



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

Adrielle Ouchi Lopes

**O tratamento restaurador atraumático das lesões de cárie reverte as
alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo?**

Araçatuba

2023

Adrielle Ouchi Lopes

O tratamento restaurador atraumático das lesões de cárie reverte as alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo?

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientador (a): Prof^a. Assoc. Dr^a. Cristina Antoniali Silva.

Coorientador (a): Prof^a. Ass. Dr^a. Alessandra Marcondes Aranega.

Araçatuba

2023

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

L864t	Lopes, Adrielle Ouchi. O tratamento restaurador atraumático das lesões de cárie reverte as alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo? / Adrielle Ouchi Lopes. - Araçatuba, 2023 51 f. ; graf. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva Coorientadora: Profa. Alessandra Marcondes Aranega 1. Saliva 2. Cárie dentária 3. Estresse oxidativo 4. Anti-oxidantes I. T. Black D27 CDD 617.645
-------	---

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Adrielle Ouchi Lopes

Nascimento

11.05.1998 – Marília/SP

Filiação

Adriano Henrique Lopes
Ana Paula Ouchi Lopes

2016/2019

Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Marília, Universidade de Marília – UNIMAR.

2021/2023

Curso de Pós-Graduação em Ciências, Área de Concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Associações

CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo.

Dedicatória

Dedico este trabalho a **Deus,**

Aquele que me deu forças para nunca desistir, mesmo diante às adversidades e momentos de aflição. Ele sempre esteve ao meu lado, me dando a direção e preparando todas as coisas para que eu pudesse me aperfeiçoar profissionalmente, me ensinou a ter fé e confiar nos propósitos Dele. O Seu amor e cuidado foram o suficiente para que eu chegasse até aqui. Meu coração se enche de alegria e gratidão por ter o privilégio de ser abençoada e poder realizar mais um sonho.

“Por toda minha vida dedicarei minhas vitórias e conquistas a Ti, o único que é Digno de receber toda honra e glória. Exaltado seja o Teu Nome Pai, por todos os feitos em minha vida.”

Agradecimientos

Ao meu esposo **Guelder de Cerqueira Silva**,

Por toda a minha vida serei grata a você, por nunca desistir de mim e acreditar nos meus sonhos. O seu apoio e carinho foram essenciais para que eu pudesse concluir essa etapa em minha vida. Essa conquista é nossa. Você e nossa família, que ainda se formará, são a razão pela qual eu busco melhorar e evoluir a cada dia. Amo você.

Aos meus pais **Adriano Henrique Lopes** e **Ana Paula Ouchi Lopes**,

Não há palavras que descrevam minha gratidão a Deus por ter pais maravilhosos. Obrigada por se fazerem presentes em minha vida, por abraçarem meus sonhos comigo e me proporcionarem a realização deles. Desde a graduação, com muita dificuldade e limitações, vocês me apoiaram e não mediram esforços para que eu pudesse ter uma formação de excelência, nunca me deixaram faltar nada. Todo investimento será retribuído, jamais me esquecerei de tudo que fizeram por mim. Amo vocês.

A minha irmã **Andressa Ouchi Lopes** e família,

Minha melhor amiga, minha confidente. Meu sentimento é de gratidão, por todas as vezes que você me deu seu ombro para eu chorar, por cada momento nosso de aconchego e carinho e pelas inúmeras conversas de aconselhamento em momentos difíceis. Obrigada por você ser tão presente na minha vida e por acompanhar todos os meus progressos, se alegrando sempre comigo. Meus agradecimentos se estendem também ao meu querido cunhado Érick Paguete e ao Arthurzinho, mesmo estando no forninho, vocês completaram ainda mais nossa família e são motivos de alegrias para mim. Amo todos vocês.

A minha orientadora **Cristina Antoniali Silva**,

Deixo registrado meu sincero agradecimento a senhora, por ter me acolhido de maneira tão gentil desde a minha primeira orientação. Sou grata por você ter me conduzido durante o meu contato com a produção científica e ter tornado tudo mais agradável. Levarei os seus ensinamentos para sempre comigo, assim como as críticas construtivas que me edificaram e me tornaram uma profissional melhor. Obrigada por contribuir na minha formação e por todo o carinho e paciência para comigo.

A minha coorientadora **Alessandra Marcondes Aranega**,

Por todo o carinho e colaboração no meu mestrado por espontânea vontade. Sou muito grata por toda sua orientação no período de ida as creches municipais de Araçatuba, por cada autorização que me ajudou a conseguir com a Secretaria de Saúde e Educação, que foram de suma importância para a condução do meu projeto de pesquisa, pelo material que doou para que eu pudesse fazer o tratamento das crianças. De coração, obrigada.

Ao professor **Antônio Hernandes Chaves Neto**,

Que com seu jeito animado e extrovertido me proporcionou todo o conhecimento prático das metodologias que eu tanto temia. Obrigada por não medir esforços em me ajudar e colaborar para com o meu projeto, por cada bolo que comprou pensando em nós alunos e por todas as dicas e ensinamentos transmitidos. Minha eterna gratidão.

As professoras **Cristiane Duque** e **Marcelle Danelon**,

Por aceitarem o convite para compor minha banca examinadora durante o meu Exame Geral de Qualificação – EGQ. Jamais esquecerei deste momento agradável e extremamente produtivo no qual passamos juntas. Agradeço por todas as considerações, de muita valia, feitas para o aprimoramento da minha pesquisa. Que tenhamos mais oportunidades de estarmos juntas. Obrigada!

As professoras **Thayse Yumi Hosida** e **Franciny Querobim Ionta**,

Por aceitarem o convite para compor minha banca examinadora durante o Julgamento da minha Dissertação do Mestrado. Me alegra muito poder dividir esse momento especial da minha vida com vocês, duas professoras que eu admiro muito e que me inspiram como profissional. Muito obrigada!

Ao meu amigo **Heitor Ceolin Araújo**,

Agradeço imensamente a você, por toda paciência em tirar minhas dúvidas e por me motivar quando tudo parecia estar dando errado. Obrigada por cada conhecimento transmitido, por todas as mensagens e ligação que me auxiliaram a resolver tudo. Menos que de longe, e em meio aos seus compromissos, você sempre estava disposto em me ajudar. Gratidão.

As minhas amigas do Laboratório de Bioquímica, **Gabriela** e **Rayara**,

Serei eternamente grata a vocês, por toda a disposição em me ensinar os experimentos, pelo empenho e dedicação na minha pesquisa. O companheirismo de vocês fazia com que os dias de trabalho árduo fossem

tranquilos e animados. Agradeço a acolhida e amizade que criamos dentro do laboratório, vocês foram essenciais para que este trabalho fosse finalizado. Levarei vocês em meu coração. Muito obrigada.

Aos Professores e Alunos do Departamento de Ciências Básicas,

Que de maneira direta e indireta contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual. Agradeço pelas amizades construídas e pelos conhecimentos e ensinamentos que foram compartilhados.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,

Na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, o Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara; do vice-diretor, o Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem; do coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências, o Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan; e do vice-coordenador, o Prof. Assoc. Rogério de Castilho Jacinto, pela oportunidade de usufruir das condições institucionais que proporcionaram a transmissão de conhecimento e a possibilidade de realizar o curso de pós-graduação, para obtenção do título de Mestre.

A Prefeitura Municipal de Araçatuba,

Pela parceria com a Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP através do Projeto de Extensão “Seu Melhor Sorriso e Sorriso Feliz: Fortalecimento das Ações de Atenção Primária à Saúde Bucal na Primeiríssima Infância na Educação Infantil” que me proporcionou a oportunidade de participar das avaliações bucais das crianças e, assim, selecionar os pacientes para a minha pesquisa. E, posteriormente, por ceder

um consultório odontológico na EMEB Prof^a. Euza Neuza Marcondes Larios, com todos os equipamentos e materiais disponíveis, para o tratamento clínico das crianças selecionadas da minha pesquisa. Agradeço na pessoa do prefeito da cidade de Araçatuba, o senhor Dilador Borges Damasceno, da secretária de saúde da cidade de Araçatuba, a senhora Carmem Sílvia Guariente, da secretária de educação da cidade de Araçatuba, a senhora Silvana Souza e Souza, e demais envolvidos, pela colaboração e recursos.

As Cirurgiãs-Dentistas preceptoras do projeto,
**Lilian Maria Brisque Pignatta Costa, Denize Bonacasata Strabelli
Zampieri, Regina Léa França de Held e Adriana Kazuyo Yoshida,**

Sou grata a cada uma de vocês, que com toda gentileza receberam nós, alunos, durante nossa trajetória nas creches, sempre nos orientando pacientemente. Em particular, agradeço a vocês pelo convívio extremamente agradável, pelas conversas que muitas das vezes animavam meu dia e me encorajavam a querer seguir na saúde pública, e por toda a ajuda com os odontogramas para seleção das crianças da minha pesquisa. Vocês foram parte desta minha conquista. Obrigada.

A toda equipe da **EMEB Prof^a. Euza Neuza Marcondes Larios,**

Por reconhecerem a importância da minha pesquisa, pela ajuda e disposição que tiveram em todo o decorrer das minhas coletas das amostras salivares e no tratamento das crianças.

As Crianças participantes desta pesquisa,

Que cederam o material biológico (saliva) para que o meu trabalho fosse executado, mesmo que não compreendessem a importância da minha pesquisa. Agradeço demais aos pequenos, pois fizeram dos meus dias de atendimento os mais animados e descontraídos.

Aos Pais/Responsáveis pelas crianças,

Pelo entendimento da importância da ciência na vida da população e autorizaram os seus filhos a participarem desta pesquisa, a qual trará, posteriormente, novas informações e conhecimentos para o mundo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, que apoiou financeiramente esta pesquisa, por meio da concessão da minha Bolsa de Mestrado.

Epígrafe

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”

(Provérbios 16:3)

Resumo

Lopes AO. **O tratamento restaurador atraumático das lesões de cárie reverte às alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo?** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento restaurador atraumático da cárie reverte às alterações dos biomarcadores salivares de estresse oxidativo em crianças com cárie em diferentes estágios. Foram incluídos neste estudo 30 pacientes (CAAE: 52083921.2.0000.5420) de 4-6 anos de idade, com lesão cariosa classificada pelo ICCMSTM, atendidos em uma EMEB do município de Araçatuba, SP, Brasil. As crianças foram divididas em 2 grupos (n=15/grupo), de acordo com a severidade de cárie, sendo lesão cariosa em esmalte (grupo A) e lesão cariosa em dentina (grupo B). Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas dos pacientes antes, imediatamente após e sete dias após o procedimento restaurador utilizando Cimento Ionômero de Vidro, pela técnica de restauração atraumática. As coletas foram realizadas seguindo o regime de 2 horas de jejum. Experimentos bioquímicos, previamente padronizados para amostras de saliva, foram conduzidos para avaliação da concentração total de proteínas, ácido úrico (AU), capacidade antioxidante total (TAC) e dano oxidativo (Malondialdeído, MDA). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos por análise estatística aplicando teste de multivariância (ANOVA, com pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a concentração de MDA aumentou após o tratamento clínico da cárie, enquanto os valores da TAC salivar e AU apresentaram uma redução. A intervenção clínica não reduziu os valores da concentração de proteína total salivar. Nossos resultados demonstraram que o tratamento clínico das lesões de cárie pode reverter as alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo, exceto a concentração de proteínas salivares.

Palavras-Chave: saliva, cárie dentária, estresse oxidativo, antioxidantes.

Abstract

Lopes AO. **Does atraumatic restorative treatment of caries lesions reverses alterations in salivary biomarkers of oxidative stress?** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate whether the atraumatic restorative treatment of caries reverses alterations in salivary biomarkers of oxidative stress in children with caries in different stages. Thirty patients (CAAE: 52083921.2.0000.5420) aged 4-6 years, with carious lesions classified by the ICCMSTM, attended at an EMEB in the city of Araçatuba, SP, Brazil, were included in this study. The children were divided into 2 groups (n=15/group), according to the severity of the caries: enamel caries (group A) and dentin caries (group B). Unstimulated saliva samples were collected from patients before, immediately after and seven days after the restorative procedure using Glass Ionomer Cement, by the atraumatic restoration technique. Collections were performed following a 2-hour fasting regimen. Biochemical experiments, previously standardized for saliva samples, were conducted to evaluate total protein concentration, uric acid (UA), total antioxidant capacity (TAC) and oxidative damage (Malondialdehyde, MDA). The results obtained were compared between the groups by statistical analysis applying the multivariate test (ANOVA, with Student-Newman-Keuls post-test, $p < 0.05$). The results showed that the concentration of MDA increased after the clinical treatment of caries, while the values of salivary TAC and UA values showed a reduction. The clinical intervention did not reduce salivary total protein concentration values. Our results demonstrated that the clinical treatment of caries lesions can reverse the changes in salivary biomarkers of oxidative stress, except the concentration of salivary proteins.

Keywords: saliva, dental caries, oxidative stress, antioxidants.

Listas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características gerais dos pacientes e coleta salivar expressa em porcentagem (%) por: A) Gênero, B) Média da idade dos pacientes, C) Número de dentes cariados, D) Severidade das lesões de cárie, E) Período da coleta salivar, F) Fluxo Salivar (média $\pm$ DP) expresso em ml/min, nos diferentes períodos (A, D, D7); letras minúsculas apresentam similaridade estatística entre os períodos comparados. **Pág. 43**
- Figura 2.** Concentração de Proteína Total (g/L) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Gênero, B) Idade em anos, C) Número de dentes cariados, D) Severidade das lesões de cárie. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$ entre os grupos comparados. **Pág. 44**
- Figura 3.** Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, em $\mu\text{mol/g}$ proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte, D) Lesão em Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ entre os grupos comparados. **Pág. 45**
- Figura 4.** Capacidade Antioxidante Total (TAC, em $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte e Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ entre os grupos comparados. **Pág. 46**
- Figura 5.** Concentração de Ácido Úrico (AU, em mg/g de proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte, D) Lesão em Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$ entre os grupos comparados. **Pág. 47**

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Antes.
AAPD	<i>“American Academic of Pediatric Dentistry”</i> , Academia Americana de Odontopediatria.
ANOVA	Análise de Variância.
ART	<i>“Atraumatic Restorative Treatment”</i> , Tratamento Restaurador Atraumático.
AU	Ácido Úrico.
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.
D7	Depois de 7 dias.
D	Depois.
DP	Desvio Padrão.
ECC	<i>“Early Childhood Caries”</i> , Cárie na primeira infância.
EMEB	Escola Municipal de Educação Básica.
FRAP	<i>“Ferric Reducing Antioxidant Power”</i> , Poder Antioxidante Férrico Reduzido.
g/L	Gramas por litro.
ICCMS™	<i>“International Caries Classification and Management System”</i> , Sistema Internacional de Classificação e Gestão da Cárie.
ICDAS	<i>“International Caries Detection and Assessment System”</i> , Sistema Internacional de Avaliação e Detecção de Cárie.
MDA	Malondialdeído.
mg/g	Miligramas por grama.

ml/min	Mililitros por minuto.
μL	Microlitro.
μmol/g	Micromol por grama.
μmol Fe²⁺/g	Micromol de ferro (II) por grama.
nm	Nanômetro.
NO	“ <i>Nitric Oxide</i> ”, Óxido Nítrico.
NO₂	Nitrito.
RPM	Rotações por minuto.
SOD	Superóxido Dismutase.
TAC	“ <i>Total Antioxidant Capacity</i> ”, Capacidade Antioxidante Total.
TBARS	“ <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ”, Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
TPTZ	2,4,6-tris(tripiridyl)-S-triazine.
UBS	Unidade Básica de Saúde.

Sumário

SUMÁRIO

MANUSCRITO	26
Resumo	27
Introdução	28
Materiais e Métodos	29
Resultados	33
Discussão	35
Conclusão	38
Referências	39
LISTA DE FIGURAS	42
HIGHLIGHTS E DECLARAÇÕES	48
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	49

MANUSCRITO

O Tratamento Restaurador Atraumático das Lesões de Cárie Reverte as Alterações de Biomarcadores Salivares de Estresse Oxidativo?

Adrielle Ouchi Lopes^a, Rayara Nogueira de Freitas^a, Gabriela Alice Fiais^b, Antonio Hernandes Chaves-Neto^{a,b,c}, Heitor Ceolin Araujo^a, Mariana Santana Quirino^b, Alessandra Marcondes Aranega^d, Juliano Pelim Pessan^{a,e}, Cristina Antoniali^{a,b,c}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências, ^bPrograma de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, ^cDepartamento de Ciências Básicas, ^dDepartamento de Diagnóstico e Cirurgia, ^eDepartamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rua José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, 16015-050, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

***Autor para correspondência:** Dr^a Cristina Antoniali

E-mail: cristina.antoniali@unesp.br

Endereço Permanente: Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça, Araçatuba, SP, CEP 16015-050, Brasil.

*Dissertação apresentada em formato de artigo científico sob as normas da revista "Archives of Oral Biology" (Impact Factor 2021: 2.64, Q1).

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento restaurador atraumático da cárie reverte as alterações dos biomarcadores salivares de estresse oxidativo em crianças com cárie em diferentes estágios.

Metodologia: Foram incluídos neste estudo 30 pacientes (CAAE: 52083921.2.0000.5420) de 4-6 anos de idade, com lesão cariosa classificada pelo ICCMSTM, atendidos em uma EMEB do município de Araçatuba, SP, Brasil. As crianças foram divididas em 2 grupos (n=15/grupo), de acordo com a severidade de cárie, sendo lesão cariosa em esmalte (grupo A) e lesão cariosa em dentina (grupo B). Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas dos pacientes antes, imediatamente após e sete dias após o procedimento restaurador utilizando Cimento Ionômero de Vidro, pela técnica de restauração atraumática. As coletas foram realizadas seguindo o regime de 2 horas de jejum. Experimentos bioquímicos, previamente padronizados para amostras de saliva, foram conduzidos para avaliação da concentração total de proteínas, ácido úrico (AU), capacidade antioxidante total (TAC) e dano oxidativo (Malondialdeído MDA). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos por análise estatística aplicando teste de multivariância (ANOVA, com pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Resultados: Os resultados demonstraram que a concentração de MDA aumentou após o tratamento clínico da cárie, enquanto os valores da TAC salivar e AU apresentaram uma redução. A intervenção clínica não reduziu os valores da concentração de proteína total salivar.

Conclusão: Nossos resultados demonstraram que o tratamento clínico das lesões de cárie pode reverter as alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo, exceto a concentração de proteínas salivares.

Palavras-Chave: saliva, cárie dentária, estresse oxidativo, antioxidantes.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Academia Americana de Odontopediatria (AAPD, do termo em inglês *American Academic of Pediatric Dentistry*) a cárie na primeira infância (ECC, do termo em inglês *Early Childhood Caries*) é classificada como a presença de uma ou mais superfícies cariadas (cavitada ou não cavitada), perdidas ou restauradas (devido à cárie) em dentes decíduos de crianças com menos de seis anos de idade (American Academic of Pediatric Dentistry, 2022). Quando não tratada, a cárie promoverá consequências de forte impacto imediato e em longo prazo na qualidade da saúde bucal e da saúde sistêmica da criança, podendo impactar na vida social da criança (Pitts et al., 2019; Colak et al., 2013). O Sistema Internacional de Avaliação e Detecção de Cárie (ICDAS, do termo em inglês *International Caries Detection and Assessment System*) é um sistema de avaliação e detecção pelo diagnóstico, prognóstico e manejo clínico da cárie dentária (Zandoná et al., 2010). Porém com o objetivo de sintetizar estas informações, foi criado o Sistema Internacional de Classificação e Gestão da Cárie (ICCMSTM, do termo em inglês *International Caries Classification and Management System*) que facilita o trabalho de pesquisadores e clínicos que buscam integrar e sintetizar as informações, incluindo o *status* de risco de cárie, e favorecer a revisão sistemática das evidências epidemiológicas e de saúde pública relacionada ao tratamento clínico da cárie (Isamail et al., 2007; ICDAS 1 Foundation).

A saliva tem sido empregada na detecção de doenças sistêmicas e orais, pois contém biomarcadores que podem ser analisados e quantificados (Spielman et al., 2011; Malamud et al., 2011; Senthil Eagappan et al., 2016; Hassaneen et al., 2017). Além disto, a coleta da saliva é um método não invasivo, de fácil execução, seguro, indolor, e de baixo custo. Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que o dano oxidativo está reduzido na saliva de crianças com cárie na primeira infância em consequência do aumento da capacidade antioxidante total (TAC) e dos sistemas antioxidantes enzimático e não-enzimático (Silva et al., 2016). Em estudo recente, foi demonstrado que há uma forte correlação positiva entre a TAC, o ácido úrico (AU), a atividade da superóxido dismutase (SOD) e a severidade das lesões de cárie, levando a redução progressiva do dano oxidativo salivar (Araujo et al., 2020). Adicionalmente, a hipótese levantada previamente de que a progressão das lesões de cárie estaria diretamente associada à maior biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) salivar foi confirmada por estudos de nosso grupo, nos quais demonstrou-se que na saliva de crianças (1-3 anos de idade) com lesões

de cárie em esmalte e dentina há concentrações aumentadas de nitrito (NO₂, metabólito quantificável de óxido nítrico), quando comparada a saliva de crianças sem cárie (Lisboa, 2022).

Dessa maneira, existe evidência de que a cárie altera significativamente vários biomarcadores salivares de estresse oxidativo e, a partir disto, a hipótese do presente estudo foi que o tratamento restaurador atraumático (ART, do termo em inglês *Atraumatic Restorative Treatment*) da cárie poderia reverter às alterações dos biomarcadores salivares de estresse oxidativo. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar possíveis alterações dos biomarcadores salivares de estresse oxidativo imediatamente após e sete dias após a intervenção clínica nas lesões cariosas. A concentração total de proteínas, os níveis de MDA, a capacidade antioxidante total (TAC) e o ácido úrico foram quantificados na saliva de crianças, antes e após o tratamento clínico das lesões de cáries. Esses resultados permitiram demonstrar pela primeira vez a eficácia do ART na reversão das alterações salivares encontradas na presença das lesões cariosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos a seguir foram encaminhados previamente para análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Humanos da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP – Universidade Estadual Paulista (CAAE 52083921.2.0000.5420).

1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

Trinta crianças na faixa etária de 4-6 anos foram selecionadas entre os pacientes avaliados no projeto “Seu Melhor Sorriso e Sorriso Feliz: Fortalecimento das Ações de Atenção Primária à Saúde Bucal na Primeiríssima Infância na Educação Infantil” da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP em parceria com a Prefeitura Municipal de Araçatuba. As demais crianças avaliadas que não foram selecionadas para este estudo e que apresentavam severidade igual ou maior de cárie foram encaminhadas para tratamento odontológico em Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Araçatuba, SP.

Inicialmente, foi realizada uma primeira reunião com os professores e responsáveis pelas crianças para explicar detalhadamente o protocolo do estudo e responder a possíveis questões levantadas pelos pais ou responsáveis. Posteriormente, foi distribuído o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a todos os pais/cuidadores das crianças e o Termo de Assentimento a todas as crianças selecionadas. Aquelas crianças que não tiveram os termos assinados (critério de exclusão), crianças com doenças sistêmicas ou crianças que faziam uso de medicamentos não fizeram parte do estudo. A partir da obtenção dos termos de consentimento assinados, foi feita a avaliação clínica, duplo-cego para diagnóstico das lesões de cárie por Cirurgiã-Dentista calibrada e experiente na área. Os critérios de inclusão foram crianças com cárie em esmalte (lesão de escore 3-4 do ICDAS) e em dentina (lesão de escore 5-6 do ICDAS), com no máximo dois dentes cariados. As crianças selecionadas foram divididas em 2 grupos (n=15/grupo) de acordo com critérios do ICCMSTM (Ismail et al., 2015).

Grupo A – Lesão intermediária de cárie: Lesão de cárie com cavitação em esmalte.

Grupo B – Cárie em estágio avançado: Lesão de cárie com cavitação em dentina.

O número amostral foi calculado com base em estudos prévios de nosso grupo (Araújo et al., 2020), utilizando como variável primária a concentração de ácido úrico salivar e um poder de teste de 80%. O cálculo foi realizado utilizando o programa Open Epi, versão 3.

2. *TRATAMENTO CLÍNICO*

Os atendimentos foram realizados em um consultório odontológico localizado em uma EMEB (Escola Municipal de Educação Básica) do município de Araçatuba, SP, Brasil. Os procedimentos restauradores atraumáticos seguiram os protocolos de remoção parcial ou total das lesões de cárie com curetas específicas, de acordo com cada indicação, seguido do isolamento relativo da região e condicionamento ácido (ácido poliacrílico 11,5%) por 15 segundos. Após a lavagem da região com água (30 segundos) e secagem com papéis filtros estéreis, a cavidade foi selada utilizado um cimento de ionômero de vidro convencional (Ketac Molar EasyMix® – 3M) e para finalização do procedimento foram realizados os devidos polimentos e ajustes oclusais.

3. COLETA DA SALIVA

Para minimizar variações, a saliva total não estimulada foi coletada com 2 horas de jejum e após a higiene bucal feita somente com água e escova de dente, devido a possível influência de alimentos e bebidas ingeridos recentemente e ao uso de produtos fluoretados. A coleta salivar ocorreu em três momentos, ou seja, anteriormente, imediatamente após e 7 dias após o tratamento clínico das lesões de cárie. Todas as amostras salivares foram coletadas pela Cirurgiã-Dentista/Pesquisadora utilizando um dispositivo apropriado para coleta de saliva (Salivette®). Para isto, as crianças foram colocadas em cadeira ou no colo da Cirurgiã-Dentista, e o rolete de algodão foi colocado abaixo da língua, permanecendo no local durante 5 minutos. Quando houve alguma intercorrência durante a coleta salivar, o procedimento foi interrompido sem uma nova tentativa. Após a coleta, as amostras foram mantidas em gelo até a centrifugação no laboratório de pesquisa (Silva et al., 2016; Araújo et al., 2020; Lisboa, 2022).

4. DETERMINAÇÃO DO FLUXO SALIVAR

Para a determinação do fluxo salivar não estimulado, adotou-se a mesma metodologia usada previamente pelo nosso grupo (Araujo et al., 2020). Rapidamente, as amostras salivares foram coletadas durante 5 min utilizando um Salivette®. Após a coleta, as amostras foram mantidas em gelo e no laboratório de pesquisa foram centrifugadas a 4000 x RPM durante 10 min. O volume total do sobrenadante foi quantificado. O fluxo salivar foi determinado pelo volume total de saliva coletada durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em ml/min (Silva et al., 2016; Lisboa, 2022).

5. ANÁLISE BIOQUÍMICA DA SALIVA

As amostras de saliva foram centrifugadas a 4000 x RPM durante 10 min e os sobrenadantes foram fracionados em 6 alíquotas (100-500µL) e mantidos a -80°C até o momento das análises bioquímicas.

As análises bioquímicas foram realizadas utilizando placas de 96 poços, as quais foram preenchidas com volumes específicos de saliva e reagentes. As reações colorimétricas foram analisadas em leitora de micro placas Power Wave 340-Biotek.

5.1 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SALIVARES

A quantificação de proteínas foi feita em alíquotas de 15µL de saliva pelo método de Lowry et al. (1951). Foi utilizada uma curva padrão de diferentes concentrações de albumina de soro bovino, como quantificação da concentração de proteínas na saliva. Quando concentrações acima do último ponto da curva padrão foram detectadas, as amostras foram diluídas e uma nova avaliação foi feita. Os valores de absorbância foram determinados a 660nm. Os resultados foram expressos em g/L. A concentração de proteína total foi usada para normalização dos resultados obtidos nas análises bioquímicas descritas abaixo (Lowry et al., 1951).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

O MDA é um dos produtos de peroxidação lipídica avaliados pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), considerado um biomarcador do dano oxidativo. O MDA foi determinado como descrito por Buege & Aust (1978). Foi adicionado ácido tricloroacético (15% m/v) às amostras de saliva (200µL) para precipitar as proteínas e acidificar a solução. Esta mistura foi então centrifugada (4000 x RPM, 5 min, 25°C) e logo em seguida, o ácido tiobarbitúrico (TBARS, 0,67% m/v) foi adicionado ao meio de reação. A amostra foi colocada num banho-maria com temperatura de 100°C, por 60 min. A absorbância foi lida a 532nm, e o coeficiente de absorção molar utilizado foi de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em µmol/g de proteína (Buege; Aust, 1978).

5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL SALIVAR (TAC)

A capacidade antioxidante total salivar foi avaliada por ensaio de poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) previamente padronizado por Benzie & Strain (1996). Este método baseia-se na redução do complexo férrico tripiridil triazina (Fe^{3+} TPTZ) para formar Fe^{2+} em meio ácido. Foi utilizada uma alíquota de saliva (10 µL). A absorbância da solução foi determinada a 593nm, utilizando uma curva padrão de sulfato ferroso. Os resultados foram expressos em µmol Fe^{2+} /g de proteína (Benzie; Strain, 1996).

5.4 ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico foi determinado na saliva (10 µL) utilizando um kit comercial (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil), baseado no método enzimático de Trinder, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/g de proteína.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão), submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e por ter distribuição normal, foram submetidos à ANOVA seguida do teste pós-teste Student-Newman-Keuls (GraphPad, versão 8.0, GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, USA). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo, avaliamos um grupo de 30 crianças. Deste grupo de crianças, 63,3% eram do gênero masculino e 36,6% do gênero feminino (Figura 1–A), com média de idade de 66,6% para crianças com 6 anos de idade, 26,6% para crianças de 5 anos e 6,6% para crianças com 4 anos de idade (Figura 1–B). As crianças diagnosticadas com apenas um dente cariado representaram 43,3% da amostra, enquanto o restante (56,6%) das crianças apresentava dois dentes cariados na cavidade bucal (Figura 1–C). A quantidade de crianças pertencentes ao grupo A (lesão de cárie com cavitação em esmalte) foi igual ao grupo B (lesão de cárie com cavitação em dentina), com um total de 15 crianças por grupo (Figura 1–D). A coleta da saliva ocorreu em 70% dos casos no período da manhã e 30% no período da tarde (Figura 1–E). A partir da coleta, determinamos o fluxo salivar que variou de 0,26 – 0,29 ml/min entre as crianças do estudo. Não observamos diferenças significativas no fluxo salivar entre os grupos (com cárie de esmalte e dentina) ou entre os diferentes tempos de coleta (antes, depois e depois de 7 dias do tratamento) (Figura 1–F).

A concentração de proteína salivar, quando analisada em função ao gênero (masculino e feminino), foi maior ($p < 0,0001$) em meninos no período de coleta D7 em relação ao período D e também maior ($p = 0,0173$) que no período A (Figura 2–A). Não

foram observadas diferenças na concentração de proteínas salivares entre os períodos no grupo de meninas. Quando comparamos ambos os gêneros, encontramos diferença estatística apenas no período D7 ($p=0,0060$). Quando avaliada a idade das crianças, a concentração de proteína salivar aumentou ($p=0,0013$) em crianças de 6 anos de idade no período D7 (Figura 2–B). Não houve diferença na concentração de proteína na saliva de crianças de 4 e 5 anos de idade nos diferentes momentos avaliados. Crianças com dois dentes cariados apresentaram um aumento ($p=0,0016$) na concentração de proteína salivar no período D7 (Figura 2–C). Não foi encontrada diferença na concentração de proteína na saliva de crianças com apenas um dente cariado nos diferentes períodos de coleta salivar. Considerando a severidade da lesão (Figura 2–D), crianças com cárie em esmalte não demonstraram alterações na concentração de proteína salivar em nenhum dos períodos. Já nas crianças com cárie em dentina foi observada uma redução ($p=0,0455$) no período D e um aumento ($p=0,0001$) no período D7 na concentração de proteína.

As concentrações salivares de MDA se mostraram aumentadas ($p=0,0416$) em crianças com dois dentes cariados (Figura 3–A), imediatamente após o tratamento clínico das lesões (período D). Crianças com apenas um dente cariado não apresentaram diferença significativa nas concentrações de MDA salivar ($p>0,05$) nos diferentes períodos. Avaliando a severidade das lesões cariosas (esmalte e dentina), observamos um aumento ($p=0,0215$) na concentração salivar de MDA imediatamente após o tratamento clínico da cárie (período D) (Figura 3–B). Observamos que esse aumento se mostrou significativo na saliva de crianças com cárie em dentina, uma vez que quando analisados os resultados separadamente, a cárie em dentina (Figura 3–D) denota um aumento ($p=0,0208$) na concentração de MDA salivar no período D, enquanto a cárie de esmalte (Figura 3–C) não promove diferenças nas concentrações salivares de MDA ($p>0,05$) nos períodos avaliados.

Os valores da TAC na saliva de crianças com dois dentes cariados foram menores ($p=0,0131$) após 7 dias do tratamento (período D7) em comparação a imediatamente após o tratamento (período D) (Figura 4–A). Crianças com apenas um dente cariado não apresentaram alterações significantes nos valores da TAC salivar ($p>0,05$) nos diferentes períodos de coleta. A TAC salivar apresentou uma redução ($p=0,0032$) em seus valores quando analisamos a severidade das lesões cariosas (esmalte e dentina) sete dias após o tratamento (D7) em relação à imediatamente após o tratamento (período D) (Figura 4–B). Analisando os resultados separadamente, a cárie em esmalte não promoveu nenhuma alteração ($p>0,05$) nos valores da TAC salivar nos períodos de coleta, enquanto a cárie

em dentina reduziu ($p=0,0467$) a TAC salivar no período D7 quando comparado ao período D (Figura 4–C).

Os valores de AU na saliva de crianças com dois dentes cariados (Figura 5–A) estavam reduzidos ($p=0,0008$) após sete dias do tratamento clínico (D7) em comparação à imediatamente após o tratamento (período D) ou com os valores anteriores. Crianças com apenas um dente cariado não demonstraram alteração nos valores de AU salivar ($p>0,05$) nos diferentes momentos de coleta. Observamos uma redução ($p=0,0006$) nos valores de AU salivar no período D7, comparado ao período D, quando analisamos a severidade das lesões cariosas (esmalte e dentina) (Figura 5–B). As lesões cariosas em dentina (Figura 5–D), quando avaliadas separadamente apresentam uma redução ($p=0,0117$) na concentração de ácido úrico salivar observada no período D7 (sete dias após o tratamento) em comparação ao período D (imediatamente após o tratamento). Já as lesões cariosas em esmalte não apresentam alterações na concentração de ácido úrico salivar ($p>0,05$) nos diferentes momentos de coleta (Figura 5–C).

DISCUSSÃO

Neste estudo, a hipótese levantada foi parcialmente comprovada pelos resultados apresentados. O tratamento clínico das lesões de cárie reverteu as alterações de alguns biomarcadores salivares de estresse oxidativo, como as concentrações salivares de MDA, que representa o dano oxidativo, e os valores de TAC e AU, que estariam relacionadas aos sistemas antioxidantes não enzimáticos. Entretanto, contrariando nossa hipótese, a concentração total de proteínas salivares apresentou resultados controversos ao que era esperado, observamos um aumento após o tratamento clínico.

As amostras de saliva não estimulada foram coletadas, preferencialmente, no período matutino e após 2 horas de jejum, uma vez que, como descrito por Araujo et al. (2020), neste período haveria menor variação relacionada ao ritmo circadiano e/ou de bebidas e comidas ingeridas. A revisão sistemática com metanálise descrita por Martins et al. (2022) demonstrou que o fluxo salivar é menor em crianças com cárie do que em crianças sem cárie. Com isso, era esperado que após o tratamento clínico das lesões de cárie, os valores de fluxo salivar fossem possivelmente aumentados. No entanto, os valores do fluxo salivar não foram alterados após o tratamento. Estes resultados corroboram resultados prévios que não mostraram diferenças no fluxo salivar entre

crianças sem cárie e crianças com cárie de esmalte e dentina (Silva et al., 2016; Araujo et al., 2020; Lisboa, 2022).

Em estudos anteriores, a concentração de proteína salivar em crianças com cárie dentária apresentou-se aumentada quando comparada ao grupo livre de cárie (Silva et al., 2016; Martins et al., 2022). Quando se avaliou a cárie em diferentes estágios de progressão, foi observado que a concentração de proteína salivar aumentava significativamente de acordo com a severidade (esmalte e dentina), enquanto as lesões cariosas em estágio inicial (sem cavitação) não alteravam os níveis de proteína salivar (Jurczak et al., 2017; Araujo et al., 2020). Neste estudo, mostramos que meninos de 6 anos, com dois dentes cariados e com lesão em dentina, apresentaram após 7 dias do tratamento clínico da cárie um aumento significativo na concentração de proteína salivar. Esperávamos que houvesse a redução dos níveis de proteína salivar após o tratamento das lesões cariosas, para que ocorresse o restabelecimento do ambiente oral, porém isto não ocorreu. Esse aumento da concentração de proteína salivar poderia ser associado a diferentes fatores além da cárie, como gênero e a idade. No entanto, somente foram encontrados aumentos significativos na saliva de meninos com idade superior a 7 anos, prevalecendo em idades relacionadas aos períodos de adolescência e idade adulta (Pandey et al., 2015; Prabhakar et al., 2009; Tolunoglu et al., 2006).

Outra explicação possível para o aumento na concentração de proteína salivar após o tratamento clínico das lesões cariosas seria o papel das proteínas salivares na proteção do ambiente oral. Como descrito anteriormente, o aumento da concentração de proteínas salivares seria uma resposta protetora e/ou adaptativa do organismo frente a diferentes estímulos (Amerongen et al., 2004). Além disso, o tempo de 7 dias após o tratamento clínico, que se deteve apenas na restauração das lesões cariosas, possivelmente não foi suficiente para reverter os estímulos associados a doença cárie. Se mudanças no comportamento alimentar e na higienização da criança não foram alterados neste período, os fatores associados à doença ainda estariam presentes, mantendo um ambiente favorável ao desenvolvimento da cárie e exigindo que o organismo aumentasse a concentração de proteínas como resposta protetora. Novos estudos são necessários para a confirmação desse mecanismo e/ou para melhor entendimento do aumento na concentração de proteínas salivares neste período. A análise proteômica da saliva é um método de avaliação eficaz para a compreensão do comportamento das proteínas presentes na saliva humana e sua repercussão na saúde bucal e sistêmica, e poderia proporcionar o

entendimento das alterações associadas as patogenidades, como da doença cárie (Oliveira et al., 2022).

O dano oxidativo na saliva é mensurado pela quantificação do MDA, um biomarcador salivar, o qual é avaliado pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (Guentsch et al., 2008; Martins et al., 2022). Em estudos prévios, foram observados níveis reduzidos de MDA salivar em crianças com cárie dentária (Silva et al., 2016; Martins et al., 2022). Além disso, também foi observado que as concentrações salivares de MDA diminuem progressivamente em saliva de crianças com lesão cariiosa cavitada (esmalte e dentina) quando comparadas as lesões cariosas não cavitadas (estágio inicial da cárie) (Araujo et al., 2020). No atual estudo, esperávamos que os níveis de MDA fossem aumentados após o tratamento das lesões de cárie. Nossos resultados mostraram um aumento significativo do MDA salivar imediatamente após o tratamento, nos mostrando que o tratamento da cárie reverteu o quadro clínico de maior severidade, ou seja, dois dentes com cárie em dentina. No entanto, após 7 dias de tratamento, os valores encontrados de MDA salivar não foram diferentes dos encontrados na saliva de crianças com cárie. Estes dados sugerem que o dano oxidativo, assim como as proteínas salivares, seriam biomarcadores mais associados à doença do que a lesão cariiosa. Portanto, para a manutenção dos níveis de MDA salivar aumentados, seria necessário que, além da intervenção clínica, houvesse a intervenção nos fatores que predispõe a doença cárie, os quais estão relacionados diretamente à dieta, higiene bucal, acúmulo da placa bacteriana, escasso acesso a serviços de saúde bucal, dentre outros (Pitts et al., 2019; Colak et al., 2013).

A quantificação da TAC salivar, avaliada pelo método de capacidade de redução férrica (FRAP, do termo inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), nos revela dados importantes a respeito do equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes (Zarban et al., 2017; Krumar et al., 2015). Crianças com cárie severa da infância apresentam um aumento significativo na TAC salivar em comparação ao grupo livre de cárie (Silva et al., 2016; Martins et al., 2022). A severidade das lesões de cárie aumenta progressivamente os valores de TAC salivar, pois lesões cavitadas (esmalte e dentina) promovem aumento significantemente maior do que em lesões não cavitadas (cárie inicial), as quais não alteraram os valores da TAC salivar (Jurczak et al., 2017; Araujo et al., 2020). A TAC salivar aumentada estaria diretamente associada a níveis menores do dano oxidativo, e tem sido considerado um biomarcador salivar de cárie dentária (Krumar et al., 2015, Martins et al., 2022). No presente estudo, observamos que após 7 dias do tratamento

clínico das lesões cariosas a TAC está reduzida na saliva de crianças, sugerindo que o tratamento clínico da cárie proporcionaria uma adequação na atividade dos sistemas antioxidantes. No entanto, como mostrado na Figura 3, não podemos até o momento correlacionar os resultados de MDA e TAC salivar.

O ácido úrico (AU) salivar é considerado um antioxidante potente, pertencente ao grupo dos antioxidantes não enzimáticos, que tem como função a eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres (Ames et al., 1981) do meio. A concentração de AU salivar está aumentada em crianças com cárie severa da infância em relação às crianças livre de cárie (Silva et al., 2016; Martins et al., 2022). A progressão da cárie, com lesões cavitadas (esmalte e dentina), aumenta progressivamente a concentração de AU salivar, quando comparado às lesões não cavitadas (Araújo et al., 2020). Neste estudo, observamos que os valores de AU na saliva de crianças estão reduzidos após 7 dias da intervenção clínica. Estes dados mostram que os valores de AU salivar estão diretamente relacionados com os valores da TAC salivar, devido ao ácido úrico ser responsável por 70% da capacidade antioxidante da saliva (Nagler et al., 2002), assim alterações dos níveis de ácido úrico salivar possivelmente alteram os valores de TAC salivar.

Estudos complementares aos apresentados no presente estudo serão necessários para a melhor compreensão do efeito do ART sobre as alterações salivares encontradas. A avaliação da saliva destes pacientes em períodos de 4-6 meses após o tratamento clínico será importante para identificarmos a eficácia do tratamento na manutenção, ou não, das alterações salivares. Além disto, outros fatores limitantes do estudo, como a má higienização diária e a dieta cariogênica, deverão ser controlados após o tratamento para não influenciar nos resultados das análises realizadas.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que o tratamento restaurador atraumático das lesões de cárie pode reverter alterações de biomarcadores salivares de estresse oxidativo, exceto a concentração de proteínas salivares, que parecem estar mais relacionadas à doença cárie e seus fatores causais do que diretamente as lesões cariosas. Os mecanismos associados a estes efeitos não foram totalmente esclarecidos até o momento, sendo necessários experimentos complementares.

Fontes de Financiamento

O presente estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001; e da Pró-reitora de Extensão e Cultura (PROEC) da UNESP.

REFERÊNCIAS

American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on early childhood caries (ECC): Consequences and preventive strategies. The Reference Manual of Pediatric Dentistry. Chicago, Ill.: American Academy of Pediatric Dentistry; 2022:90-3.

Amerongen AVN, Bolscher JGM, VeermanECI. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology?. Caries Research. 2004; 38: 247-253.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):6858-62.

Araujo HC, Nakamune ACMS, Garcia WG, Pessan JP, Antoniali C. Carious Lesion Severity Induces Higher Antioxidant System Activity and Consequently Reduces Oxidative Damage in Children's Saliva. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2020, Article ID 3695683, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/3695683>

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, Analytical Biochemistry. 1996; 239: 70–76.

Beuge JÁ, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation, in Methods in Enzymology. 1978; 52: 302–310.

Colak H; Dürgergil CT; Dalli M; Hamidi MM. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. Journal of Natural Science, Biology and Medicine. 2013; 4(1): 29-38.

Guentsch A, Preshaw PM, Klinger SB, Glockmann E. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. Clin Oral Invest. 2008 Dec; 12:345–352.

Hassaneen M, Maron JL. Salivary diagnostics in pediatrics: applicability, translatability, and limitations. *Front Public Health*. 2017 20;5: 83.

ICDAS Foundation. 2017. Disponível em: <https://www.icdas.org/what-is-icdas>.

Ismail AL, Pitts NB, Tellez M. The International Caries Classification And Management System (ICCMSTM) na example of a Caries Management Pathway. *BMC Oral Health*. 2015; 15(1): 1-13.

Ismail AL, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sem A, Hasson H, Pitts NB. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007; 35: 170–178.

Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. The role of the saliva antioxidant barrier to reactive oxygen species with regard to caries development. *Redox Rep*. 2017 Nov;22(6):524-533.

Kumar SV, Kumar HR, Bagewadi N, Nitin Anand Krishnan NA. A study to correlate dental caries experience with total antioxidant levels of saliva among adolescents in Mangalore. 2015; 13(2): 122-125.

Lisboa, ACG. A severidade da cárie na primeira infância aumenta a atividade da SOD sensível ao KCN, reduz as proteínas carboniladas e aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico na saliva. 2022. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1): 265–275.

Malamud D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am*. 2011; 55(1): 159–178.

Martins JR, Díaz-Fabregat B, Ramírez-Carmona W, Monteiro DR, Pessan JP, Antoniali C. Salivary biomarkers of oxidative stress in children with dental caries: Systematic review and meta-analysis. *Archives of Oral Biology*. 2022; 139: 105432.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsk N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 32:268-277.

Oliveira BP, Buzalaf MAR, Silva NC, Ventura TMO, Toniolo J, Rodrigues JA. Saliva proteomic profile of early childhood caries and caries-free children. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2022. DOI: 10.1080/00016357.2022.2118165

Pandey P, Reddy NV, Rao VAP, Saxena A, Chaudhary CP. Estimation of salivary flow rate, pH, buffer capacity, calcium, total protein content and total antioxidant capacity in relation to dental caries severity, age and gender. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2015; 6(Suppl 1): S65-71. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.152943>.

Pitts N, Baez R, Diaz-Guallory C. Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. *Int J Paediatr Dent*. 2019; 29: 384-386.

Prabhakar A, Dodawad R, Os R. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total protein and total antioxidant levels of saliva in caries free and caries active children-an in vivo study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2009; 2(1): 9–12. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1034>.

Senthil Eagappan AR, Arun Prasad Rao V, Sujatha S, Senthil S, Sathiyajeeva J, Rajaraman G. Evaluation of salivary nitric oxide level in children with early childhood caries. *Dental Research Journal (Isfahan)*. 2016; 13(4): 338-41.

Silva VP, Troiano JA, Nakamune ACMS, Pessan JP, Antoniali C. Increased activity of the antioxidants systems modulate the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. *Ach Oral Biol*. 2016; 70:62-65.

Spielman N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *School of Dentistry and Dental Research Institute, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA Oral Diseases*. 2011; 17: 345–35.

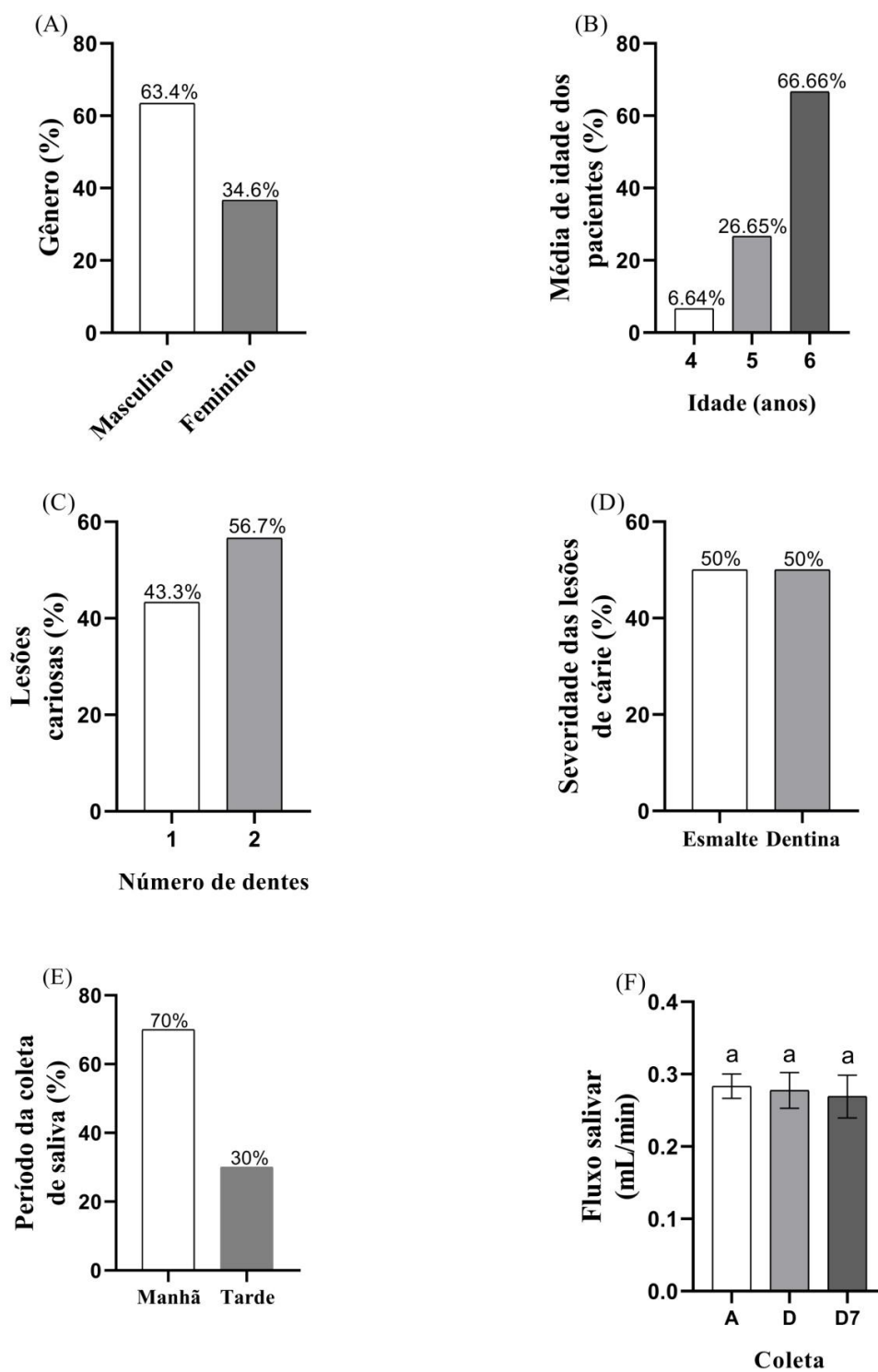
Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2006; 16(3): 186–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2006.00733.x>.

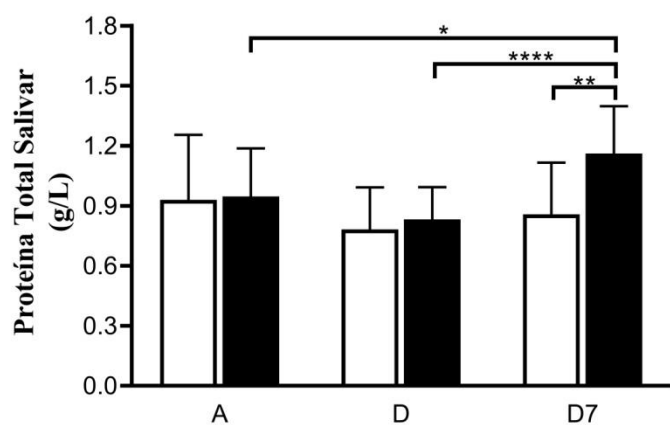
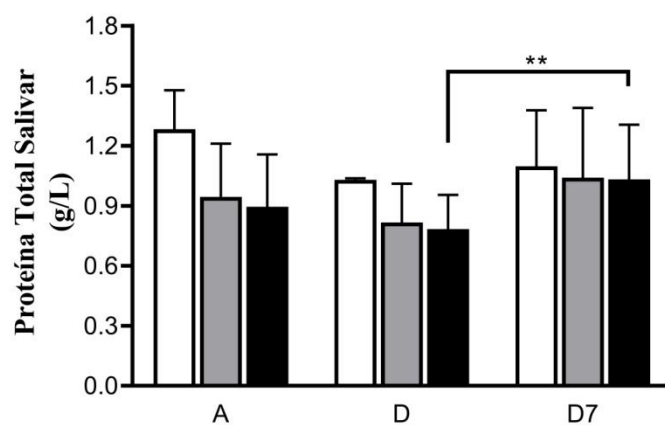
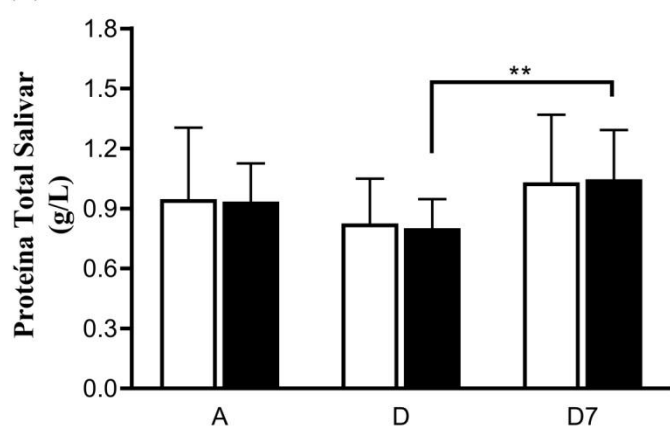
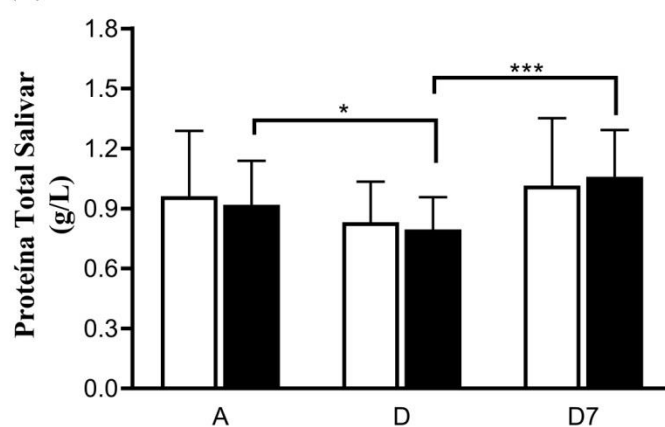
Zandoná AF, Santiago E, Eckert G, Fontana M, Ando M, Zero DT. Use of ICDAS Combined with Quantitative Light-Induced Fluorescence as a Caries Detection Method. *Caries Res* 2010; 44: 317–322.

Zarban A, Ebrahimipour S, Sharifzadeh GR, Rashed-Mohassel A, Barkooi M. Comparison of Salivary Antioxidants in Children with Primary Tooth Abscesses before and after Treatment in Comparison with Healthy Subjects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Dec;18(12):3315-18.

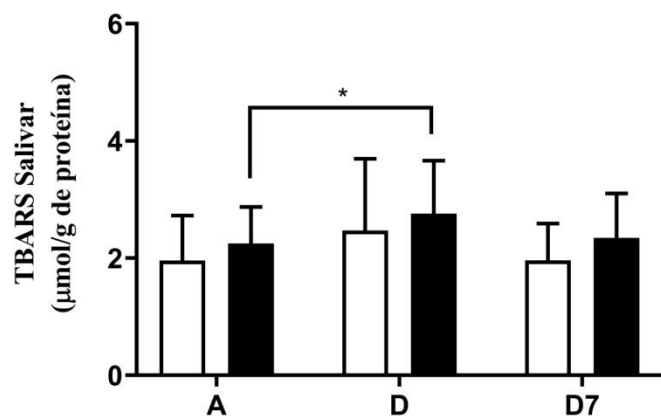
LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características gerais dos pacientes e coleta salivar expressa em porcentagem (%) por: A) Gênero, B) Média da idade dos pacientes, C) Número de dentes cariados, D) Severidade das lesões de cárie, E) Período da coleta salivar, F) Fluxo Salivar (média $\pm$ DP) expresso em ml/min, nos diferentes períodos (A, D, D7); letras minúsculas apresentam similaridade estatística entre os períodos comparados. **Pág. 43**
- Figura 2.** Concentração de Proteína Total (g/L) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Gênero, B) Idade em anos, C) Número de dentes cariados, D) Severidade das lesões de cárie. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$ entre os grupos comparados. **Pág. 44**
- Figura 3.** Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, em $\mu\text{mol/g}$ proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte, D) Lesão em Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ entre os grupos comparados. **Pág. 45**
- Figura 4.** Capacidade Antioxidante Total (TAC, em $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte e Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ entre os grupos comparados. **Pág. 46**
- Figura 5.** Concentração de Ácido Úrico (AU, em mg/g de proteína) na saliva de crianças com cárie, nos diferentes períodos (A, D, D7) por: A) Número de dentes cariados, B) Severidade das lesões de cárie, C) Lesão em Esmalte, D) Lesão em Dentina. As barras representam os valores de média $\pm$ DP. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$ entre os grupos comparados. **Pág. 47**

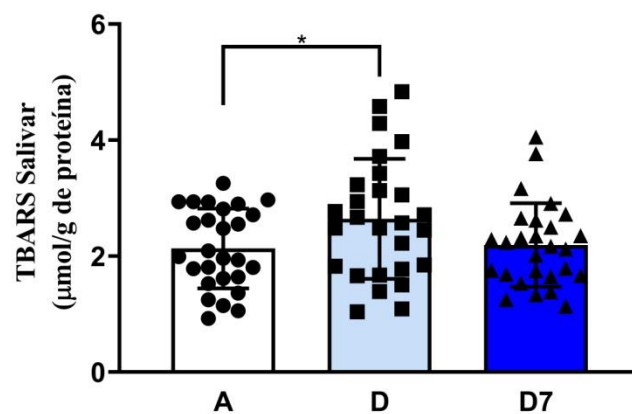


(A) Gênero  Feminino  Masculino(B) Idade (anos)  4  5  6(C) Número de dentes cariados  1  2(D) Severidade das lesões de cárie  E  D

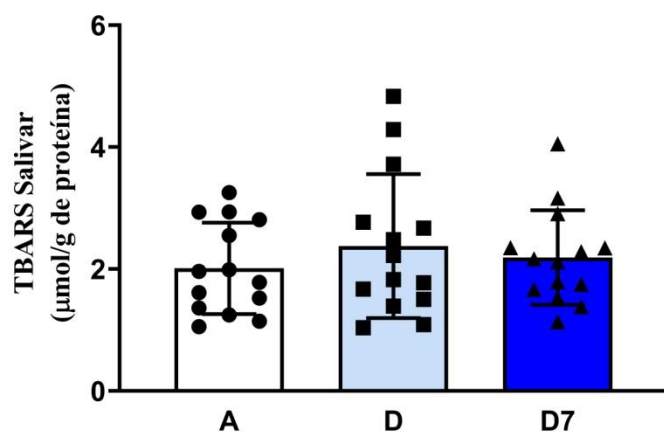
(A) Número de dentes cariados □ 1 ■ 2



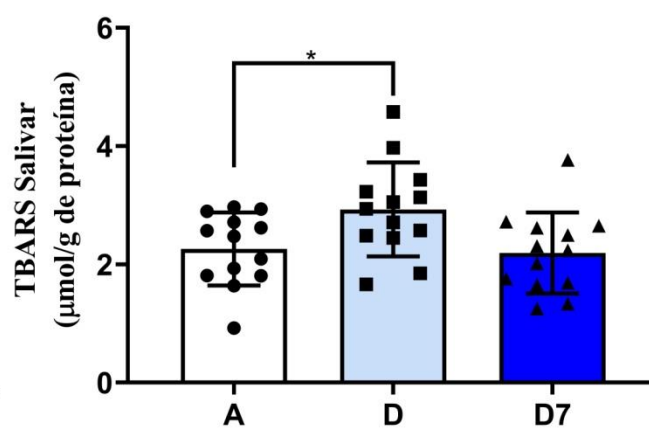
(B) Severidade das lesões de cárie



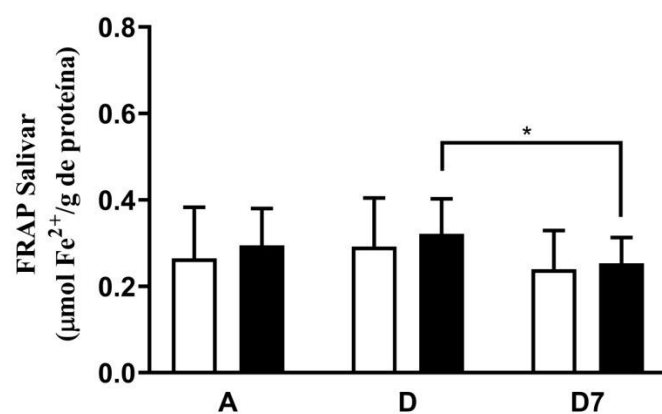
(C) Lesão em esmalte



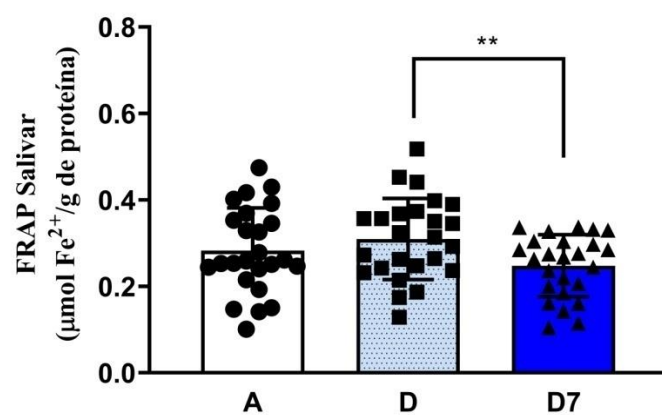
(D) Lesão em dentina



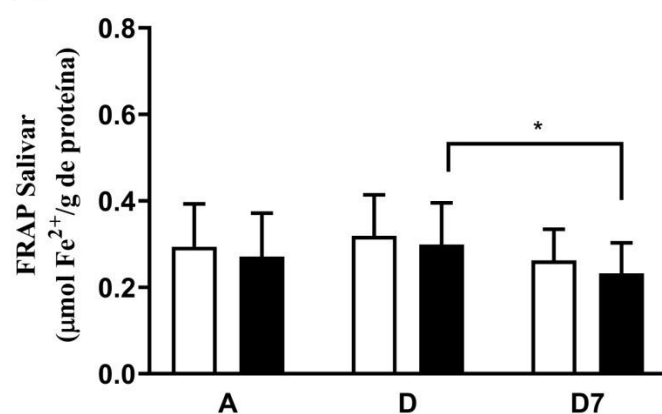
(A) Número de dentes cariados □ 1 ■ 2



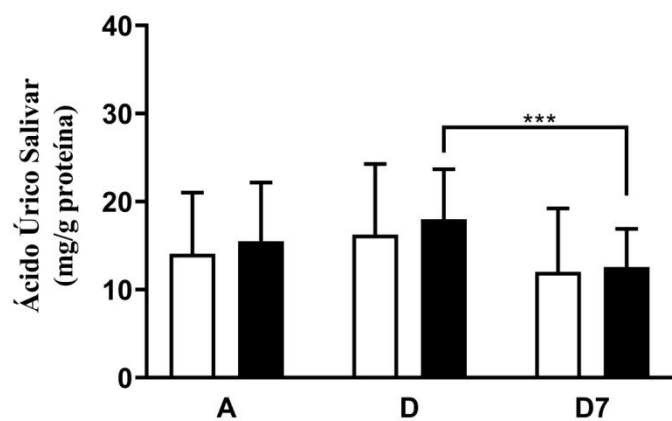
(B) Severidade das lesões de cárie



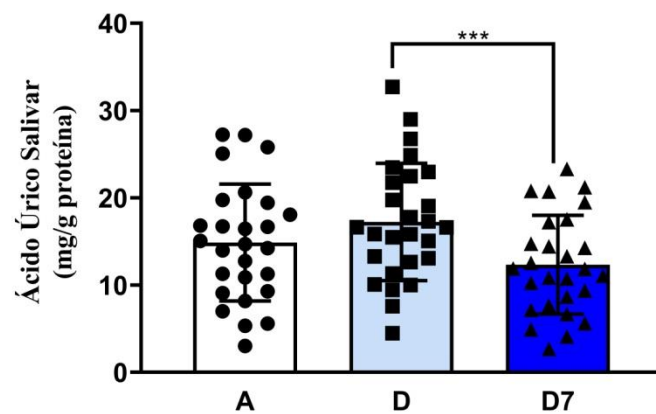
(C) Lesão em esmalte e dentina □ E ■ D



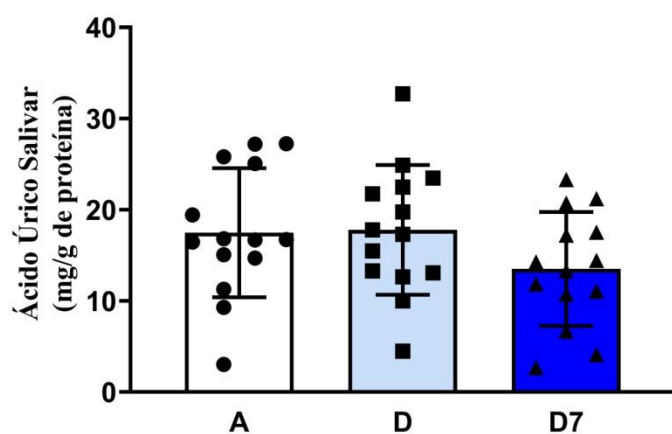
(A) Número de dentes cariados □ 1 ■ 2



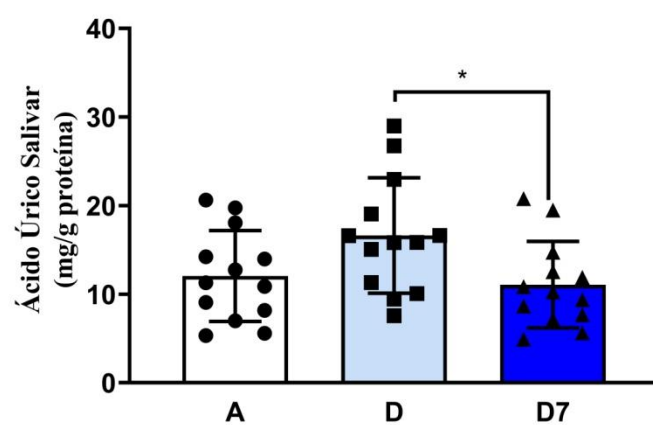
(B) Severidade das lesões de cárie



(C) Lesão em esmalte



(D) Lesão em Dentina



HIGHLIGHTS/DESTAQUES

1. A concentração de proteína salivar está aumentada após o tratamento clínico da cárie.
2. Os valores de MDA aumentam após o tratamento da cárie.
3. Os valores de TAC e AU salivar reduzem após o tratamento da cárie.
4. O quadro clínico de maior severidade determina as alterações encontradas.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse que impeçam a publicação deste estudo.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Adrielle Ouchi Lopes: Conceituação, Metodologia, Obtenção e Análise dos resultados, Redação, Rascunho Original; **Rayara Nogueira de Freitas, Gabriela Alice Fiais:** Metodologia, Obtenção e Análise dos Resultados; **Heitor Ceolin Araujo, Mariana Santana Quirino da Silva, Alessandra Marcondes Aranega, Juliano Pelim Pessan:** Redação, Rascunho Original; **Antonio Hernandes Chaves Neto, Cristina Antoniali:** Conceituação, Supervisão, Análise dos Resultados, Redação, Aquisição de Recursos Financeiros.

ANEXO I

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O TRATAMENTO CLÍNICO DAS LESÕES DE CÁRIE REVERTE AS ALTERAÇÕES DE BIOMARCADORES SALIVARES DE ESTRESSE OXIDATIVO?

Pesquisador: Cristina Antoniali Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52083921.2.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.180.908

Apresentação do Projeto:

Será realizado um estudo intervencionista e longitudinal em crianças com lesões de cárie. Crianças na faixa etária de 4-6 anos serão selecionadas entre os pacientes da Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP. Nestas crianças será feita a avaliação clínica, duplo-cego para diagnóstico das lesões de cárie por cirurgiã-dentista calibrada e experiente na área (AOL), conforme os grupos descritos na tabela abaixo e o tratamento clínico da cárie. O tamanho da amostra será de 30 crianças por grupo. Após o diagnóstico clínico, as amostras de saliva serão coletas e processadas. As crianças serão submetidas ao tratamento clínico. Finalizado o tratamento e após uma nova avaliação clínica para confirmação da eficácia do tratamento, novas amostras de saliva serão coletas e processadas. Os procedimentos restauradores atraumáticos seguirão os protocolos de remoção parcial ou total das lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se o tratamento restaurador atraumático (ART) com ionômero de vidro é capaz de reverter às alterações do dano oxidativo, da atividade de sistemas antioxidantes (enzimático e não enzimático) e a biodisponibilidade do óxido nítrico em saliva de crianças com cárie em diferentes estágios.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"**



Continuação do Parecer: 5.180.908

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Esta pesquisa, oferece riscos mínimos. Os riscos são os mesmos de uma consulta odontológica de rotina e de um procedimento restaurador.

Benefícios: Além dos benefícios para a ciência, a criança também terá a remoção do tecido cariado e posterior restauração e acompanhamento

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto científico dentro das normas da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 20/06/2022. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1829805.pdf	23/11/2021 11:35:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.doc	23/11/2021 11:35:29	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_Adri2311.pdf	23/11/2021	Heitor Ceolin	Aceito

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 5.180.908

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adri2311.pdf	11:34:46	Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_assentimento_adrielle.pdf	21/10/2021 13:18:18	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/09/2021 17:56:57	Heitor Ceolin Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 20 de Dezembro de 2021

Assinado por:

Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br