no livro JORGE, 2012.

Tabela 6. Frequência de escovação, segundo os escolares das diferentes Regiões estudadas

	Menos que 3 vezes	3 vezes ou mais
Norte	15	8
Sul	08	15
Leste	20	3
Oeste	14	9

Tabela 7. Última visita ao dentista segundo resposta dos escolares das diferentes Regiões estudadas

	Nunca	6 meses ou mais	Menos de 6 meses
Norte	1	18	6
Sul	2	7	14
Leste	4	11	8
Oeste	1	14	8

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições estudadas (Capítulos A e B), foi possível perceber uma maior influência dos fatores físico-químicos e sociais na experiência de cárie por essa população. Os fatores de virulência relacionados às características genéticas não apresentaram nenhuma correlação positiva com os maiores índices de cárie, demonstrando que não se pode pautar o potencial de desenvolvimento da cárie apenas na presença de *Streptococcus mutans* ou na presença de cepas desse microrganismo produtores de fatores de virulência, como o antígeno I/II e as mutacinas, ratificando o caráter multifatorial dessa doença e demonstrando que, apesar do declínio nos índices da cárie na população brasileira, ainda há um longo caminho a se percorrer com relação à prevenção dessa doença.

Conclui-se que, para esta população o fluxo salivar, a frequência de escovação e as idas ao dentista tiveram maior relação com a prevalência de cárie nos escolares de 12 anos de escolas públicas do município de Taubaté (SP) do que os fatores de virulência Ag I/II e mutacinas I, II e III de *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

1. Alaluusua, S., Mattos, J., Grönroos, L., Innila, S., Torkko, H., Aisikainen, S., Jousimies-Somer, H., Saarela. Oral Colonization by more than one clonal Type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archs oral Biol.* 1996 41(2): 167-173.
2. Baldani M. H, Narvai P. C, Antunes J. L. F. Cárie dentária e condições socioeconômicas no Estado do Paraná, Brasil, 1996. *Cad. Saúde Pública*, 2002 18, 755-63.
3. Banas, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience*, 9: 1267-1277.
4. Banas, JA, Vlckerman, MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003 14(2), 89-99.
5. Bolton, RW, Hlava, GL. Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children: correlation with dental caries activity. *J Dent Res.* 1982 61, 1225– 1228.
6. Bonelli RR, Schneider, T., Sahl HG. & Wiedemann I. Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006 50: 1449–1457.
7. Bowen, WH, Koo, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*, 2011 45:69-86.
8. Bowden, GH., Hamilton, IR. Survival of oral bacteria. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1998 9(1), 54-85.
9. Brady, LJ., Maddocks, SE., Larson, MR., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam, CC., & Jenkinson, HF. The changing faces of *Streptococcus*

antigen I/II polypeptide family adhesins: MicroReview. *Molecular Microbiology*, 2010 77(2), 276–286.

10. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116 p.: Projetos, Programas e Relatórios.

11. Bratthall, D. Caries, views and perspectives. *Scand. J. Dent. Res.*, 1992 100(1), 47-51.

12. Bretas, LP. Fluxo Salivar e Capacidade Tamponante da Saliva como Indicadores de Susceptibilidade à Doença Cárie. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 2008 8(3), 289–293.

13. Breukink, E. & de Kruijff, B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006 5, 321–332.

14. Buischi YP. & Axelsson P. Controle mecânico de placa dental realizado pelo paciente,. In L. Kriger. *Aboprev. Promoção de saúde bucal*. Artes Médicas, São Paulo, 1997 115-127.

15. Cao, X., Fan, J., Chen, J. et al. J. Huazhong Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 2016 36(6), 416-421.

16. Carlsson, P., Olsson, B., Bratthall, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch. Oral Biol.* 1985 30, 265-268.

17. Castro, C., Bruzamolin, CD., Duda, JG., Brancher, JA., Pizzatto, E., & Pizzatto, E. Epidemiological study to determine factors associated with dental caries in schoolers, 2015 12(3), 5–12.

18. Caufield, PM., Cutter, GR., Dasanayake, AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 1993 72(1), 37-45.
19. Caulfield, PW., Childers, NK., Hansen, JB. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect. Immun.*, 1985 48: 51-56.
20. Caufield, PW. Dental caries: a transmissible and infectious disease revisited: A position paper. *Amer Acad Ped Dent.*, 1997 19: 491-498.
21. Challacombe SJ., Lehner T. Serum and salivary antibodies to cariogenic bacteria in man. *J Dent Res.*, 1976 55, C139–C148.
22. Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. & Van Der Donk, WA Biosynthesis and mode of action of lantibiotics . *Chem Rev* 2005 105, 633 – 684.
23. Chen, Z., Saxena, D., Caufield, PW., Yao, G, Miniq, W., Yihong, L. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett*, 2007 272(2), 154-162.
24. Chikindas ML., Novak J., Driessen, AJM., Konings WN., Schilling KM. & Caufield PW. Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 39: 2656–2660.
25. Cortelli, SC., Cortelli, JR., Prado, JS., Aquino, DR., & Jorge, AOC. Fatores de risco a cárie e CPOD em crianças com idade escolar. *Ciência Odontológica Brasileira*, 2004 7(2), 75–82.
26. Costerton JW, Lewandowski Z., Caldwell DE., Korber DR., *Microbial Biofilms*. *Annual Review of Microbiology*, 1995 49(7), 711–745.

27. Cvitkovitch, DG., Li, YH. & Ellen, RP. *Quorum sensing* and biofilm formation in *Streptococcal* infections. *J. Clin. Invest.* 2003 112, 1626–1632.
28. Cypriano, S., Hugo, FN., Sciamarelli, MC., Tôrres, LH. do N., Sousa, M. da LR. de, & Wada, RS. Fatores associados à experiência de cárie em escolares de um município com baixa prevalência de cárie dentária. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2011 16(10), 4095–4106.
29. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003 2(2), 114–122.
30. Dodds, MWJ., Johnson, DA., & Yeh, CK. Health benefits of saliva: A review. *Journal of Dentistry*, 2005 33(3 SPEC. ISS.), 223–233.
31. Donlan, RM.; Costerton, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002 15(2), 167-193.
32. Dufour, A., Hindré, T., Haras, D., Pennec JP. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007 31: 134-167.
33. Faustova MO., Ananieva MM., Basarab YO., Dobrobolska OV., Vovk IM., Loban' GA. Bacterial factors of cariogenicity (literature review). *Wiad Lek*, 2018 71(2), 378-382.
34. Fontana, M. The clinical, environmental, and behavioral factors that foster early childhood caries: evidence for caries risk assessment. *Pediatr Dent* 2015 37, 217–225.
35. Freysleben GR, Peres MAA., Marcenes W. Prevalência de cárie dentária e CPO-D médio em escolares de 12 e 13 anos nos anos de 1971 e 1997, região Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 2000 34(3), 304-8.

36. Fujiwara T., Sasada E., Mima N., Ooshima T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. *Community Dent oral Epidemiol.* 1991 19, 151-154.
37. Galvão, LCC., Rosalen, PL., Rivera-Ramos, I., Franco GCN., Kajfasz, J., Abranches, J., Bueno-Silva, B., Koo, H., Lemos, JA. *Mol Oral Microbiol*, 2017 32(2): 142-153.
38. Gregory RL, Kindle JC, Hobbs LC., Filler SJ., Malmstrom HS. Function of anti-*Streptococcus mutans* antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiol Immunol*, 1990 5, 181–188
39. Grigalauskienė R., Slabšinskienė E., Vasiliauskienė I. Biological approach of dental caries management. *Stomatologija*, 2015 17(4), 107-12.
40. Hajishengallis, E., Parsaei, Y., Klein, MI., & Koo, H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Molecular Oral Microbiology*, 2017 32(1), 24–34.
41. Hale, JDF., Heng, NCK., Jack, RW., Tagg, JR. Identification of nImTE, the Locus Encoding the ABC Transport System Required for Export of Nonantibiotic Mutacin in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 2005 187(4): 5036-5039.
42. Hamada, S., & Slade, HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 1980 44(2), 331–384.
43. Hechard, Y. & Sahl, HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 2002 84, 545–557.
44. Hoiby, N., Ciofu, O. Johansen, HK., Song, ZJ., Moser, C., Jensen, PO. The clinical impact of bacterial biofilms, *Int. J. Oral Sci.*, 2011 3, 55-65.

45. IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Cooperação brasileira para o desenvolvimento internacional (Cobradi) 2005-2009. Brasília: Ipea, 2010.
46. Ismail, AI & Woosung, S. The impact of universal access to dental care on disparities in caries experience in children. J. Am. Dent. Assoc., 2001 132(3), 295- 303.
47. Jawed, M., Shahid, S. M., Qader, SA., & Azhar, A. Dental caries in diabetes mellitus: Role of salivary flow rate and minerals. Journal of Diabetes and Its Complications, 2011 25(3), 183–186.
48. Jorge A.O.C. Microbiologia e Imunologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier, 369p. 2012.
49. Kamiya, RU., Holfling, JF., Gonçalves, RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. J. Med. Microbiol. 2008 57(5), 626-35.
50. Kamiya RU., Napimoga MH., Höfling JF., Gonçalves RB. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. Med. Microbiol, 2005 54(6), 599-604.
51. Kamiya, RU., Taiete, T., Gonçalves, RB. Mutacins of *Streptococcus mutans*. Braz. J. Microbiol., 2011 42, 1248-58.
52. Keyes, PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. Arch. Oral Biol., 1960 1, 304-20.
53. Klein, MI., Hwang, G., Santos, PHS., Campanella, OH., Koo, H. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015 5(10): 1-8.

54. Köhler, B., Jonsson, B., Andreén, I. The earlier the colonization of mutans streptococci the higher the caries prevalence. *Oral Microbiology and Immunology*, 1988 3(1): 1-14.
55. Koo, H., Falsetta, ML., Klein, MI. A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *Journal of Dental Research*, 2013 92(12):1065-1073.
56. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., Qi, F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J. Bacteriol.*, 2005 187(21), 7193-203.
57. Kubala, E., Strzelecka, P., Grzegocka, M., Lietz-Kijak, D., Gronwald, H., Skomro, P., & Kijak, E. A Review of selected studies that determine the physical and chemical properties of saliva in the field of dental treatment. *BioMed Research International*, 2018 1, 1-13.
58. Lemos, J. A.; Burne, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 2008 154(11), 3247-3255.
59. Li, S., Liu, T., Xiao, X., Yang, D., Zhuang, H., Liu, Z. Detection of MutA genes in transmitted strains and nontransmitted strains of *mutans* streptococci. *Caries Res.*, 2004 39, 417-21.
60. Liu YL, Nascimento M, Burne RA Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci* 2013 4:135-140.
61. Listl S., Galloway J., Mossey PA., Marcenes W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J Dent Res.*, 2015 94(10): 1355-61.
62. Llana-Puy MC, Montaña-Llorens, C., Forner-Navarro, L. Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. *ASDC J Dent Child*, 2000 67, 42-6.

63. Loesche, WJ. Nutrition and dental decay in infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1985 41(2), 423-435.
64. Longo, P., Mattos-Graner, R., Mayer, M. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiology and Immunology*, 2003 18(3), 144-149.
65. Lopez, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010 2, 398-404.
66. Lucas, SD., Portela, MC., & Mendonça, LL. Variações no nível de cárie dentária entre crianças de 5 e 12 anos em Minas Gerais , Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2005 21(1), 55–63.
67. Mandel, MJ., York, N., & Sreebny, LM. Salivary Flow and Dental Caries, 1984 69, 56–69.
68. Manji, F., Dahlen, G., Fejerskov, O. Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on their Aetiology. *Caries Research*, 2018 52, 548-564.
69. Martínez-Delgado, CM. Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva, *Rev. Salud Publica*, 2013 15(6), 867–877.
70. Mattos-Graner, RO., Li, Y., Caufield, PW., Duncan, M., Smith, DJ. Genotypic Diversity of Mutans Streptococci in Brazilian Nursery Children Suggests Horizontal Transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001 39(6): 2313-2316.
71. Marsh, PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent. Clin. North Am.*, 1999 43(4), 599-614.

72. Matee, MIN., Mikx, FHM., Soet, J. S., Maselle, SY., Graaff, J., van Palenstein, Helderma, WH. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. *Oral Microbiology and Immunology.*, 1993 8(5), 322-324.
73. McCarlie, VW., Hartsfield, JK., Blum, JS., González-Cabezas, C., Chin, JR., Eckert, GJ., Gregory, RL. Total IgA and IgA reactivity to antigen I/II epitopes in HLA-DRB1*04 positive subjects. *Open Journal of Immunology*, 2013 3(3), 82–92.
74. Mejía-Rubalcava, C., Alanís-Tavira, J., Argueta-Figueroa, L., & Legorreta-Reyna, A. Academic stress as a risk factor for dental caries. *International Dental Journal*, 2012 62(3), 127–131.
75. Merritt J, Qi F The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol Oral Microbiol*, 2012 27:57-69.
76. Moura, C., Cavalcanti, AL., & Bezerra, PKM. Prevalência de cárie dentária em escolares de 12 anos de idade , Campina Grande , Paraíba , Brasil : enfoque socioeconômico. *Rev. Odonto Ciênc.*, 2008 23(3), 256–262.
77. Napimoga, MH., Holfling, JF., Klein, MI., Kamiya, RU., Gonçalves, RB. Transmissivo diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci.*, 2005 47(2), 59-64.
78. Narvai, PC., Biazevic, MGH., Junqueira, SR., & Pontes, ERCJ. Diagnóstico da cárie dentária: comparação dos resultados de três levantamentos epidemiológicos numa mesma população. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2001 4(2), 72–80.
79. Nguyen, T., Zhang, Z., Huang, IH., Wu, C., Merrit, J., Shi, W., Qi, F. Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 2009 155: 551-556.

80. Nobbs, AH., Lamont, RJ., and Jenkinson, HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2009 7, 407–450.
81. Novak J., Caufield PW. & Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 1994 176: 4316–4320.
82. O'Sullivan, EA & Curzon, MEJ. Salivary Factors Affecting Dental Erosion in Children E.A. *Caries Research*, 1999 34, 82-87.
83. Oppenheim, FG., Salih, E., Siqueira, WL., Zhang, W., & Helmerhorst, EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007 1098, 22–50.
84. Patton, GC. & van der Donk, WA. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol*. 2005 8, 543–551.
85. Patricia, C., Florentín, B., López, J. F., Florentín, JM., Yanina, N., Ayala, G., Pérez, MB. Artículos Original Salud bucal en nativos Maká de 12 a 15 años , Mariano Roque Alonso, Paraguay. *Revista de Odontopediatria Latinoamericana*, 2016 6(1), 1-14.
86. Parrot, M., Caufield, PW. & Lavoie, MC. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol*. 1990 36: 123–130.
87. Peres KGA., Bastos JRM., Latorre RDO. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev. Saúde Pública*, 2000 34(4), 402-8
88. Pinelli, C. Reprodutibilidade de um teste microbiológico para estreptococos do grupo mutans Reproducibility of a simplified microbiological test for mutans streptococci, *Pesq. Odont. Bras.*, 2000 13–18.

89. Prado, JS., Aquino, DR., Cortelli, JR., & Cortelli, SC. Condição dentária e hábitos de higiene bucal em crianças com idade escolar. *Revista Biociências*, 2001 7(1), 63–69.
90. Qi, F., Chen, P., Caulifield, PW. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol*, 2001 67(1), 15-21.
91. Ramírez-Puerta, BS., Molina-Ochoa, HM., & Álvarez-Sánchez, LG. Dental caries experience in permanent teeth in 12 year-old children of Andes municipality (Colombia). *CES Odontología*, 2013 26(2), 11.
92. Rodrigues, MR., Maciel, SM., Ferreira, FBA., Piovezan, A., Perializi, FJS., Poli-Frederico, RC. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. *Ciênc Odontol Bras.*, 2008 11(4), 40-46.
93. Sakeenabi, B., & Hiremath, S. Dental caries experience and salivary *Streptococcus mutans*, lactobacilli scores, salivary flow rate, and salivary buffering capacity among 6-year-old Indian school children. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 2011 1(2), 45.
94. Sanui, T., & Gregory, RL. Analysis of *Streptococcus mutans* biofilm proteins recognized by salivary immunoglobulin A. *Oral Microbiology and Immunology*, 2009 24(5), 361–368.
95. Seow, WK. Biological mechanism of early childhood caries. *Community Dentistry Oral Epidemiology*, 1998 26(1), 8-27.
96. Silva, JV da, Machado, FC. de A., & Ferreira, MAF. As desigualdades sociais e a saúde bucal nas capitais brasileiras. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2015 20(8), 2539–2548.
97. Son, YO., Jeon, YM., Kim, YS., Park, SS., Park, SM., Kim, JH., & Lee, JC.

Streptococcus mutans GS-5 antigen I/II stimulates cell survival in serum deprived-cultures through PI3K/Akt Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012 113(5), 1724–1732. h

98. Stewart, PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996 40(11), 2517–2522.

99. Takahashi, N., & Nyvad, B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 2011 90(3), 294–303.

100. Thibodeau, EA, O'Sullivan, DM. Salivary *mutans* streptococci and dental caries patterns in pre-school children. *C Dent Oral Epidemiol*, 1996 24, 164–8.

101. Tsang, P., Merrit, J., Nguyen, T., Shi, W., Qi, F. Identification of genes with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. *Microbiology*, 2005 151: 3947-3955.

102. Twomey D, Ross RP, Ryan M, Meaney B, Hill C: (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165–185.

103. Valarini, N., Piovezan, A., Braga, MP., Ferreira, FB., Poli-Frederico, RC. Análise genético-molecular dos genes para sorotipo e mutacina em *Streptococcus mutans* em uma população adulta. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 2009 11(3), 13-16.

104. van Houte, J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res. Adv Dent Res*, 1993 7, 87–96.

105. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Oral health surveys: basic methods. 4. ed. Geneva: ORH/EPID, 1997.

106. Yang, C., Scoffield, J., Wu, R., Deivanayagam, C., Zou, J., & Wu, H. Antigen I/II mediates interactions between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Molecular Oral Microbiology*, 2018 0–3.

107. Yankilevich, E. R., & Battellino, L. J. Prevalencia de la caries dental en escolares de nivel primario de una región metropolitana de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 1992 26(6), 405–413.

ANEXO A. Documento de autorização por parte da Secretaria de Educação do município de Taubaté, SP para as coletas de saliva nas escolas.

 UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Departamento de Odontologia
Endereço: Rua dos Operários, 09, Centro, Taubaté-SP CEP: 12020-270
Contatos: (12) 3629-2130
E-mail: ccodonto@unitau.br
Link: www.unitau.br/odonto

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO
Protocolo N.º 11.039/2016
Data 23/07/16

Exm^a. Sra.
Profa. Dra. Edna Maria Querido de Oliveira Chamon
Secretária da Educação do município de Taubaté

Eu, Maria Cristina Prado Vasques Cunha, R.G 35.2019.937-9, aluna de Doutorado do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté, Subárea Biologia Odontológica, venho por meio desta solicitar de V. Sa. autorização para realização de avaliação dentária e coleta de saliva em alunos da rede pública municipal.

Dentro do meu projeto de Doutorado será realizada uma avaliação da prevalência de cárie e índice de CPO-D em escolares de 12 anos de escolas municipais urbanas no município de Taubaté, São Paulo. Um dos objetivos deste estudo será obter o perfil de saúde dentária dos escolares desta faixa etária no município.

Para tanto, será necessária a coleta de saliva de oitenta escolares de 12 anos de idade. A seleção das escolas participantes foi realizada considerando-se o perímetro urbano do município e equidistância geográfica, ou seja foi escolhida uma escola situada mais ao norte (EMIEF Ernesto de Oliveira Filho), uma mais ao sul (EMIEF Dr. Avedis Victor Nahas), uma mais a leste (EMIEF Vereador Mario Monteiro dos Santos) e uma mais a oeste (EMIEF Profa Docelina Silva de Campos Coelho). Em cada escola serão sorteados vinte alunos para a avaliação bucal e coleta de saliva.

Será encaminhado aos pais ou responsáveis o termo de consentimento e ao aluno o termo de assentimento (anexo) para a participação na pesquisa.

Esclarecemos que os procedimentos não acarretam qualquer dano a saúde dos alunos e como compensação, além da informação sobre presença ou ausência de cárie, fornecida aos responsáveis (modelo de notificação anexa), será oferecida uma palestra e orientação sobre Higiene Bucal a todos os alunos da escola, com sorteios de kits de higienização.

Scanned by CamScanner

A/C Coordenação fundamental
para pendências cabíveis.


Lino M. Queiroz de O. Campos
23/09/2016

De acordo com a
solicitação para que
a pesquisadora possa
incluir autorização
no Comitê de Ética
e Pesquisa.


Gabriela Antonia da Silva
Coord. do Ens. Fund.
Médio e Integral
RG 29.592.603-X

27/09/16

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Departamento de Odontologia
Endereço: Rua dos Operários, 09, Centro, Taubaté-SP CEP: 12020-270
Contatos: (12) 3629-2130
E-mail: seodonto@unitau.br
Link: www.unitau.br/odonto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro Responsável/Representante Legal:

Gostaríamos de obter o seu consentimento para o menor _____, participar como voluntário da pesquisa intitulada Prevalência de cárie em escolares do 7º ano das escolas públicas do município de Taubaté, SP., que se refere a um projeto de Doutorado da Profa Ma Maria Cristina Prado Vasques Cunha, docente da Universidade de Taubaté.

O objetivo deste estudo é realizar um levantamento da ocorrência de cárie e presença da principal bactéria causadora da cárie nos alunos das escolas públicas de Taubaté. Os resultados contribuirão para a montagem de um panorama da qualidade de escovação dos escolares e realizar orientação quanto ao cuidado com a higiene bucal.

A forma de participação consiste:

- Análise clínica da dentição, para a realização do levantamento da ocorrência de cárie.
- Estimulação de produção de saliva por meio de mastigação, para a coleta e análise em laboratório da presença da principal bactéria causadora de cárie.

RISCOS: a pesquisa não gera risco.

BENEFÍCIOS: os pais/ responsáveis terão conhecimento da saúde dentária do menor e serão orientados quando da necessidade de tratamento. Os alunos participantes ou não da pesquisa receberão orientação quanto a higiene bucal por meio de palestras, demonstrações, além de participarem de sorteio de kits de higiene bucal como incentivo.

O nome não será utilizado em qualquer fase da pesquisa, e ao divulgar os resultados garantimos que os voluntários não serão identificados.

A pesquisa não oferece nenhum risco ao aluno voluntário.



UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Departamento de Odontologia
Endereço: Rua dos Operários, 09, Centro, Taubaté-SP CEP: 12020-270
Contatos: (12) 3629-2130
E-mail: seodonto@unitau.br
Link: www.unitau.br/odonto

Não será cobrado nada e não estão previstos pagamentos para os voluntários.

Serão oferecidos os seguintes benefícios para o aluno participante:

- Orientação quanto a escovação correta

- Em caso de ocorrência de cárie, os pais serão informados e poderão optar pelo encaminhamento para tratamento na clínica Odontológica da Universidade de Taubaté.

Gostaríamos de deixar claro que a participação é voluntária e que poderá deixar de participar ou retirar o consentimento, ou ainda descontinuar a participação se assim o preferir, sem penalização alguma ou sem prejuízo de qualquer natureza.

Desde já, agradecemos a atenção e a participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Você ficará com uma cópia deste termo e em caso de dúvida(s) e outros esclarecimentos sobre esta pesquisa você poderá entrar em contato com o pesquisadores envolvidos.

PESQUISADORAS: Profa Ma. Maria Cristina Prado Vasques Cunha e Profa Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

ENDEREÇO DO CEP/UNITAU: Av. Tiradentes, nº 500, Bom Conselho, CEP: 12030-180.

TELEFONE PARA CONTATO COM AS PESQUISADORAS: 9090(12) 3635-3466.

Assinatura do Responsável pelo menor

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

ANEXO C. Termo de Assentimento do Menor

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa Prevalência de cárie e CPO-D em escolares de 12 anos de escolas municipais urbanas no município de Taubaté, São Paulo”. Seus pais permitiram que você participe. Queremos avaliar se você tem de cárie e quantas. Você e as demais crianças que irão participar dessa pesquisa deverão ter obrigatoriamente 12 anos completos. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita na EMIEF _____, onde as 20 crianças com 12 anos idade serão sorteadas, após o sorteio será feita análise dos dentes e logo depois será coletada a saliva por 05 minutos com estímulo (durante a mastigação de Parafilm). Os procedimentos de análise e coleta não causam nenhum risco para a sua saúde.

Mas há coisas boas que podem acontecer como você ter conhecimento sobre a sua saúde bucal; e caso haja a presença de cárie faremos as recomendações necessárias.

A coleta será realizada na escola na qual você estuda, sendo assim não haverá gasto algum com relação ao seu deslocamento para participar da pesquisa.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa levaremos os resultados à sua escola e por meio da diretora você e seus pais terão conhecimento dos mesmos. Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou a pesquisadora Maria Cristina Prado Vasques Cunha no telefone 9090 (12) 3635-3466.

Eu _____ aceito participar da pesquisa Prevalência de cárie e CPO-D em escolares de 12 anos de escolas municipais urbanas no município de Taubaté, São Paulo. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém irá se aborrecer. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Taubaté, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

ANEXO D. Questionário

Nome: _____ Ficha nº: _____

1- Sexo:

 Masculino Feminino

2- Qual a última vez que foi ao dentista?

1 mês atrás 3 meses atrás 6 meses atrás
1 ano atrás Nunca Mais de 1 ano atrás

3- Quantas vezes escova os dentes por dia?

0 1 2 3 Mais de 3 vezes

4- Toma algum medicamento?

Não Sim Qual? _____

5- Está tomando ou tomou antibiótico recentemente?

não Sim Há quanto tempo? _____

6- Consome Yakult, Activia ou outro logurte probiótico?

Nunca As vezes Diariamente 3x por semana