



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

LAIS FERNANDA FONSECA RIBAS

**Influência de fatores ambientais e dos níveis de
microrganismos potencialmente cariogênicos no
desenvolvimento da cárie precoce da infância**

ARAÇATUBA – SP

2015

LAÍS FERNANDA FONSECA RIBAS

**Influência de fatores ambientais e dos níveis de
microrganismos potencialmente cariogênicos no
desenvolvimento da cárie precoce da infância**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Odontologia.

Orientador: Profa. Ass. Dra. Cristiane Duque

ARAÇATUBA – SP

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Luzia, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, obrigada pelo carinho e apoio dado ao longo da minha vida para que tudo que tenho planejado possa ser realizado. Pai, obrigado por seu incentivo para a realização dos meus ideais, encorajando-me a enfrentar todos os momentos difíceis da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nestes cinco anos de formação acadêmica me sustentou e me trouxe forças, mesmo estando longe da família e amigos.

Aos meus pais Luzia e Paulo e irmão Jean, pelo apoio incondicional.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas do diretor e vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, administração e corpo docente pela oportunidade, suporte acadêmico e o conhecimento transmitido.

A minha Orientadora, Cristiane Duque, pela paciência, dedicação, e incentivo que muito me auxiliou para realização deste Trabalho. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma humana que conduziu a minha Iniciação Científica e orientação de trabalho de conclusão de curso.

A todos os meus colegas do curso e de laboratório, que de alguma maneira, tornaram minha vida acadêmica mais fácil e mais alegre.

A amiga e companheira das atividades realizadas nas creches e laboratório, Natália Colombo, pela paciência, dedicação e esforço para que este trabalho fosse concluído.

Às crianças, pais e professoras das creches que nos receberam com carinho e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (processo 2013/12167-7) por dois anos e auxílio-pesquisa (2012/19235-5) necessários para a realização deste trabalho.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

Ribas, L.F.F. **Influência de fatores ambientais e dos níveis de microrganismos potencialmente cariogênicos no desenvolvimento da cárie precoce da infância.** 2015. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

A cárie precoce da infância (CPI) é uma infecção microbiana que pode afetar severamente a dentição de crianças jovens. Os objetivos desse estudo foram avaliar a influência de fatores ambientais (dieta, higiene, condições socioeconômicas e culturais) e dos níveis de microrganismos potencialmente cariogênicos no desenvolvimento da CPI. Crianças de 36 a 60 meses foram selecionadas para participarem do estudo. Elas foram distribuídas em: grupo crianças livres de cárie (LC, n=32), grupo CPI (n=25) e grupo CPI severa (CPI-S, n=33). Amostras de saliva e biofilme foram coletadas das crianças para comparar os níveis de estreptococos grupo mutans e de lactobacilos utilizando o método de cultura. A saliva também foi analisada por PCR quantitativo (qPCR) para detecção e quantificação dos seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp. Dados sobre dieta, higiene, condições socioeconômicas e culturais foram obtidos por meio do preenchimento do questionário e diário de dieta com os responsáveis pela criança. Os dados foram analisados estatisticamente, considerando $p \leq 0.05$. Os resultados obtidos mostraram que as crianças com CPI-S apresentaram significativamente menor renda familiar e menor nível cultural do responsável. Quanto à dieta, as crianças com CPI-S apresentaram maior tempo de amamentação materna e maior idade no início da amamentação artificial. Os dados microbiológicos mostraram maior contagem de estreptococos grupo mutans na saliva e biofilme das crianças com CPI-S em comparação com os demais grupos. Também foi notado por qPCR maior prevalência e quantidade das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva das crianças com CPI-S. Não houve diferença entre os grupos para os níveis de lactobacilos por cultura e por qPCR. Conclui-se que os fatores de risco sócio-econômico-culturais, amamentação e níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* influenciaram na severidade da CPI.

Palavras-chaves: cárie precoce da infância, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*.

Ribas, L.F.F. **Influence of environmental factors and the levels of potentially cariogenic microorganisms in the development of the early childhood caries.** 2015. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Early childhood caries (ECC) is a microbial infection that can severely affect the teeth of young children. The objectives of this study were to evaluate the influence of environmental factors (diet, hygiene, socioeconomic and cultural conditions) and the levels of potentially cariogenic microorganisms in the development of the ECC. 36 to 60 month-old children were selected to participate in this study. Children were grouped into: Caries Free group (CF, n=32), ECC group (n=25) and severe ECC group (S-ECC, n=33). Saliva and dental biofilm samples were collected from children to compare the levels of mutans streptococci and lactobacilli using culture method. Saliva was also evaluated to detect and quantify the following microorganisms: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. by quantitative PCR (qPCR). Data about diet, oral hygiene, socioeconomic and cultural conditions were obtained by questionnaire and diet diary with the parents. Data were analyzed statistically considering $p \leq 0.05$. The results showed that S-ECC children had significantly lower income and lower educational level of their parents. Considering diet diary, children with S-ECC had longer breastfeeding and higher age at onset of artificial feeding. Microbiological data showed higher count of mutans streptococci in saliva of S-ECC children compared with the others groups. It was also noted by qPCR higher prevalence and quantity of *S. mutans* and *S. sobrinus* in saliva of S-ECC children. There was no difference in relation to lactobacilli levels for culture method and qPCR. It was concluded that there was influence of socio-economic and cultural risk factors, breastfeeding and levels of *S. mutans* and *S. sobrinus* in the severity of the ECC.

Keywords: early childhood caries, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil da população do estudo

Tabela 2 - Aspectos sócio-econômico-culturais da população estudada

Tabela 3 - Nível de higiene bucal da população estudada

Tabela 4 - Hábito de amamentação da população estudada

Tabela 5 - Consumo de açúcares pela população estudada

Tabela 6 - Contagem - Mediana (range) - de estreptococos grupo mutans (SM) e *Lactobacillus* spp.(LB) em log (UFC/ml+1).

Tabela 7 - Quantificação dos níveis de microrganismos (Média/Erro Padrão) por qRT-PCR de acordo com o grupo avaliado.

Tabela 8 - Frequência (%) da detecção dos microrganismos por qRT-PCR de acordo com o grupo avaliado.

LISTA DE ABREVIATURAS

CPI = cárie precoce da infância

CPI-S = cárie precoce da infância severa

DP = desvio padrão

LB = Lactobacilos

LC = livres de cáries

MB = manchas brancas ativas

Sm = *Streptococcus mutans*

SM = estreptococos mutans (grupo mutans)

MSB = Mitis- Salivarius Agar com bacitracina

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Proposição	13
3 Materiais e Métodos	14
3.1 <i>Seleção e exame clínico das crianças</i>	14
3.2 <i>Avaliação dos questionários e diários de dieta.....</i>	14
3.3 <i>Coleta das amostras biológicas</i>	15
3.4 <i>Determinação dos níveis de microrganismos por cultura</i>	15
3.5 <i>Deteção e quantificação dos níveis de microrganismos por PCR quantitativo.....</i>	15
3.5.1 <i>Extração do DNA bacteriano.....</i>	15
3.5.2 <i>PCR quantitativo ou em Tempo Real (qPCR)</i>	16
3.6 <i>Análise estatística.....</i>	17
4 Resultados e Discussão	18
4.1 <i>Avaliação clínica, dos questionários e diários de dieta</i>	18
4.2 <i>Avaliação microbiológica da população</i>	22
5 Conclusão	25
6 Referências	26
7 Anexos	27
7.1 <i>Aprovação Comitê de Ética</i>	29
7.2 <i>Termo de consentimento livre esclarecido.....</i>	30
7.3 <i>Questionário.....</i>	32
7.4 <i>Diário de dieta.....</i>	33

1 Introdução

A cárie é uma doença que leva a desmineralização dos tecidos duros do dente pela ação de ácidos gerados pela fermentação bacteriana de carboidratos da dieta. Se não interrompida pode levar à perda do elemento dentário¹. Quando atinge crianças muito jovens, a partir da erupção dos primeiros dentes decíduos é denominada cárie precoce da infância – CPI². A Academia Americana de Odontopediatria (AAPD – American Academy of Pediatric Dentistry) determinou como cárie precoce na infância a presença de um ou mais dentes decíduos cariados (lesões cavitadas ou não), perdidos (devido à cárie) ou restaurados antes dos 71 meses de idade. Em crianças com menos de 3 anos de idade, qualquer sinal de superfície dentária lisa cariada, com ou sem cavidade, é considerada cárie precoce da infância severa (CPI-S). Dos 3 aos 5 anos de idade, a criança que apresenta mais de quatro, cinco e seis superfícies cariadas/perdidas/restauradas em dentes anteriores decíduos aos 3, 4 e 5 anos, respectivamente, também são classificadas com CPI-S². O desenvolvimento das lesões de CPI pode causar, além de infecção e dor, diversos problemas estéticos, fonéticos, de deglutição, de oclusão³, além de ter influência sobre a saúde geral da criança, levando à redução do peso, altura e dificuldades no aprendizado escolar⁴.

Os seguintes fatores foram relacionados à etiologia da CPI: ingestão frequente de dieta rica em carboidratos fermentáveis como a sacarose, altas contagens de estreptococos mutans e maior vulnerabilidade imunológica da criança⁵⁻¹². Hábitos alimentares, como o uso irrestrito de mamadeira, dormir mamando leite ou líquidos ricos em carboidratos fermentáveis, associados à dificuldade ou ausência de higiene oral, principalmente à noite, são fatores que contribuem para o desenvolvimento da CPI^{5,7}. O aleitamento materno com livre demanda também tem sido considerado fator de risco para a CPI⁹. *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são estreptococos do grupo mutans principalmente encontrados em biofilme dental, e estão fortemente relacionados com o desenvolvimento de cárie dentária. Os níveis de *S. mutans* na cavidade bucal têm mostrado uma correlação positiva com a experiência passada e atividade futura de cárie¹⁰. Embora *S. sobrinus* seja menos frequentemente detectado em comparação com *S. mutans*, estudos têm apontado que essa espécie bacteriana foi mais associada à atividade de cárie que *S. mutans*, especialmente em lesões de cárie em superfície lisa^{11,12}. Outros microrganismos relacionados à progressão, mas não ao desenvolvimento da cárie são os lactobacilos principalmente do grupo casei (*L. casei*, *L.*

acidophilus)¹³. Fatores secundários também podem estar associados à etiologia da CPI como as condições socioeconômicas, nível educacional e estilo de vida dos pais³.

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção de bactérias orais, entre elas, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Um dos métodos mais precisos é a PCR (polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase), que utiliza ferramentas de Biologia Molecular para a detecção precisa das espécies bacterianas. A PCR convencional (end-point) foi muito utilizada em estudos prévios^{14,15}, entretanto, embora altamente específica e sensível quando comparada aos métodos de cultura ou enzimáticos, não fornece informações quantitativas sobre a amostra analisada. Assim, a PCR quantitativa (ou em Tempo Real) com *primers* específicos para as espécies alvo tem apresentado-se como um método sensível e acurado para detecção e quantificação de espécies individuais ou grupos bacterianos, bem como quantificar os níveis totais de bactérias na cavidade bucal^{16,17}.

2 Proposição

A proposta do trabalho é avaliar possíveis correlações entre a presença e os níveis de lesões de cárie com fatores ambientais e prevalência de bactérias potencialmente cariogênicas e com isso, verificar a influência desses fatores no desenvolvimento da cárie precoce da infância.

3 Materiais e métodos

3.1 Seleção e exame clínico das crianças

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (CAAE protocolo: 13079213.4.0000.5420)(Anexo1). A proposta do trabalho foi avaliar crianças que frequentavam regularmente a clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP e creches da cidade de Araçatuba. Foram selecionadas e avaliadas 203 crianças entre 3 e 5 anos de idade de 6 creches (EMEBs) e da FOA/UNESP, sendo que 146 eram livres de cárie e 58 apresentavam lesões de cárie com vários níveis de severidade. Participaram efetivamente da pesquisa 90 crianças e estas foram divididas em três grupos: livres de cárie (LC) (n=32), cárie precoce da infância (CPI) (n=25) e CPI - severa (CPI-S) (n=33). Foram selecionadas crianças entre 3 e 5 anos. As crianças com CPI-S apresentaram no mínimo 4 (quatro) lesões cavitadas em dentina aos 3 anos de idade, 5 cavidades de cárie aos 4 anos de idade e 6 cavidades de cárie aos 5 anos de idade². Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(Anexo2) foi entregue aos responsáveis pelas crianças e, somente aqueles que assinaram o termo participaram efetivamente da pesquisa. No exame clínico das crianças foram avaliadas as condições das estruturas dentais e o diagnóstico de cárie dentária considerando o critério da OMS. As crianças que apresentaram somente manchas brancas ativas e nenhuma cavidade de cárie foram excluídas do estudo, não entrando no critério de LC. Os exames clínicos visuais foram realizados, sob luz artificial, com o auxílio de espelho clínico e sonda exploradora, após limpeza e secagem dos dentes com gaze. Estes foram realizados por um único cirurgião-dentista previamente calibrado (aluno de doutorado previamente treinado com o auxílio da aluna de graduação), considerando a avaliação da concordância intraexaminador com 10% da amostra e a obtenção de kappa de 0,7. Os dados foram anotados por um auxiliar em uma ficha clínica. As crianças cárie-ativas foram encaminhadas para tratamento odontológico na própria unidade.

3.2 Avaliação dos questionários e diários de dieta

Os pais ou responsáveis das crianças preencheram um questionário semi-estruturado(Anexo3) que continha questões referentes a fatores socioeconômicos, hábitos de higiene oral, uso de dentifrício fluoretado, hábitos como a amamentação

artificial e/ou natural, diurna e/ou noturna. Para determinar a frequência de consumo de carboidratos fermentáveis, os responsáveis pela criança foram orientados a preencherem um diário de dieta (Anexo 4) por 3 dias consecutivos. O diário apresentou dois períodos do dia com imagens sugestivas de grupos de alimentos. Para cada grupo, os responsáveis anotaram a frequência do consumo dos alimentos pela criança no período em questão.

3.3 Coleta das amostras biológicas

A saliva não estimulada (2 ml) das crianças foi coletada em funis acoplados em tubos de plástico estéreis. Amostras de biofilme supragengival foram coletadas das superfícies vestibulares hígidas de todos os dentes, com o auxílio de alças plásticas descartáveis estéreis. Em seguida, as amostras foram inoculadas em microtubos contendo 1ml de solução TE (Tris-EDTA, pH. 8.0). A criança deveria estar em jejum, pelo menos uma hora antes das coletas. As amostras foram mantidas em gelo e transportadas para o laboratório de Odontopediatria da FOA-UNESP em um período máximo de 2 h após a coleta para manter a viabilidade celular.

3.4 Determinação dos níveis de microrganismos por cultura

Em ambiente laboratorial, as amostras de saliva e de biofilme foram agitadas por 1min e diluídas em série decimal em solução salina estéril 0,9%. Aliquotas de 25µL de cada diluição foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio Mitis-Salivarius Agar (Difco Laboratories, USA) com bacitracina (0,2U/ml) – MSB para crescimento de estreptococcus grupo mutans e em meio Rogosa Agar (Merck, Germany) para o crescimento de lactobacilos. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ por 48h. Após esse período, as colônias crescidas foram contadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica para determinação do número de UFC/ml.

3.5 Detecção e quantificação dos níveis de microrganismos por PCR quantitativo

3.5.1 Extração do DNA bacteriano.

Amostras de saliva obtidas das crianças LC, CPI e CPI-S foram submetidas à extração do DNA bacteriano pelo método fenol-clorofórmio¹⁸ utilizando centrífuga refrigerada. Resumidamente, uma alíquota de 700µL de tampão de extração (NaCl 1,4 M;

Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%; Proteinase K 100 ug/mL; b-Mercaptanol 0,2% Água Milli-Q) foi adicionada à amostra. A mesma foi agitada em vórtex e mantida por 30 minutos à 65°C em banho-maria, sendo homogeneizada suavemente a cada dez minutos. Após a incubação, adicionou-se 650µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico; 24:1), homogeneizou-se até formar uma emulsão. Depois de formada a emulsão, a amostra foi centrifugada (10000 rpm/10 minutos). A fase aquosa formada após a centrifugação foi transferida para novo microtubo *ependorf* de 1,5mL e 200uL de tampão de extração sem proteinase K foi adicionado. Em seguida, adicionou-se CIA novamente, homogeneizou-se até formar uma emulsão. Depois de formada a emulsão, a amostra foi centrifugada (10000 rpm/10 minutos). Novamente a fase aquosa formada foi transferida para outro tubo *ependorf*. A adição de CIA foi repetida por mais uma ou duas vezes, até obtenção de uma fase aquosa transparente e límpida. Após obtenção de uma fase aquosa límpida, precipitou-se o DNA com adição de 650µL de álcool isopropílico à temperatura ambiente e centrifugação (10000 rpm/10 minutos). Após a centrifugação, removeu-se o álcool isopropílico e 50mL de álcool etílico a 70% foi adicionado para lavar a superfície do DNA precipitado, sem ressuspender. Novamente o precipitado foi centrifugado, seguido da remoção do etanol. O tubo *ependorf* foi deixado aberto invertido até a secagem do precipitado. Para finalizar, o DNA foi ressuscitado em 30µL de tampão Tris-EDTA – TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) com 10µg/mL de RNase e deixado em banho-maria à 37°C por 30 minutos. A seguir, o DNA foi congelado a -20°C. A concentração e a integridade das amostras de DNA foram determinadas em espectrofotômetro a 260nm (NANODROP) e em géis de agarose com corante Sybr Safe a 1%.

3.5.2 PCR quantitativo ou em Tempo Real (qPCR)

O DNA foi analisado usando um sistema Eco Real Time qPCR (Illumina Inc.) para PCR em tempo real quantitativo usando Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA). Os seguintes microrganismos foram detectados/quantificados, utilizando *primers* específicos e condições de reações obtidos na literatura: *Streptococcus mutans*¹⁹, *Streptococcus sobrinus*²⁰ e *Lactobacillus* spp.²¹. Um par de *primers* universal também foi incluído no estudo²⁰. A reação foi realizada em placas de 48 poços, cada poço contendo 12,5 µl de SYBR Green mix, 2µl de DNA e 2 µl dos *primers*.

As condições de amplificação foram desnaturação inicial 50°C por 2 min, 95°C por 10 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, anelamento entre 57 e 65°C por 1min e extensão a 72°C por 60s. A análise da curva de melt foi realizada para confirmar o sinal observado pela ligação do SYBR Green ao produto de amplificação esperado e não aos possíveis dímeros de *primers*. DNA extraído de cepas padrão contendo entre 10^0 a 10^9 UFC foi utilizado para as curvas padrão – Ct. Para confirmar a especificidade ou universalidade dos *primers*, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em uma cuba para corrida eletroforética horizontal (Major Science) conectada a uma fonte de eletroforese (Fonte Smart Rosa, Major Science) a 96V por 40min e submerso em solução tamponante TBE (Tris-ácido bórico e EDTA). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com Sybr Safe durante 5 minutos e então as bandas no gel foram observadas imediatamente um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas a seguir um sistema de fotodocumentação digital (UVP, mod. Multidoc-It)

3.6 Análise estatística

Foram considerados como variáveis dependentes as crianças LC, CPI ou CPI-S. As variáveis independentes foram os dados clínicos, dos questionários, dos diários de dieta, além dos níveis de microrganismos. Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias. A seguir, foi aplicada a análise estatística mais adequada para cada parte do trabalho. Para dados paramétricos, os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Caso contrário, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney. Para os dados de quantitativos foi utilizado o teste de quiquadrado. Os dados foram analisados pelo programa SPSS Inc. versão 7.0, considerando nível de significância em 5%.

4 Resultados e Discussão

4.1. Avaliação clínica, dos questionários e diários de dieta

A **Tabela 1** mostra que foram avaliadas crianças entre 3 e 5 anos e que não houve diferença estatística entre os grupos de crianças, quanto ao critério idade. Também não foi observada diferença quanto ao sexo, considerando cada grupo isoladamente. Esses dados mostram que há uma semelhança entre os grupos considerando idade e sexo da criança. Quanto ao número de superfícies atingidas pelas lesões de cárie, ficou nitidamente verificada a diferença entre os grupos, sendo que o grupo CPI-S demonstrou grande prevalência, atingindo média/DP de $16,97 \pm 14,92$ superfícies comprometidas, sem considerar a presença de manchas brancas ativas.

Tabela 1. Perfil da população do estudo

	Idade	Ceos*	ceos+MB**	Gênero	
				Feminino	Masculino
Condição clínica	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	n (%)	n (%)
LC	$48,81 \pm 8,71^a$	0^a	0^a	14 (43,8) ^A	18 (56,3) ^A
CPI	$49,92 \pm 7,80^a$	$2,28 \pm 0,97^b$	$2,68 \pm 1,28^b$	13 (52) ^A	12 (48) ^A
CPI-S	$49,28 \pm 9,22^a$	$16,97 \pm 14,92^c$	$21,27 \pm 17,86^c$	15 (45,5) ^A	18 (54,5) ^A

^aLetras minúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças livres de cárie, cárie-ativos e cárie severa, de acordo com o teste ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p < 0,05$).

^A Letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os gêneros, de acordo com o teste qui-quadrado ($p < 0,05$).

* ceos – número de superfícies cariadas, extraídas ou obturadas (restauradas)

** ceos - número de superfícies cariadas, extraídas ou obturadas (restauradas) + manchas brancas ativas (MB)

A **Tabela 2** mostra a análise da população quanto aos aspectos sócio-econômico-culturais. Embora não tenha sido detectada diferença estatística, é notadamente observada que a idade do responsável no grupo CPI-S foi maior que nos demais grupos. O mesmo foi observado para número de crianças na família. Diferença estatística foi demonstrada para o nível de educação do responsável e renda familiar, sugerindo que o grupo CPI-S está culturalmente e economicamente menos privilegiado, quando comparado com o grupo LC. A literatura tem mostrado que crianças com baixa renda

familiar e mães que apresentam menos de oito anos de escolaridade tem apresentado alta prevalência de cárie^{22,23}. Esses achados corroboram com nossos resultados.

Tabela 2. Aspectos sócio-econômico-culturais da população estudada

Condição clínica	Idade do responsável Média (DP)	Nível de educação do responsável* n(%)	Número de crianças na família Média (DP)	Renda familiar** n (%)
LC	33,25 ± 9,28 ^a	≤ 2 = 7 (21,9) ^a ≥ 3 = 25 (84,6)	1,90 ± 0,81 ^a	≤ 1 = 9 (30) ^a ≥ 2 = 21 (70)
CPI	33,20 ± 10,83 ^a	≤ 2 = 6 (24,0) ^{a,b} ≥ 3 = 19 (76,0)	2,08 ± 1,25 ^a	≤ 1 = 9 (39,1) ^b ≥ 2 = 14 (60,8)
CPI-S	34,12 ± 7,26 ^a	≤ 2 = 10 (30,3) ^b ≥ 3 = 23 (69,6)	2,15 ± 1,13 ^a	≤ 1 = 15 (50) ^b ≥ 2 = 15 (50)

^aLetras minúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com o teste quiquadrado (%) ou ANOVA/Tukey (médias) (p<0.05).

* 0 – Não estudou, 1 – 1º grau incompleto, 2 – 1º grau completo, 3 – 2º grau incompleto, 4 – 2º grau completo, 5 – superior incompleto, 6 – superior completo, NF – não informado.

** 0 – menos de 1 salário mínimo, 1 – 1 a 2 salários mínimos, 2 – 2 a 3 salários mínimos, 3 – 3 salários mínimos, 4 – 4 salários mínimos, NF – não informado

A **Tabela 3** mostra o nível de higiene dos grupos, baseado nas informações obtidas pelo questionário dirigido ao responsável. Os resultados não demonstram diferença estatística para nenhum dos critérios avaliados. Não consideramos o uso de fio dental nesta análise, pois os responsáveis que anotaram que faziam uso de fio dental (a minoria), disseram que realizavam somente quando da necessidade de remover algum resíduo e não praticavam efetivamente a técnica na criança. A ausência de diferença entre os grupos é justificada pelo fato da utilização de que questionários para buscar esse tipo de informação mascara a realidade, pois se acredita que os responsáveis acabam respondendo o que lhes é mais conveniente, embora não tenham conhecimento sobre a doença e seus fatores etiológicos. Azevedo et al. (2014)²⁴ avaliaram o conhecimento e as crenças das mães sobre a cárie precoce da infância. Embora elas tenham apontado o consumo de açúcar e a falta de higiene oral como causas da cárie, 90% delas desconhecia necessidade de iniciar a escovação das crianças no primeiro ano de vida. Além disso, as mães que tinham mais crianças e baixa condição socioeconômica também não sabiam sobre a necessidade da primeira visita ao dentista. Todos esses

achados mostram a importância de promover orientação preventiva às mães em relação à cárie precoce da infância e sobre as visitas ao dentista.

Tabela 3. Nível de higiene bucal da população estudada

Condição clínica	Escova os dentes n (%)	Quantas vezes/dia escova os dentes? Média (DP)	Quantas vezes/dia escova os dentes em casa? Média (DP)	O responsável auxilia na escovação n (%)	Qual idade (meses) iniciou a escovação? Média (DP)
LC	32 (100) ^a	2,32 ± 0,74 ^a	2,10 ± 0,77 ^a	23 (71,9) ^a	1,70 ± 1,00 ^a
CPI	25 (100) ^a	2,48 ± 1,00 ^a	2,16 ± 0,76 ^a	18 (72) ^a	2,16 ± 1,16 ^a
CPI-S	33 (100) ^a	2,34 ± 0,970 ^a	2,10 ± 0,97 ^a	23 (69,6) ^a	1,93 ± 0,98 ^a

^a Letras minúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com o teste quiquadrado (%) ou ANOVA/Tukey (médias) ($p < 0.05$).

A **Tabela 4** mostra os hábitos de amamentação da população estudada. Notou-se diferença estatística nos critérios: tempo de amamentação natural e início da amamentação artificial. O grupo CPI-S recebeu amamentação natural por mais tempo que o grupo LC e o mesmo foi observado para início de amamentação artificial, que foi mais tarde no grupo CPI-S. O fato de o grupo CPI-S ter recebido amamentação natural por mais tempo somado à situação de que são culturalmente menos privilegiados, pode-se acreditar que os pais não tinham a informação de que, mesmo utilizando o leite materno, existe a necessidade da escovação após a ingestão do mesmo, aumentando a incidência das lesões de cárie. Parisotto et al. (2010)²⁵ não encontraram diferença quanto ao uso de mamadeira entre crianças LC e CPI, resultado similar ao que ocorreu no presente estudo, porém não avaliaram o início e tempo da uso da mamadeira. Tham et al. (2015)²⁶ mostraram, através de uma revisão sistemática, que a amamentação na infância pode proteger contra a cárie dentária, entretanto, mostrou também um aumento do risco de cárie em crianças amamentadas por mais de 12 meses.

Tabela 4. Hábito de amamentação da população estudada

		LC	CPI	CPI-S
Amamentação natural (AN)	n (%)	25 (78,1) ^A Ainda mama = 1 (3,1)	21 (84,0) ^A Ainda mama = 2 (8,0)	29 (87,9) ^A Ainda mama = 2 (6,1)
AN por quantos meses?	Média (DP)	6,65 ± 7,74 ^A	14,60 ± 15,60 ^{A,B}	17,25 ± 12,70 ^B
Aleitamento artificial (AA)	n (%)	31 (96,9) ^A Ainda mama = 23 (71,9) ^A	24 (96,0) ^A Ainda mama = 14 (56,0) ^A	30 (93,9) ^A Ainda mama = 23 (71,9) ^A
Idade de início da AA	Média (DP)	6,59 ± 7,19 ^A	11,43 ± 10,26 ^A	14,29 ± 10,40 ^B
AA por quantos meses?	Média (DP)	36,28 ± 16,42 ^A	28,76 ± 17,01 ^A	30,05 ± 17,95 ^A
AN ou AA quantas vezes ao dia?	Média (DP)	2,6 ± 1,30 ^A	3,24 ± 1,98 ^A	2,09 ± 1,07 ^A
Período da amamentação	n (%)*	1 = 3 (9,4) ^A 2 = 5 (15,6) ^A 3 = 24 (75) ^A	1 = 3 (12) ^A 2 = 3 (12) ^A 3 = 11 (76) ^A	1 = 7 (21,3) ^A 2 = 2 (6,1) ^A 3 = 10 (72,6) ^A

^A Letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com o teste quiquadrado (%) ou ANOVA/Tukey (médias) (p<0.05).

* 1 – diurno, 2 = noturno, 3 = diurno e noturno.

A **Tabela 5** mostra o consumo de açúcares pelas crianças, nos diferentes grupos. Não foi verificada diferença em nenhum dos critérios avaliados, embora se observe que o grupo CPI-S consome menos carboidratos na forma sólida que os demais grupos. Esse dado vem de encontro com o fato de essas crianças consumirem muito leite ainda na mamadeira. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que não encontraram correlação entre a experiência de cárie e a exposição ao açúcar^{27, 28}. É importante reconhecer que muitos pais minimizam o consumo de açúcar pelas crianças quando são questionados e também que o diário de dieta reflete o tempo presente e não quando as lesões de cárie iniciaram seu desenvolvimento.

Tabela 5. Consumo de açúcares pela população estudada

Condição clínica	Açúcar na mamadeira n (%)	Número de porções de açúcar na forma líquida/dia* Média (DP)	Número de porções de açúcar na forma sólida/dia** Média (DP)	Total de porções com açúcar consumidas/dia Média (DP)
LC	25 (78,1) ^a	5,86 ± 2,03 ^a	3,65 ± 1,34 ^a	9,51 ± 2,57 ^a
CPI	21 (84,0) ^a	5,20 ± 3,03 ^a	3,80 ± 1,36 ^a	9,00 ± 2,98 ^a
CPI-S	30 (96,8) ^a	4,28 ± 1,34 ^a	3,18 ± 1,72 ^a	7,46 ± 2,13 ^a

^a Letras minúsculas diferentes nas linhas demonstram diferença estatística entre os grupos, de acordo com o teste quiquadrado (%) ou ANOVA/Tukey (médias) (p<0.05).

* Açúcar líquido – média de dois dias de consumo de porções correspondentes à açúcar líquido (sucos, refrigerantes, iogurtes, leites, achocolatados, mamadeiras)

** Açúcar sólido – média de dois dias de consumo de porções correspondentes à açúcar sólido (pães, massas, bolos e doces).

4.2 Avaliação microbiológica da população

A **Tabela 6** mostra a contagem de microrganismos na saliva e biofilme das crianças nos grupos avaliados. Para estreptococos grupo mutans (SM), isolados a partir do meio MSA com bacitracina, foi observada diferença estatística tanto para saliva quanto para biofilme, entre os grupos, com maior UFC/ml no grupo CPI-S. Pode-se notar que houve um aumento gradativo da contagem de SM, considerando a severidade da doença. Nossos resultados estão de acordo com estudos que mostraram uma relação entre a alta contagem de estreptococos mutans e altos índices de cárie²⁹⁻³¹. Para lactobacilos, não houve diferença entre os grupos, independente da presença ou não da doença ou sua severidade. Semelhante aos nossos resultados, Parisotto et al. (2011)³² não encontraram relação entre os níveis de lactobacilos e a presença de CPI, entretanto, esses autores não consideraram a severidade da doença.

Tabela 6. Contagem - Mediana (range) - de estreptococos grupo mutans (SM) e *Lactobacillus* spp.(LB) em log (UFC/ml+1).

Microrganismos (local da coleta)	Condição clínica		
	LC	CPI	CPI-S
SM (saliva)	4,08 (0 - 6,62) ^A	3,90 (0 - 6,40) ^B	6,11 (0 - 8,52) ^C
SM (biofilme)	4,08 (0 - 6,22) ^A	4,08(0 - 6,09) ^B	5,67 (0 - 7,44) ^C
LB (saliva)	0 (0 - 7,08) ^A	3,05 (0 - 6,47) ^A	3,50 (0 - 6,88) ^A
LB (biofilme)	0 (0 - 3,20) ^A	0 (0 - 7,04) ^A	0 (0 - 6,33) ^A

^A Letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (p<0.05).

As **Tabelas 7 e 8** mostram os resultados obtidos para qPCR das amostras de saliva quanto à presença de *S. mutans* e espécies de lactobacilos. Os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram mais altos no grupo CPI-S. A presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* também foi mais pronunciada no grupo CPI-S. Zhou et al. (2011)³³ mostraram que crianças em que foram detectados altos níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentavam altos escores de cárie quando comparados às crianças que apresentavam somente *S. mutans* e que a prevalência de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi significativamente maior no grupo CPI-S em comparação com LC. Nossos resultados estão de acordo com os achados desse estudo, mostrando que a frequência e níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* aumentaram com a severidade da CPI. Quanto aos lactobacilos, não foi notada diferença para nenhum grupo considerando a quantificação e a presença desses microrganismos. Xu et al. (2014)³⁴ estudaram a microbiota de crianças com CPI e LC e notaram que lactobacilos foram detectados somente no grupo CPI. Kanasi et al. (2010)³⁵ relataram que *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus vaginalis*, além da associação *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram associados com CPI enquanto outras espécies de lactobacilos, como *Lactobacillus acidophilus*, não foram correlacionadas com a cárie dentária.

Tabela 7. Quantificação dos níveis de microrganismos (Média/Erro-Padrão) por qRT-PCR de acordo com o grupo avaliado.

Condição clínica	<i>S. mutans</i> (ng/μl)	<i>S. sobrinus</i> (ng/μl)	<i>Lactobacillus</i> spp. (ng/μl)
LC	0,07(0,06) ^a	0 ^a	1,35 (0,5) ^a
CPI	0,10 (0,06) ^a	0 ^a	1,57 (0,43) ^a
CPI-S	0,34 (0,13) ^b	0,05 (0,05) ^b	1,76(0,23) ^a

^a Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (p<0.05).

23

Tabela 8. Frequência (%) da detecção dos microrganismos por qRT-PCR de acordo com o grupo avaliado.

Condição clínica	<i>S. mutans</i> (ng/μl)	<i>S. sobrinus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. (ng/μl)
LC	25 ^a	0 ^a	100 ^a
CPI	64,7 ^b	5,9 ^a	100 ^a
CPI-S	100 ^c	31,3 ^b	100 ^a

^a Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatística entre os grupos de crianças, de acordo com o teste de qui-quadrado (p<0.05).

5 Conclusão

Conclui-se que houve influência dos fatores de risco: renda familiar, escolaridade da mãe e uso prolongado da amamentação, além dos altos níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* na severidade da CPI.

6 Referências

1. Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária. A doença e seu tratamento clínico. Editora Santos, 2005.
2. Drury TF, et al. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. J Public Health Dent. v.59, p.192-197, 1999.
3. Robke FJ. Effects of nursing bottle misuse on oral health. Prevalence of caries, tooth malalignments and malocclusions in North-German preschool children. J Orofac Orthop, v.69, p.5-19, 2008.
4. Filstrup SL, et al. Early childhood caries and quality of life: child and parent perspectives. Pediatr Dent, v.25, n.5, p.431-40, 2003.
5. Brandão IM, et al. Early childhood caries: the influence of socio-behavioral variables and health locus of control in a group of children from Araraquara, São Paulo, Brazil. Cad Saude Publica. v.22, n.6, p.1247-56, 2006.
6. Parisotto TM, et al. Immunological and Microbiologic Changes during Caries Development in Young Children. Caries Res. v.45, p.377-385, 2011.
7. Ramos-Gomez FJ, et al. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. J Clin Pediatr Dent. v.26, n.2, p.165-73, 2002.
8. Mattos-Graner RO, et al. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one year follow-up period. J Public Health Dent. v.61, n.3, 2001.
9. Mohebbi SZ, et al. Feeding habits as determinants of early childhood caries in a population where prolonged breastfeeding is the norm. Community Dent Oral Epidemiol. v.36, p.363-9, 2008.
10. Köhler B, Pettersson B, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. Scand J Dent Res, v.89, p.19-25, 1981.
11. Ahmady K, et al. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque. Caries Res, v.27, p.135-139, 1993.
12. Hirose H, et al. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. Caries Res, v.27, p.292-297, 1993.
13. Badet C, Thebaud NB. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. Open Microbiol J., v.2, p.38-48, 2008.

14. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J Med Microbiol*, v.49, p.1069–1074, 2000.
15. Igarashi T, et al. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the *dex* genes. *J Microbiol Methods*, v.46, p.99–105, 2001.
16. Corless CE, et al. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol*, v.38, p.1747–1752, 2000.
17. Hata S, et al. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. *Lett Appl Microbio*, v.42, p.127–131, 2006.
18. Doyle JJT, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-18, 1990.
19. Tanner AC, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res*, v.90, p.1298-1305, 2011.
20. Suzuki N, et al. Real-Time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol*, v.42, p.3827-3830, 2004.
21. Byun R, et al. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol*, v.42, p.3128-3136, 2004.
22. Oliveira LB, Sheiham A, Bönecker M. Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. *Eur J Oral Sci*, v.116, p.37-43, 2008.
23. Corrêa-Faria P, et al. Factors associated with the development of early childhood caries among Brazilian preschoolers. *Braz Oral Res*, v.27, p.356-362, 2013.
24. Azevedo MS, Romano AR, Dos Santos Ida S, Cenci MS. Knowledge and beliefs concerning early childhood caries from mothers of children ages zero to 12 months. *Pediatr Dent*. 2014 May-Jun;36(3):95-9.
25. Parisotto TM, et al. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol*, v.55, p.365-373, 2010.
26. Tham R, et al. Breastfeeding and the risk of dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* Jul 24. doi: 10.1111/apa.13118, 2015 [Epub ahead of print]

27. Ohlund I, et al. Diet intake and caries prevalence in four-year-old children living in a low-prevalence country. *Caries Res*, v.41, p.26-33, 2007.
28. Kalsbeek H, Verrips GH. Consumption of sweet snacks and caries experience of primary school children. *Caries Res*, v.28, p.477-483, 1994.
29. Milgrom P, et al. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.28, p.295-306, 2000.
30. Fujiwara T, et al. Caries prevalence and salivary *mutans* streptococci in 0-2-year-old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.19, n.3, p.151-154, June. 1991.
31. Mattos-Graner RO, et al. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res*. v. 79, n. 6, p. 1371-7, Jun. 2000.
32. Parisotto TM, et al. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Res.*, v.45, p.377-85, 2011.
33. Zhou Q, Et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries. *Int J Paediatr Dent* , v.21, p.422-431, 2011.
34. Xu H, et al. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS One*, v.9, p.89-269, 2014.
35. Kanasi E, et al. Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res*, v.89, p.378-383, 2010.

7 Anexos

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

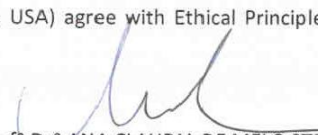
Comitê de Ética Em Pesquisa (CEP)
Committee for Ethical Research (CEP)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo dos fatores de risco para o desenvolvimento da cárie da primeira infância e efeito clínico/microbiológico do tratamento restaurador atraumático em crianças pré-escolares" sob responsabilidade da pesquisadora **CRISTIANE DUQUE** e colaboração de Natália Helena Colombo (FOA-UNESP), Laís Fernanda Fonseca Ribas (FOA-UNESP), Marjully Eduardo Rodrigues da Silva (FOA-UNESP), Dinah Fressato Silva (FOA-UNESP), Anne C. R. Tanner (Forsyth Institute, EUA) e Christine A. Kressirer (Forsyth Institute, EUA) está de acordo com os princípios éticos em pesquisa e foi aprovado pelo CEP, de acordo com CAAE 13079213.4.0000.5420.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of the risk factors and clinic/microbiologic effectiveness of the minimum restorative treatment in children with early childhood caries", CAAE number 13079213.4.0000.5420, under responsibility of **CRISTIANE DUQUE** and with collaboration of Natália Helena Colombo (FOA-UNESP), Laís Fernanda Fonseca Ribas (FOA-UNESP), Marjully Eduardo Rodrigues da Silva (FOA-UNESP), Dinah Fressato Silva (FOA-UNESP), Anne C. R. Tanner (Forsyth Institute, USA) and Christine A. Kressirer (Forsyth Institute, USA) agree with Ethical Principles in Research and was approved by CEP.


Profª Drª ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE

CEP Coordinator

Faculdade de Odontologia - Seção Técnica Acadêmica
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3234 E-mail: cep@foa.unesp.br

Anexo2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Estudo dos fatores de risco ambientais, microbiológicos e imunológicos para o desenvolvimento da cárie precoce da infância e uma nova proposta de tratamento restaurador atraumático em crianças pré-escolares.”

Nome da Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Cristiane Duque

Natureza da pesquisa: o(a) sr.(a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem duas finalidades. A primeira será avaliar os fatores de risco para o desenvolvimento da cárie precoce da infância e para isso será verificado os níveis de microrganismos bucais, dieta, aspectos sociais e hábitos de higiene bucal. A segunda finalidade será avaliar a ação do tratamento restaurador atraumático (TRA) com cimento odontológico para restauração associado ou não a um antimicrobiano (clorexidina) em crianças com cárie precoce da infância.

Participantes da pesquisa: Para a realização desta pesquisa serão selecionadas 150 crianças entre 2 e 6 anos de idade, apresentando ou não cárie dentária.

Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo o(a) sr.(a) permitirá que a pesquisadora avalie a saúde bucal de seu (sua) filho (a), além de realizar a coleta de saliva e biofilme (placa bacteriana) dos dentes para avaliação dos níveis de microrganismos. Em seguida, as crianças com cárie receberão tratamento restaurador atraumático, ou seja, será removida a cárie com colheres de dentina e colocado um cimento contendo ou não um antimicrobiano (clorexidina). O(a) sr.(a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o(a) sr.(a) ou para seu (sua) filho (a). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sobre as entrevistas: realizaremos uma entrevista com o sr (a) sobre seu nível de escolaridade, renda familiar, além de solicitar informações sobre hábitos de higiene bucal, dieta, amamentação do seu (sua) filho (a).

Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas. A pesquisa apresenta riscos mínimos e algum grau de desconforto para seu (sua) filho (a), durante os procedimentos restauradores. Diante de qualquer desconforto após o tratamento, favor entrar em contato, por telefone, com a pesquisadora responsável que tomará as providências necessárias para o atendimento imediato do seu (sua) filho (a). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora responsável e sua equipe de pesquisa terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Benefícios: ao participar desta pesquisa o(a) sr.(a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo resulte em informações importantes sobre a cárie precoce da infância, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar na descoberta dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta doença. Além disso, a utilização do tratamento restaurador atraumático tem como objetivos interromper o processo de cárie e prevenir o desenvolvimento de novas lesões utilizando um cimento adesivo liberador de flúor que auxilia na inativação da cárie. Como os cimentos indicados para esta técnica apresentam pouca atividade contra os microrganismos bucais, a clorexidina aumentaria a capacidade

antimicrobiana do cimento, auxiliando no controle da instalação de novas lesões de cárie secundárias ou próximas à restauração. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

Pagamento: o(a) sr.(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Participante da Pesquisa

Nome do Responsável Legal pelo Participante da Pesquisa

Assinatura do Responsável Legal pelo Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Pesquisador: Profa. Dra. Cristiane Duque. Telefone para contato (18)3636.3315
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune
Vice-Coordenador: Prof. Wilson Galhego Garcia
Telefone do Comitê: (18) 3636-3234

Anexo 3 - Questionário

DADOS DO RESPONSÁVEL

Nome: _____ telefone: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Profissão: _____ Números de filhos: _____

Nível de escolaridade: () não estudou () 1º grau incompleto () 1º grau completo (até a 8ª série)

() 2º grau incompleto () 2º grau completo (até a 3ª colegial) () superior incompleto () superior completo

Renda familiar: () menos de 1 salário mínimo () 1 a 2 salários mínimos () 2 a 3 salários mínimos () mais de 3 salários

DADOS DA CRIANÇA

Nome: _____ Data de nascimento: _____ Idade: _____

Sexo: (F) (M) Nasceu como: () Parto normal () cesárea () outro: _____

AMAMENTAÇÃO NATURAL: () sim () não () ainda mama no peito Mamou até quantos meses? _____

AMAMENTAÇÃO ARTIFICIAL (uso de mamadeira): () sim () não () ainda mama

Até quantos meses? _____ Quantas vezes por dia? _____ () manhã () tarde () noite () de madrugada

Em quais horários? _____

O que você coloca na mamadeira? _____

HIGIENE BUCAL

Escova os dentes? () sim () não Quantas vezes/dia? _____ Quantas vezes em casa: _____

Quem escova? () criança () mãe/pai () outro

Usa pasta de dente? () sim () não Qual? _____ Usa fio dental? () sim () não

Com que idade começou a escovar os dentes do seu filho? () Assim que os primeiros dentes nasceram () durante o 1º ano de idade () durante o 2º ano de idade () durante o 3º ano de idade

Tomou antibiótico nos últimos 3 meses: () sim () não

Maxila										
	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
V										
M										
D										
L										
O										
Mandíbula										
	75	74	73	72	71	81	82	83	84	85
V										
M										
D										
L										
O										

Índice de lesões de cárie e manchas brancas

Adaptado de Assaf et al., 2006

H: hígido;

MA: mancha branca ativa

MBI: mancha branca inativa

CC: cariado com lesão crônica;

CA: cariado com lesão ativa;

RCC: restaurado e com lesão crônica de cárie;

RCA: restaurado e com lesão ativa de cárie;

R: restaurado sem lesão de cárie;

RMA: restaurado com mancha branca;

PC: perdida devido à cárie;

P: perdido por outra razão;

S: selante de fissura;

SMA: selante de fissura com mancha branca;

CO: coroa

T: trauma (fratura)

Anexo 4 – Diário de dieta

DIÁRIO DE DIETA		Frutas, legumes e verduras		Sucos e refrigerantes		Arroz, feijão batatas e cereais		Pães e massas		Leite, iogurte, ovos, queijos e carnes		Bolos e Doces		Mamadeiras	
		Quais alimentos?	Quantas porções?	Quais alimentos e quantos copos?	Com açúcar?	Quais alimentos?	Quantas porções?	Quais alimentos?	Quantas porções?	Qual alimento e quantos copos?	Qual alimento e quantas porções?	Qual doce?	Quantas porções?	Quantas?	Com açúcar ou chocolate?
Dia 1	Manhã														
	Tarde														
	Noite														
Dia 2	Manhã														
	Tarde														
	Noite														
Dia 3	Manhã														
	Tarde														
	Noite														

Por favor, anotar durante 3 dias, todos os alimentos consumidos pela criança com os respectivos horários e quantidades (xícara, colher). Se for utilizado açúcar ou chocolate para adoçar, colocar a quantidade.