



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Métodos de colheita salivar não estimulada em crianças:
estudo piloto**

Fernando Miguel Marques dos Santos

Orientadora: Prof. Doutora Ana Luísa Costa
Coorientadora: Mestre Joana Leonor Pereira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Coimbra, 2016

Métodos de colheita salivar não estimulada em crianças: estudo piloto

Santos, F*, Pereira, JL**, Costa, AL***

** Aluno do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

*** Assistente convidada do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

**** Professora Auxiliar do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

Endereço:

Área da Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Telefone: +351 239484183 Fax: +351 239402910

Endereço de e-mail: f.miguelsantos@yahoo.com

Índice

1. RESUMO	3
2. INTRODUÇÃO	7
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	17
7. CONCLUSÃO	21
8. AGRADECIMENTOS	22
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
10. ANEXOS	25
11. LISTA DE ABREVIATURAS	34
12. ÍNDICE DE TABELAS E IMAGENS	35

1. Resumo

Introdução: A saliva é constituída por biomoléculas de fontes sistémicas distintas, ponderando-se que a sua composição, sobretudo no que se refere à saliva não estimulada (SNE), possa refletir a homeostase corporal. Tem-se revelado uma fonte de informação clínica no âmbito de doenças sistémicas e orais, sendo a sua colheita simples, segura e não invasiva comparativamente a outros biofluidos. Apesar da reconhecida utilidade diagnóstica em crianças, por vezes a sua colheita constitui um procedimento desafiante.

Objetivos: O presente estudo piloto objetivou ilustrar diferentes métodos de colheita de SNE em crianças, sublinhando as potenciais vantagens e desvantagens da sua aplicação clínica e analisando comparativamente o volume e pH salivares obtidos pelos métodos empregues. Paralelamente, conduziu-se uma revisão da literatura acerca da temática.

Materiais e métodos: Colheram-se 19 amostras de SNE em crianças de 4 anos através dos métodos: salivacção passiva (SP), colheita com tubo coletor Saliva Collection Aid® (SCA) (Salimetrics, State College, PA, USA), com dispositivos absorventes Salivette® (SV) (Sarstedt, Newton, NC) e SalivaBio's Children's Swab® (SCS) (Salimetrics, State College, PA, USA), cumprindo os requisitos técnicos e éticos. Procedeu-se à medição do volume de cada amostra e a determinação do pH foi realizada com o kit Saliva-Check Buffer (GC America, Inc., Alsip, IL). Efetuou-se uma pesquisa na PubMed/MEDLINE e EBSCOhost, limitada aos últimos 10 anos, combinando os termos "*saliva*", "*collection methods*", "*children*", "*oral fluid*", "*stimulated*" e "*oral health*".

Resultados: A SP permitiu a colheita de um volume superior de saliva, embora nem todos os participantes tenham colaborado. O SCS permitiu colher amostras de volume superior às obtidas com o SV, sendo que, na generalidade, os dispositivos absorventes proporcionaram algumas vantagens relativamente à colaboração das crianças. Os valores de pH determinados foram idênticos, com ligeira tendência mais acídica para as amostras colhidas com o SV. Na revisão bibliográfica obtiveram-se 31 referências, selecionando-se 19, às quais se adicionaram 8 referências cruzadas.

Conclusões: Apesar de múltiplas linhas de investigação atuais explorarem as potencialidades da SNE na monitorização de patologias, são escassos os estudos comparativos de métodos de colheita, sendo desejáveis estudos que, de forma inequívoca, permitam uma opção metodológica válida, fiável e reproduzível. Dos dispositivos disponíveis, embora os "absorventes" pareçam proporcionar algumas vantagens, permanece ainda por

aferir a sua adequação às tecnologias analíticas emergentes.

Palavras-chave: "saliva", "métodos de colheita", "crianças", "saliva não estimulada"

Abstract

Introduction: Saliva is composed by a variety of biomolecules from distinct systemic sources and, thus, its composition, particularly in terms of non-stimulated saliva (NSS), has been described as the mirror of the body homeostasis. Saliva has proven to be a relevant source of clinical data regarding systemic and oral diseases, due to its simple, safe and non-invasive collection compared to other biofluids. Despite its recognized diagnostic potentialities in children, saliva collection can often be a challenging procedure.

Objectives: This pilot study aimed to illustrate different NSS collection methods in children, highlighting the potential advantages and disadvantages of its clinical application. Salivary parameters, namely pH and samples volume, were also determined. Additionally, the present study aimed to provide a narrative literature review on the subject.

Methods: 19 samples of NSS were collected from 4 year old children through the following methods: passive drooling (PD), Saliva Collection Aid[®] (SCA) collector vial (Salimetrics, State College, PA, USA), absorbing devices Salivette[®] (SV) (Sarstedt, Newton, NC) and SalivaBio's Children's Swab[®] (SCS) (Salimetrics, State College, PA, USA). Preconized ethical and methodological features were strictly followed. The volume of each salivary sample was determined and pH evaluation was performed using the Saliva-Check Buffer kit (GC America, Inc., Alsip, IL). The literature search was done in PubMed/MEDLINE and EBSCOhost, limited to studies published in the last 10 years using combinations of the terms "saliva", "collection methods", "children", "oral fluid", "stimulated" and "oral health".

Results: PD allowed the collection of the highest saliva volume, though not all participants were able to cooperate through this method. A greater volume of saliva was collected using SCS comparatively to SV and, in general, the absorbing devices provided advantages in children's collaboration. The pH values of the majority of the samples were similar, with a slightly more acidic tendency for the samples collected using SV. The literature review yielded 31 references, of which 19 were selected and 8 publications were added through a cross-reference process.

Conclusions: Although current research lines have explored salivary potentialities concerning diseases monitoring, there are scarce NSS collection methods comparative studies. Therefore, the importance of developing additional studies which unequivocally establish proper, reliable and reproducible methodological options has been recognized. Absorbing saliva devices apparently provide benefits concerning children collaboration,

although it is currently unknown whether they are suitable for saliva collection for emerging analytical technologies.

Keywords: "saliva", "collection methods", "children", "non-stimulated saliva"

2. Introdução

A saliva constitui uma secreção seromucosa exócrina resultante de uma mistura complexa de fluídos de origem diversa. A saliva total encontrada na cavidade oral é composta pelo produto de secreção das glândulas salivares *major* e *minor*, bem como por secreções mucosas da cavidade nasal e da orofaringe, fluído crevicular, resíduos alimentares, bactérias, fungos, vírus, células epiteliais e derivados do plasma sanguíneo ⁽¹⁻⁵⁾.

As glândulas salivares *major*, assim designadas dada a sua dimensão, incluem as parótidas, as submandibulares e as sublinguais, contribuindo para 90% do volume salivar secretado ^(2-4, 6, 7). Por sua vez, as glândulas salivares *minor* são responsáveis pela secreção dos restantes 10% e encontram-se distribuídas sobretudo pelo lábio inferior, mucosa jugal, língua, palato e região faríngea. Ainda que não desempenhem um papel particularmente relevante no que diz respeito ao seu contributo para o volume salivar total, estas glândulas são determinantes nas funções de lubrificação e de proteção dos tecidos orais ^(2, 4).

A saliva é, reconhecidamente, um biofluído valioso na manutenção da integridade da cavidade oral, possuindo um carácter multifuncional decorrente das suas características fluídas e dos componentes específicos que a compõem. Genericamente, de entre essas funções podem destacar-se a lubrificação e proteção dos tecidos orais moles e duros, capacidade tampão, modulação do pH oral e ação depurativa, participação nos processos de desmineralização-rem mineralização na superfície dentária, atividade antibacteriana e ainda digestão e paladar ^(2, 7, 8).

A composição da saliva engloba, aproximadamente, 99% de água e apenas 1% de componentes inorgânicos e orgânicos (proteicos e não proteicos) ^(2, 4, 7, 9). Os componentes salivares orgânicos dizem respeito a α -amilase, ureia, amónia, glicoproteínas e proteínas antibacterianas, como mucinas, enzimas e imunoglobulinas. Os componentes salivares inorgânicos incluem eletrólitos como o sódio, o potássio, o cálcio, o bicarbonato e o fosfato ^(5, 10).

A secreção salivar pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista, de acordo com a origem glandular da mesma. Enquanto que a componente serosa tem, na sua maioria, origem nas glândulas parótidas, a saliva mucosa é advinda das glândulas *minor* e a mista, ou seromucosa, das submandibulares e sublinguais ⁽⁵⁾. Uma vez que as glândulas salivares são inervadas por fibras do sistema nervoso autónomo, parassimpáticas e simpáticas, o tipo de estímulo afeta a natureza da saliva total secretada. A saliva não estimulada (SNE), que é formada quando há predomínio de estímulos simpáticos, apresenta

um contributo glandular que varia entre 65%, 23%, 8% e 4%, respetivamente, para as glândulas submandibulares, parótidas, Von Ebner e sublinguais. Constitui, por isso, uma saliva mais viscosa, com elevado teor proteico, particularmente de mucinas^(4, 5, 11). Quando verificado predomínio de estimulação parassimpática ocorre estimulação salivar mais serosa, verificando-se um contributo predominante das glândulas parótidas prevendo-se a secreção de saliva com maior conteúdo aquoso^(2, 3, 5, 9).

É amplamente reconhecido que a saliva contém uma gama de biomoléculas provenientes de fontes sistémicas, pelo que a sua composição parece refletir a homeostase corporal^(4, 7, 8). Deste modo, tem-se revelado uma fonte não invasiva de informação clínica para monitorização do início e progressão de doenças sistémicas e orais, sendo a sua colheita simples e segura comparativamente a outros biofluidos^(5, 12). Em crianças começa a constituir uma alternativa diagnóstica e de avaliação da suscetibilidade no contexto de disfunções glandulares, marcadores de doenças virais, sarcoidose, tuberculose, patologia gástrica, hepática, S. de Sjögren, doença de Behçet, fibromialgia, diabetes *mellitus*, patologias oncológicas, HIV, autismo, prematuridade ou mesmo a sua aplicação na área regenerativa associada a fatores de crescimento^(4, 6, 9, 13-15).

O fluxo e a composição salivar são sensíveis a flutuações intra e interindividuais por influência de diversos fatores, como o ritmo circadiano, a postura, o estado emocional, a dieta e grau de hidratação corporal, o tempo de colheita e a natureza e duração do estímulo⁽⁵⁾. O estabelecimento de uma rigorosa padronização na colheita salivar assume, deste modo, extrema relevância, uma vez que o emprego de metodologias não padronizadas se tem traduzido, até à data, numa elevada dificuldade na comparação dos dados publicados para parâmetros salivares, em diversos contextos^(5, 7, 10, 12).

Atualmente encontram-se disponíveis múltiplos dispositivos e técnicas para a colheita salivar, sendo que a colheita estimulada de saliva total constitui o método mais simples e mais largamente empregue em estudos clínicos, não necessitando de treino ou apetências especiais por parte do operador^(16, 17). A saliva estimulada (SE) pode ser obtida por movimentos mastigatórios ou através de estimulação adicional complementar, como utilização de ácido cítrico, ácido málico, xilitol ou parafina^(4, 6-8, 11, 13, 18-20).

Não obstante, a SNE parece ser a mais fiável e representativa do meio oral, na medida em que, como acima referido, a estimulação altera as diferentes contribuições de cada glândula para o fluxo total, com consequentes oscilações em termos de composição^(7, 12, 16). A SNE assume, assim, particular utilidade diagnóstica; no entanto, ainda que tecnicamente simples, a colheita pode revelar-se inesperadamente complicada e morosa,

sobretudo em crianças, impossibilitando em alguns casos a obtenção dos volumes mínimos para análise ^(5, 12).

No que se refere à SNE, a salivação passiva (SP), que envolve o ato de salivar ou “babar” sem quaisquer movimentos orais, constitui o método de eleição e mais frequentemente reportado ⁽¹⁶⁾. É também relatado o uso de um coletor através do qual a criança pode cuspir diretamente para o recipiente, objetivando melhorar a colaboração no procedimento. Estão ainda comercialmente disponíveis sistemas de dispositivos absorventes, como o Salivette[®] (SV) (Sarstedt, Newton, NC), SalivaBio's Children's Swab[®] (SCS) (Salimetrics, State College, PA, USA), Whatman[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Visispear[®] (OphtalmologyWeb, South San Francisco, CA, USA), ou mesmo cordas de algodão esterilizadas (e.g., Richmond, Charlotte, NC) que pressupõem a sua colocação no fundo do vestíbulo e no pavimento bucal da criança, colhendo a saliva acumulada até que seja atingida a sua saturação ^(12, 17). Embora os dispositivos absorventes proporcionem vantagens óbvias a nível da colaboração das crianças, o emprego destes encontra-se escassamente descrito na literatura e a sua validação não foi, todavia, estabelecida para a generalidade das técnicas analíticas utilizadas, desconhecendo-se se exercem algum tipo de interferência na deteção de analitos.

Apesar da investigação crescente no âmbito das potencialidades salivares no diagnóstico e monitorização de diversas patologias, são escassos os estudos comparativos de métodos de colheita salivar não estimulada em populações pediátricas.

3. Objetivos

Atendendo à reconhecida utilidade diagnóstica da saliva, às dificuldades associadas ao processo de colheita e à escassez de publicações disponíveis, comparando métodos de colheita em crianças, o curso deste trabalho envolveu três objetivos distintos, embora complementares entre si, nomeadamente:

- 1) Conduzir uma revisão da literatura disponível relativamente aos diferentes métodos de colheita salivar em crianças, tendo por base uma pesquisa feita através das bases de dados PubMed/MEDLINE e EBSCOhost;
- 2) Ilustrar clinicamente diferentes métodos de colheita de SNE em crianças, sublinhando as potenciais vantagens e desvantagens da sua aplicação;
- 3) Analisar comparativamente as variações de volume e pH obtidos pelos diferentes métodos empregues numa amostra piloto.

4. Materiais e métodos

Revisão narrativa estruturada

A pesquisa bibliográfica foi efetuada com recurso às bases de dados PubMed/MEDLINE e EBSCOhost utilizando combinações das palavras-chave "saliva", "collection", "methods" e "children" através dos operadores booleanos "AND" e "OR". Estabeleceram-se ainda, como critérios de inclusão, publicações dos últimos 10 anos, em língua inglesa e com resumo disponível. A pesquisa foi inicialmente realizada em Dezembro de 2015, tendo sido atualizada em Março de 2016.

Colheita de SNE e exame clínico oral

Após salvaguardo dos requisitos éticos exigidos (anexos 1 e 2), procedeu-se à colheita salivar não estimulada numa amostra piloto, aleatória, de 8 crianças de 4 anos, sem patologias sistémicas relevantes, frequentadoras de um estabelecimento de ensino pré-escolar do distrito de Coimbra.

Contemplaram-se os métodos mais consistentemente descritos na literatura: Salivação passiva (SP), colheita com tubo coletor Saliva Collection Aid[®] (SCA) (Salimetrics, State College, PA, USA), com dispositivo absorvente de algodão Salivette[®] (SV) (Sarstedt, Newton, NC) e polimérico SalivaBio's Children's Swab[®] (SCS) (Salimetrics, State College, PA, USA).

As colheitas decorreram no período da manhã, salvaguardando a inexistência de ingestão alimentar e da realização de escovagem dentária nos 90-120 minutos prévios à avaliação. Foi sumariamente explicado e aplicado cada um dos métodos de colheita a cada criança, de acordo com as normas dos respetivos fabricantes, com intervalos de 15 minutos entre colheitas.

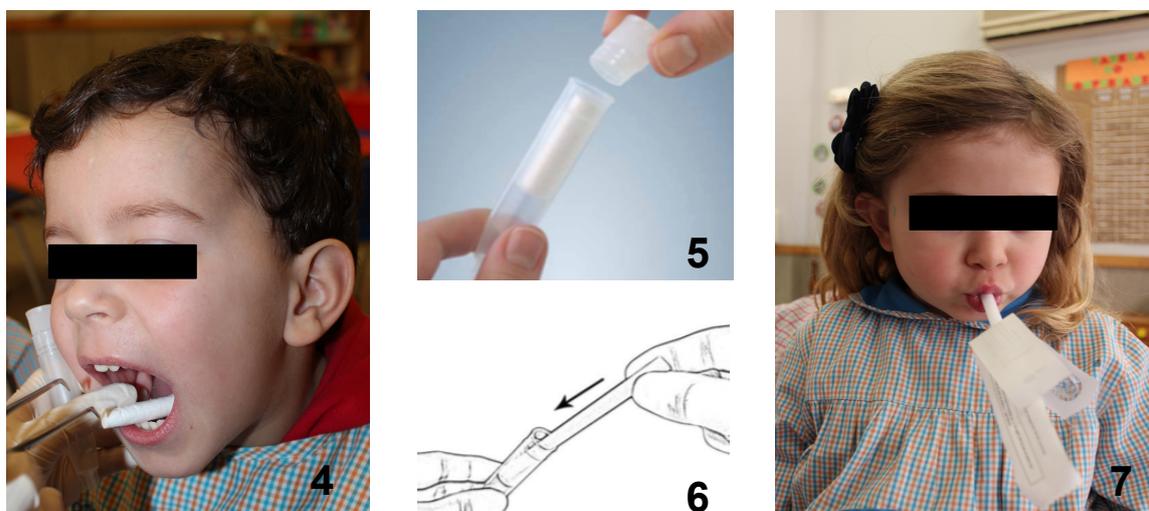
As amostras colhidas por SP (Fig. 1) foram obtidas conforme descrito por Navazesh & Kumar: cada criança, após deglutir toda a saliva presente na cavidade oral, foi instruída para não engolir, mantendo os olhos abertos e, idealmente, mantendo-se quieta, apenas cuspidando para um recipiente sempre que o volume acumulado assim o justificasse, durante 5 minutos⁽⁴⁾. Nas colheitas com tubo coletor SCA (Figs. 2 e 3), as crianças foram instruídas a proceder de modo idêntico ao descrito para a salivação passiva, com a exceção do recurso ao tubo coletor para depositar a saliva acumulada na cavidade oral para o recipiente.



Figs. 1 e 2: Colheita de SNE através dos métodos SP e SCA (Salimetrics, State College, PA, USA). Fig. 3: Aspetto do tubo coletor SCA (Salimetrics, State College, PA, USA).

Em ambos os tipos de colheitas foi rejeitada a porção inicial, de grande variação em termos de composição, armazenando-se a restante saliva em recipientes adequados do tipo *ependorf* (Eppendorf, Hamburg, Germany), preservados à temperatura de 0°C até à prossecução do processo analítico.

No que se refere aos dispositivos absorventes de algodão SV (Figs. 4 e 5) e de polímero SCS (Figs. 6 e 7), a colheita envolveu a colocação de uma das extremidades do dispositivo no fundo do vestíbulo e no pavimento oral da criança, colhendo a saliva acumulada até ao material absorvente se encontrar saturado, durante um período máximo de 5 minutos. Foi solicitado às crianças que evitassem realizar quaisquer movimentos orais, de modo evitar a estimulação salivar.



Figs. 4 e 5: Colheita salivar através do dispositivo absorvente SV (Sarstedt, Newton, NC) e aspeto do mesmo. Figs. 6 e 7: Colheita recorrendo ao dispositivo absorvente SCS (Salimetrics, State College, PA, USA).

As amostras colhidas com os dispositivos SV e SCS foram armazenadas a 0°C até à realização da centrifugação, durante 2 minutos a 1000 x g e durante 15 minutos a 1500 x g, respetivamente. O volume salivar obtido foi, então, transferido para *eppendorfs* (Eppendorf, Hamburg, Germany) devidamente identificados.

Ainda que sem estar enquadrada em termos de objetivos deste estudo, foi adicionalmente cumprida a observação intraoral de todas as crianças, com recurso a espelhos intraorais descartáveis, sob luz artificial, visando a deteção de patologia oral relevante. Todos os procedimentos foram realizados por um observador único e calibrado, tendo sido adotadas as medidas de controlo de contaminação e infeção cruzada preconizadas (utilização de material esterilizado, luvas e máscaras). O exame das estruturas orais (tecidos moles e duros) foi conduzido de acordo com as premissas definidas pela OMS e o diagnóstico de cárie dentária foi efetuado de acordo com os procedimentos e critérios do *International Caries Detection and Assessment System II* (ICDAS-II).

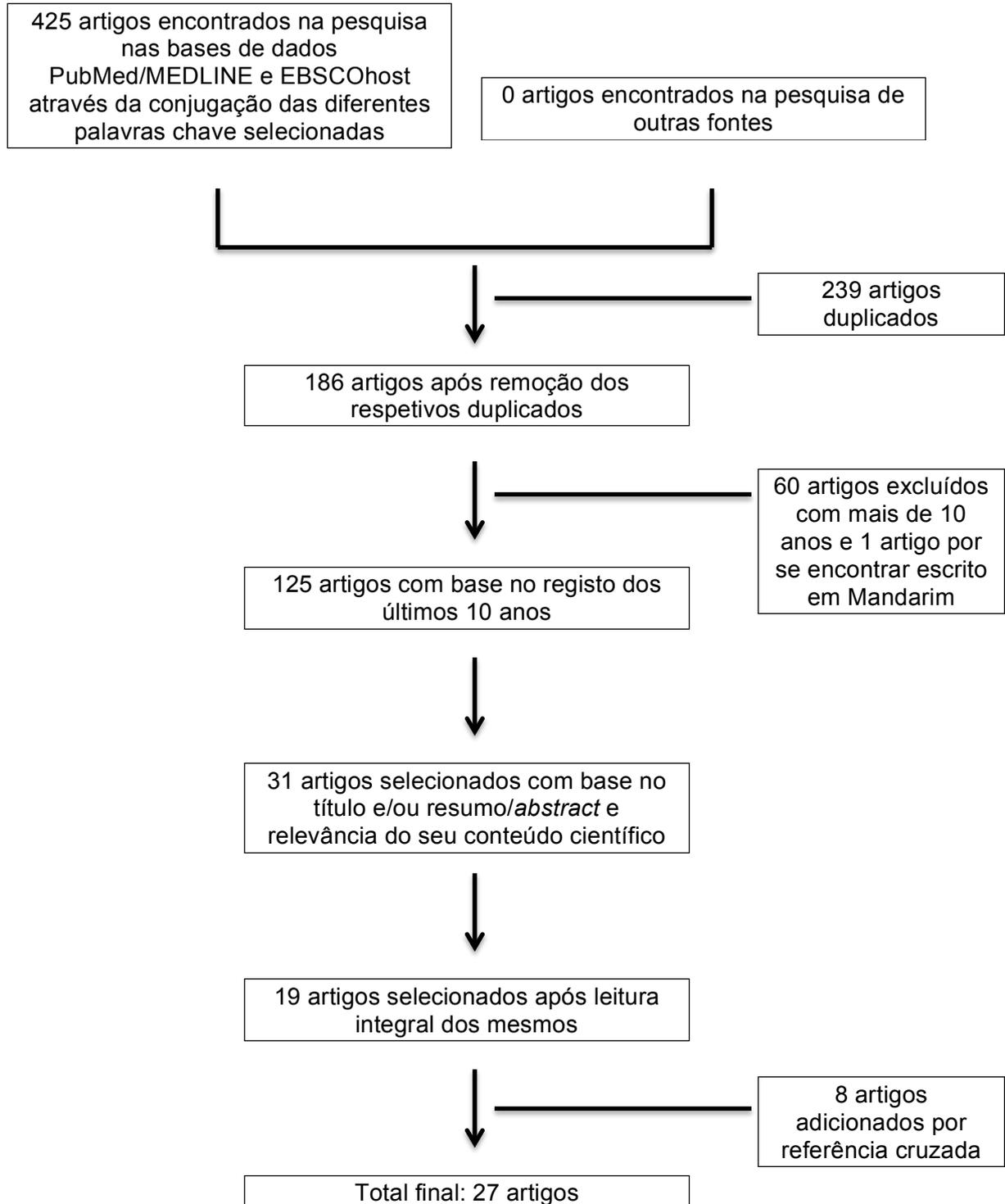
Avaliação paramétrica salivar

Procedeu-se à determinação do volume e pH de todas as amostras com recurso a uma pipeta milimetrada e ao *kit* de diagnóstico Saliva-Check Buffer (GC America, Inc., Alsip, IL). A medição do pH envolveu a colocação de uma tira de teste de pH num recipiente com saliva por 10 segundos, tendo a sua cor sido avaliada de acordo com o modelo fornecido pelo fabricante (anexo 3). A saliva foi classificada como altamente ácida (pH 5,0 - 5,8), moderadamente ácida (pH 6,0 - 6,6) e normal (pH 6,8 - 7,8).

5. Resultados

Revisão narrativa estruturada

Palavras chave: "saliva"; "collection methods"; "children"; "oral fluid"; "stimulated"; "oral health"



Colheita de SNE e avaliação dos parâmetros salivares

Foi obtido um total de 19 amostras de SNE, uma vez que nem todas as crianças conseguiram colaborar em todos os métodos de colheita. A Tabela I representa a distribuição das amostras obtidas através dos diferentes métodos.

Tabela I – Distribuição das amostras obtidas.

	MÉTODO DE COLHEITA			
	SP	SCA	SV	SCS
n	6	0	5	8

A tabela II apresenta os valores médios, desvio padrão, valores máximo e valor mínimo para o volume (mL) de SNE obtido através dos métodos referidos anteriormente.

Tabela II – Volume (mL) de SNE obtido com cada método.

MÉTODO DE COLHEITA	\bar{X} (mL)	σ	Valor mínimo (mL)	Valor máximo (mL)
SP	1,90	1,3	0	3,20
SCA	0	0	0	0
SV	0,62	0,51	0,1	1,20
SCS	1,28	0,70	0,70	2,75

A tabela III representa os valores de pH salivar das amostras colhidas, determinados através do *kit* diagnóstico Saliva-Check Buffer (GC America, Inc., Alsip, IL)

Tabela III – Registo do pH salivar das amostras colhidas.

		Participante							
pH	MÉTODO DE COLHEITA	1	2	3	4	5	6	7	8
	SP	7,2		7,6		7,8	7,2	7,8	6,8
	SV	6,6	7	7,4	6,7	6,8			
	SCS	7,6	7,6	7,4	7,8	7	7	7,8	7,6

6. Discussão

A saliva tem vindo a ser crescentemente explorada na literatura, revelando um grande potencial enquanto fluido diagnóstico e na identificação e caracterização de biomarcadores eminentemente devido ao carácter seguro, simples e não invasivo da sua colheita, mas também às suas características ^(5, 10, 12). No entanto, a efetividade da sua utilização parece depender da standardização da fase pré-analítica, ou seja, da forma como é realizada a colheita e cumpridos os respetivos métodos de processamento ^(6, 7).

A medição do fluxo salivar pode ser obtida através de 2 métodos distintos: saliva total não estimulada e saliva total com recurso a estimulantes salivares. Neste estudo piloto optou-se por testar alguns métodos de colheita de SNE visto ser representativa do fluxo salivar basal, maioritariamente presente na cavidade oral, tendo vindo a ser referenciada como a mais representativa em termos sistémicos individuais, ainda que não se assuma inquestionavelmente, até hoje, como uma alternativa analítica plasmática ^(5, 7, 10, 12, 16, 21).

A definição isolada de um intervalo considerado “normal” para a taxa (fluxo) de secreção salivar pode ser determinante na avaliação de uma hipofunção glandular. Algumas das condições que podem levar a algum tipo de alteração são o uso de medicação, patologias sistémicas e radioterapia ⁽²²⁾. Ainda assim, principalmente em crianças, em termos inter e intraindividuais sabe-se que o fluxo salivar tem uma grande variabilidade mesmo na ausência de patologia associada, dificultando assim o rigoroso estabelecimento de valores padrão ^(15, 23, 24). Genericamente, a produção salivar diária considerada “normal” num indivíduo adulto saudável situa-se entre 0,7 a 3,0mL/min, ao passo que numa criança essa variação encontra-se entre os 0,1 e 6,0-7,0mL/min ⁽²⁴⁾. Esta maior amplitude do fluxo salivar na criança parece estar relacionada com a fase de crescimento, com os rapazes a apresentar, normalmente, valores mais elevados comparativamente às raparigas, apontando-se como fatores determinantes a massa corporal e o tamanho das glândulas salivares ⁽²³⁾. Podem ainda contribuir para estas diferenças o estado nutricional, diferenças hormonais, fase da dentição, variações geográficas e até climáticas ^(14, 17, 23).

Relativamente às colheitas realizadas, de um modo geral, a SP constituiu o método que permitiu a colheita de um volume superior de saliva, obtendo uma média de 1,90mL ($\sigma=1,3$), embora nem todos os participantes tenham conseguido colaborar (valor mínimo=0mL; valor máximo=3,20mL). O procedimento foi detalhadamente explicado aos participantes seguindo as recomendações de colheita relatada por Navazesh e Kumar ⁽⁴⁾. É descrito que a imaturidade, traduzida em dificuldades em perceber o objetivo ou em seguir as instruções, possa explicar uma recusa ou ineficácia de colaboração da criança ⁽¹⁷⁾.

Reconhece-se ainda que a grande variabilidade de fluxo salivar em crianças possa conduzir a que, no caso de alguns participantes, o volume salivar armazenado na cavidade oral durante o período de tempo da colheita tenha sido mínimo, levando a dificuldades em depositar a SNE para o recipiente. Em 2012, Putnam e colaboradores conduziram um estudo clínico que envolveu a aplicação de uma escala de aceitação de métodos de colheita salivar, a *Saliva Collection Rating Scale* (SCRS), numa amostra de crianças (6-12 anos) com desvio do espectro autista ⁽²⁵⁾. A escala SCRS englobou a avaliação da facilidade e do conforto associados a cada método, tendo a SP obtido o espectro de respostas mais díspar, tendo sido classificada simultaneamente como o método mais fácil e o mais difícil ⁽²⁵⁾.

No entanto, apesar de a colheita através da SP em crianças se revelar, com frequência, inesperadamente desafiante, a literatura destaca diversas vantagens inerentes à sua utilização. Vários autores reportaram que o conteúdo proteico salivar coletado através da SP parece ser maior do que através de qualquer outro método ^(3, 18). A SP tem ainda a vantagem clara de não apresentar nenhuma interferência na composição salivar, o que pode acontecer com outro tipo de métodos ⁽¹²⁾.

Por sua vez, a utilização do SCA, dispositivo coletor auxiliar na SP, não se verificou uma opção válida visto que nenhum dos participantes conseguiu colaborar através deste método. Estes resultados encontram-se em consonância com os obtidos num estudo conduzido por O'Farrelly *et al.*, no qual se recorreu a tubos coletores similares aos utilizados no presente estudo ⁽¹⁷⁾.

Relativamente aos dispositivos absorventes utilizados, o SCS permitiu colher amostras salivares de volume superior ($\bar{x}=1,28\text{mL}$; $\sigma=0,70$) às obtidas com o SV ($\bar{x}=0,62\text{mL}$; $\sigma=0,51$) e revelou-se uma técnica de fácil execução controlada pelo operador. Estes resultados podem porventura ser atribuídos ao facto de o SCS ser um dispositivo desenhado especificamente para a colheita salivar em crianças, facilitando eventualmente a adesão à colheita. Os dados disponíveis na literatura acerca do SCS destacam vantagens ao nível da segurança da sua aplicação, uma vez que se trata de um dispositivo longo, passível de ser mais facilmente controlado pelo operador, envolvendo um menor risco de engasgamento ⁽¹⁷⁾.

No que diz respeito aos resultados obtidos com o SV, alguns autores referem que quando o volume salivar a colher é limitado relativamente à capacidade do material absorvente, a recuperação do volume salivar absorvido, por compressão ou centrifugação, pode ser difícil ⁽²⁶⁾. É descrito ainda que o SV é caracterizado como pouco palatável, o que pode também ter limitado a colaboração das crianças no presente estudo ⁽²⁵⁾.

Apesar de se ter verificado que com o SCS foram recolhidos volumes inferiores de saliva comparativamente à SP ($1,28\text{mL}\pm 0,70$ e $1,90\text{mL}\pm 1,3$, respetivamente), este método absorvente foi o único método que possibilitou a colheita em todos os participantes.

Deste modo, dos dispositivos disponíveis, os “absorventes” parecem proporcionar vantagens relativas à colaboração em populações pediátricas, permanecendo contudo por aferir a sua adequação a diversas tecnologias analíticas emergentes. Diversos autores destacam a possibilidade da retenção de analitos no material absorvente e, no que se refere aos dispositivos de algodão, encontra-se reportada a ocorrência de interferências na deteção de cortisol e testosterona em estudos realizados com imunoensaios ⁽²⁵⁻²⁷⁾. Paralelamente, os dispositivos absorventes não permitem uma quantificação direta e precisa do volume salivar colhido, o que constitui uma clara desvantagem no que concerne, por exemplo, a aferição da taxa de fluxo salivar ⁽²⁷⁾.

Por norma, o pH salivar é ligeiramente ácido, apresentando valores entre 6,0 - 7,0 ⁽²⁴⁾. No entanto, estes valores podem sofrer oscilações de 5,3 até 7,8, atendendo a diversos fatores incluindo o fluxo salivar, a ingestão alimentar e hábitos de higiene oral ^(8, 24). A manutenção do pH salivar fisiológico é assegurada pela capacidade tampão salivar, conferida por componentes como o bicarbonato, fosfato, ureia, proteínas e iões ^(8, 20, 21, 24). A remineralização e a manutenção da integridade da superfície dentária encontram-se dependentes da capacidade tampão e pH salivares na medida em que, quando se verifica uma redução significativa do pH salivar, ocorre a dissolução dos complexos de cálcio e fosfato, promovendo a desmineralização do esmalte ^(8, 17, 20). De facto, sempre que o pH salivar se encontra abaixo do pH crítico (5,3-5,5), valor no qual a saliva se encontra saturada comparativamente à hidroxiapatite do esmalte, verifica-se uma tendência para a desmineralização ⁽⁸⁾.

Os valores de pH obtidos nas colheitas através dos métodos de SP e com o dispositivo absorvente polimérico SCS revelaram-se idênticos, com médias de 7,40 e 7,47 respetivamente. Os valores obtidos com o SV revelaram-se ligeiramente mais ácidos, situando-se nos 6,90.

A literatura destaca a importância da medição dos valores de pH imediatamente após a colheita, dadas as alterações químicas salivares inerentes ao tempo decorrido. Com a exposição da amostra ao ar circundante verifica-se a difusão do CO_2 presente na saliva para a atmosfera, causando tendencialmente uma subida do pH da amostra ⁽²⁰⁾. Adicionalmente, estas alterações potenciais do pH podem também ocorrer na sequência da degradação bacteriana dos compostos salivares orgânicos, incluindo proteínas, aminoácidos e ureia ⁽²⁰⁾.

No presente estudo não foi possível efetuar a medição imediata do pH após o término das colheitas, uma vez que foi necessário proceder à centrifugação das amostras colhidas com recurso a dispositivos absorventes. Todas as amostras foram, no entanto, armazenadas de imediato em gelo para minimizar eventuais alterações da composição salivar até à medição do pH.

Adicionalmente, é sugerido por alguns autores que o recurso a dispositivos absorventes pode causar algum grau de estimulação salivar, com potencial impacto nos valores do pH ⁽¹⁸⁾. Nesse sentido, neste estudo piloto foi solicitado às crianças que evitassem realizar quaisquer movimentos orais durante as colheitas com SCS e o SV para prevenir este fenómeno.

Reconhecendo-se que diversos fatores podem influenciar a composição e o fluxo salivar, dada a existência de uma grande variação intra e interindividual em parâmetros salivares, no presente estudo foi realizado um esforço logístico no sentido da padronização da metodologia das colheitas. A amostra deste estudo piloto compreendeu crianças com 4 anos, sem doenças sistémicas relevantes e que não faziam uso de medicamentos que interferissem no fluxo salivar. Todas as colheitas decorreram durante a mesma manhã, para evitar a possibilidade de alterações inerentes ao ritmo circadiano, num estabelecimento de ensino pré-escolar. O intervalo temporal decorrido entre colheitas na mesma criança e o tempo de colheita para cada método foram previamente definidos e cumpridos. Fez-se ainda um esforço para manter todos os participantes sentados, numa posição relaxada.

Havia sido solicitado aos pais das crianças que, no dia da colheita, as crianças se abstivessem de ingerir alimentos ou de escovar os dentes nos 90-120 minutos prévios à avaliação, com os objetivos de prevenir a contaminação das amostras com resíduos alimentares ou de dentífrico e de minimizar a ocorrência de flutuações salivares qualitativas e quantitativas. Contudo, é possível que este aspeto não tenha sido integralmente salvaguardado, na medida em que se trata de uma variável externa ou parasita, cujo controlo não se encontrou ao alcance do operador.

Por fim, outra limitação do presente estudo prende-se com o facto de a determinação dos valores de pH ter sido realizada com recurso a um teste colorimétrico simplificado. O método aplicado, embora se tenha revelado prático e satisfatório, é subjetivo e pouco preciso, uma vez que a avaliação é feita visualmente através de uma escala de cor. O recurso a métodos eletrométricos para a aferição do pH das amostras poderia, neste sentido, ter-se revelado uma mais-valia metodológica.

7. Conclusão

A SNE é, atualmente, reconhecida em diversas áreas das ciências médicas como um biofluido com amplas potencialidades diagnósticas, envolvendo uma colheita aparentemente rápida, pouco dispendiosa e não invasiva. No entanto, embora tecnicamente simples, o processo de colheita salivar pode revelar-se, por vezes, inesperadamente desafiante, sobretudo em populações pediátricas. Ainda que estejam disponíveis diversos dispositivos auxiliares à colheita salivar, verifica-se uma escassez de estudos comparativos entre métodos de colheita, permanecendo por aferir a sua adequação a uma variedade de tecnologias analíticas, bem como se, de facto, a sua utilização se traduz numa mais-valia do ponto de vista da colaboração das crianças.

Adicionalmente, é relevante salientar que a efetividade da saliva enquanto fluido diagnóstico parece depender em larga escala da standardização a que o processo de colheita salivar é sujeito.

Com base nos resultados obtidos e considerando as limitações do presente estudo, sobretudo no que concerne a dimensão da amostra estudada, foi possível constatar que:

- de um modo geral, a SP constituiu o método que permitiu a colheita de um volume superior de saliva, ainda que nem todos os participantes tenham colaborado na colheita;
- o dispositivo absorvente SCS permitiu colher amostras salivares de volume superior às obtidas com o SV e revelou-se uma técnica de fácil execução;
- dos dispositivos disponíveis, os absorventes parecem proporcionar algumas vantagens relativamente à colaboração da criança;
- os valores de pH das amostras colhidas através da SP foram idênticos aos obtidos com o SCS. Por sua vez, com o SV foram registados valores ligeiramente mais acídicos;
- atendendo aos resultados obtidos neste estudo piloto e na revisão da literatura conduzida, é notória a necessidade de realização de estudos adicionais com elevado nível de evidência científica que, de forma inequívoca, permitam o estabelecimento de uma opção metodológica válida, fiável e reprodutível.

8. Agradecimentos

Gostaria de tecer alguns agradecimentos, nomeadamente à minha Orientadora e Coorientadora, Prof. Doutora Ana Luísa Costa e Dra. Joana Leonor Pereira, pela paciência, apoio, disponibilidade constante e forma como me orientaram e auxiliaram na elaboração da tese de Mestrado.

De igual maneira, queria deixar uma palavra de agradecimento aos meus pais, Manuel Fernando Cruz dos Santos e Maria Manuela Sousa Marques dos Santos, pela força, carinho e por me terem transmitido valores como a honestidade, humildade e respeito, assim como agradecer à minha namorada, Andreia Margato, pois sem ela não seria possível.

Por último mas não menos importante gostava também fazer referência aos meus amigos e colegas do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, que me acompanharam ao longo destes últimos anos pelo apoio, companheirismo, motivação e entre-ajuda demonstrada.

9. Referências bibliográficas

1. Franzmann E. Saliva as a diagnostic tool. *Medical Laboratory Observer*. 2015;47(7):24-5.
2. Almeida PGA, Machado M, Lima AD, Azevedo L. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9.
3. Hanning S, Motoi L, Medicott N, Swindells S. A device for the collection of submandibular saliva. *N Z Dent J*. 2012;108(1):4-8.
4. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc*. 2008;139 Suppl:35s-40s.
5. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):30-40.
6. Macdonald M, Ghani NA, Wan Y, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. Profiling of immunoglobulins in resting and mechanically stimulated saliva. *Bioanalysis*. 2014;6(5):697-704.
7. Mohamed R, Campbell JL, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med*. 2012;1(1):19.
8. Mata ADSP, Marques DNS, Silveira JML, Marques JROF, Felino ETMC, Guilherme NFRPM. Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow: a randomized controlled trial. *Oral Diseases*. 2009;15(3):220-8.
9. Alves C, Brandao M, Andion J, Menezes R. Use of graduated syringes for measuring salivary flow rate: a pilot study. *Braz Dent J*. 2010;21(5):401-4.
10. Kaufman E, Lamster IB. The Diagnostic Applications of Saliva - A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212.
11. Navazesh M CC. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res*. 1982;61, 1158.
12. Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibel LC, Schwartz EB, *et al*. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav*. 2007;92(4):583-90.
13. Golatowski C, Salazar MG, Dhople VM, Hammer E, Kocher T, Jehmlich N, *et al*. Comparative evaluation of saliva collection methods for proteome analysis. *Clin Chim Acta*. 2013;419:42-6.
14. Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12(3):206-11.
15. Leonor SP, Laura SM, Esther IC, Marco ZZ, Enrique AG, Ignacio MR. Stimulated saliva flow rate patterns in children: A six-year longitudinal study. *Arch Oral Biol*. 2009;54(10):970-5.
16. Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick Jr RK. Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. *Nursing Research & Practice*. 2012:1-4.
17. O'Farrelly C, Hennessy E. Brief report: a comparison of saliva collection methods with preschool children: the perspectives of children, parents, and childcare practitioners. *J Pediatr Nurs*. 2013;28(3):292-5.
18. Michishige F, Kanno K, Yoshinaga S, Hinode D, Takehisa Y, Yasuoka S. Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva. *J Med Invest*. 2006;53(1-2):140-6.
19. Clements AD, Parker CR, Jr., Dixon WE, Jr., Salley B. Marshmallows used as saliva stimulant do not affect cortisol concentrations: finally a palatable alternative for toddler saliva collection. *Dev Psychobiol*. 2007;49(7):702-7.
20. Vuletic L, Peros K, Spalj S, Rogic D, Alajbeg I. Time-related Changes in pH, Buffering Capacity and Phosphate and Urea Concentration of Stimulated Saliva. *Oral Health Prev Dent*. 2014;12(1):45-53.
21. Fenoll-Palomares CM, Sanchiz V, *et al*. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004;96(11):773-783.

22. Voelker MA, Simmer-Beck M, Cole M, Keeven E, Tira D. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow, Consistency and Streptococcus mutans in relation to cigarette smoking. *J Dent Hyg.* 2013;87(1):30-7.
23. Torres SR, Nucci M, Milanos E, Pereira RP, Massaud A, Munhoz T. Variations of salivary flow rates in Brazilian school children. *Braz Oral Res.* 2006;20(1):8-12.
24. Costa ALM. Caracterização Multiparamétrica da Saúde Oral de uma Amostra de Crianças Portuguesas Diabéticas Tipo I — potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2013. Tese de Doutorado.
25. Putnam SK, Lopata C, Fox JD, Thomeer ML, Rodgers JD, Volker MA, *et al.* Comparison of saliva collection methods in children with high-functioning autism spectrum disorders: acceptability and recovery of cortisol. *Child Psychiatry Hum Dev.* 2012;43(4):560-73.
26. Harmon AG, Hibel LC, Rummyantseva O, Granger DA. Measuring salivary cortisol in studies of child development: watch out - what goes in may not come out of saliva collection devices. *Dev Psychobiol.* 2007;49(5):495-500.
27. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med.* 2015;25(2):177-92.

10. Anexos

Anexo 1 - Parecer da Comissão de Ética da FMUC

Anexo 2 - Formulário do consentimento informado

Anexo 3 - *Kit* de diagnóstico Saliva-Check Buffer (GC America, Inc., Alsip, IL)

Anexo 1 - Parecer da Comissão de Ética da FMUC

FHUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FHUC

CE ref^a 008-CE-2015
Data 23/2/2015

C/conhecimento ao aluno

Exmo Senhor
Presidente do Conselho Científico da FMUC

Assunto: Projecto de Investigação no âmbito do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde (ref^a CE-012/2015)

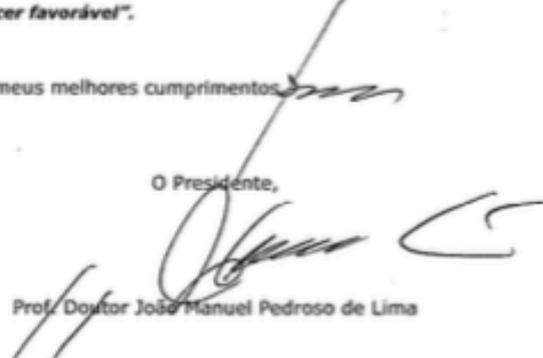
Candidato(a): Joana Leonor de Sousa Almeida Pereira

Título do Projecto: "Caracterização de perfis salivares metabólicos na cárie precoce da infância: implicações diagnósticas, preventivas e terapêuticas".

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve: "**Parecer favorável**".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos,

O Presidente,



Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

GC

SERVÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG - COMISSÃO DE ÉTICA
Pólo das Ciências da Saúde - Unidade Central
Avenida de Santa Comba, Celos, 3005-354 COIMBRA - PORTUGAL
Tel: +351 239 857 767 (Ext. 542767) | Fax: +351 239 823 236
E-mail: comissaoetica@fmed.ucp.br | www.fmed.ucp.br

Anexo 2 - Formulário do consentimento informado



FORMULÁRIO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO INFORMADO

TÍTULO DO PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO:

CARACTERIZAÇÃO DE PERFIS SALIVARES METABÓLICOS NA CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA: IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS, PREVENTIVAS E TERAPÉUTICAS

PROTOCOLO Nº

INVESTIGADOR COORDENADOR

Profª Doutora Ana Luísa Moreira Costa
Profª Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil

CENTRO DE ESTUDO

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Joana Leonor de Sousa e Almeida Pereira

MORADA

Av. Bissaya Barreto, Blocos de Celas
3000-075 Coimbra

CONTACTO TELEFÓNICO

+351 239 484 183

NOME DO DOENTE

(LETRA DE IMPRENSA)

NOME DO TUTOR LEGAL

(LETRA DE IMPRENSA)

É convidado(a) a autorizar o seu educando(a) a participar voluntariamente neste estudo porque na presente investigação se pretendem analisar amostras salivares e de placa bacteriana de crianças com 4 anos, com e sem Cárie Precoce da Infância (CPI). Este procedimento é chamado consentimento informado e descreve a finalidade do estudo, os procedimentos, os possíveis benefícios e riscos. A participação do seu educando(a) poderá contribuir para melhorar o conhecimento sobre a saúde oral infantil, particularmente no que diz respeito ao diagnóstico e progressão da CPI.

Receberá uma cópia deste Consentimento Informado para rever e solicitar aconselhamento de familiares e amigos. O investigador ou outro membro da sua equipa irá esclarecer qualquer dúvida que tenha sobre o termo de consentimento e também alguma palavra ou informação que possa não entender.

Depois de compreender o estudo e de não ter qualquer dúvida acerca do mesmo, deverá tomar a decisão de autorizar a participação ou não. Caso autorize que o seu educando(a) participe, ser-lhe-á solicitado que assine e date este formulário. Após a sua assinatura e a do investigador, ser-lhe-á entregue uma cópia.



1. INFORMAÇÃO GERAL E OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo irá decorrer em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos da Universidade de Aveiro (CICECO) e Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Pretende-se caracterizar amostras salivares e de placa bacteriana de crianças com e sem CPI através de análise metaboiómica possibilitando a identificação de potenciais marcadores de início ou de progressão da doença. Serão incluídas 240 crianças de 4 anos sem patologias sistémicas relevantes.

Trata-se de um estudo observacional, pelo que não será feita nenhuma alteração no estado da cavidade oral ou a nível da saúde geral da criança. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da FMUC de modo a garantir a protecção dos direitos, segurança e bem-estar de todos os doentes ou outros participantes incluídos e garantir prova pública dessa protecção.

2. PROCEDIMENTOS E CONDUÇÃO DO ESTUDO

2.1. Procedimentos

Fornecimento de dados – tarefa 1

A participação no estudo inclui o fornecimento de dados sociodemográficos e de comportamentos relativos à saúde oral da criança, solicitados na carta de apresentação do estudo. O preenchimento dos dados deve ser efectuado pelo tutor da criança ou, em caso de ausência, por um indivíduo que o(a) substitua e conheça bem o quotidiano da criança. Solicitamos que responda às questões com sinceridade. Ser-lhe-á ainda solicitado que a escovagem dentária na noite prévia à avaliação não seja efectuada.

Colheita de placa bacteriana – tarefa 2

Amostras de placa bacteriana presente nos dentes anteriores serão colhidas sempre que possível, recorrendo a instrumentos adequados para o efeito. Esta colheita não constitui um procedimento invasivo para a criança.

Colheita de saliva – tarefa 3

Colher-se-á saliva não estimulada, de forma não-invasiva, durante 5 minutos.

Exame intraoral – tarefa 4

Uma única examinadora, Médica dentista, realizará o exame intraoral da criança e registo dos dados obtidos. Este procedimento será efectuado com recurso a um espelho intraoral e a uma sonda.

Serão, em todos os procedimentos descritos, tomadas as medidas de controlo de contaminação e infeção cruzada preconizadas.

Outros procedimentos

As amostras recolhidas serão devidamente armazenadas até à respetiva análise.



2.2. Calendário das visitas/ Duração

Este estudo envolverá a realização de três avaliações (1º momento da colheita, pós 6 e 12 meses), nas quais se efectuarão todos os procedimentos descritos nas tarefas 2, 3 e 4. Estima-se que a duração total dos procedimentos não exceda os 15 minutos por participante em cada uma das avaliações.

2.3. Tratamento de dados

Os dados fornecidos pelos tutores legais das crianças e os resultados analíticos obtidos serão sujeitos a análise estatística.

3. RISCOS E POTENCIAIS INCONVENIENTES PARA O DOENTE

Não existem quaisquer riscos para o paciente na participação do estudo.

4. POTENCIAIS BENEFÍCIOS

O presente estudo permitirá aprofundar os conhecimentos atuais sobre a CPI, particularmente na caracterização de possíveis marcadores precoces da doença, proporcionando avanços relevantes em termos de prevenção e tratamento, com inegável impacto a nível de saúde pública e na qualidade de vida destas crianças.

5. NOVAS INFORMAÇÕES

Ser-lhe-á dado conhecimento de qualquer nova informação que possa ser relevante para a condição do seu educando(a) ou que possa influenciar a sua vontade de continuar a autorizar a participação no estudo.

6. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Não se aplica.

7. SEGURANÇA

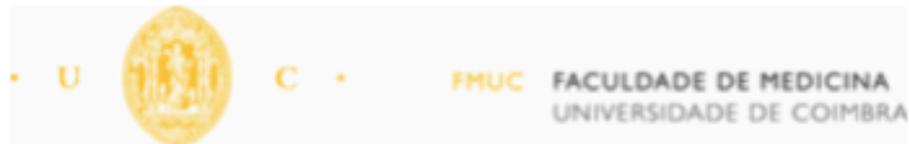
Os procedimentos a realizar, não sendo em absoluto invasivos, não comprometem a integridade da criança.

8. PARTICIPAÇÃO/ ABANDONO VOLUNTÁRIO

É inteiramente livre de aceitar ou recusar participação do seu educando(a) neste estudo. Pode retirar o seu consentimento em qualquer altura sem qualquer consequência para si ou para a criança, sem precisar de explicar as razões, sem qualquer penalidade ou perda de benefícios e sem comprometer a sua relação com o investigador que lhe propõe a colaboração neste estudo. Ser-lhe-á pedido para informar o investigador se decidir retirar o seu consentimento.

O investigador do estudo pode decidir terminar a participação do seu educando(a) se não estiver a seguir o plano do estudo, por decisão administrativa ou decisão da Comissão de Ética.

O responsável do estudo notificá-lo-á se surgir uma dessas circunstâncias e falará consigo a respeito da mesma.



9. CONFIDENCIALIDADE

Os registos do seu educando(a) manter-se-ão confidenciais e anonimizados de acordo com os regulamentos e leis aplicáveis. Se os resultados deste estudo forem publicados a identidade do seu educando(a) manter-se-á confidencial. Ao assinar este Consentimento Informado autoriza este acesso condicionado e restrito. Pode ainda, em qualquer altura, exercer o seu direito de acesso à informação. Pode ter também acesso à informação médica e dentária através da Médica dentista neste estudo. Tem também o direito de se opor à transmissão de dados que sejam cobertos pela confidencialidade profissional.

Os registos médicos e dentários que identificam o seu educando(a) e o formulário de consentimento informado que assinar serão verificados para fins do estudo pelo investigador e/ou por colaboradores do investigador, e para fins regulamentares pelo investigador e/ou pelos colaboradores do investigador e agências reguladoras noutros países. A Comissão de Ética responsável pelo estudo pode solicitar o acesso aos registos médicos e dentários para assegurar-se que o estudo está a ser realizado de acordo com o protocolo. Não pode ser garantida confidencialidade absoluta devido à necessidade de passar a informação a essas partes.

Ao assinar este termo de consentimento informado permite que as informações médicas e dentárias neste estudo sejam verificadas, processadas e relatadas conforme necessário para finalidades científicas legítimas.

Confidencialidade e tratamento de dados pessoais

Os dados pessoais dos participantes no estudo, incluindo a informação médica recolhida ou criada como parte do estudo, tais como registos da observação oral ou resultados de análises, serão utilizados para condução do estudo, designadamente para fins de investigação científica relacionados com a patologia em estudo.

Ao consentir a participação do seu educando(a) neste estudo a informação a ele respeitante, designadamente a informação clínica, será utilizada da seguinte forma:

1. O promotor, os investigadores e as outras pessoas envolvidas no estudo recolherão e utilizarão os dados pessoais do seu educando(a) para as finalidades acima descritas.
2. Os dados do estudo, associados às iniciais ou a outro código que não identifique diretamente o seu educando(a) (e não o nome) serão comunicados pelos investigadores e outras pessoas envolvidas no estudo ao promotor do estudo, que os utilizará para as finalidades acima descritas.
3. Os dados do estudo, associados às iniciais ou a outro código que não identifique diretamente o seu educando(a), poderão ser comunicados a autoridades de saúde nacionais e internacionais.
4. A identidade do seu educando(a) não será revelada em quaisquer relatórios ou publicações resultantes deste estudo.
5. Todas as pessoas ou entidades com acesso aos dados pessoais do seu educando(a) estão sujeitas a sigilo profissional.
6. Ao dar o seu consentimento para a participação do seu educando(a) no estudo autoriza o promotor ou empresas de monitorização de estudos especificamente contratadas para o efeito e seus colaboradores e/ou autoridades de saúde, a aceder aos dados constantes



do seu processo clínico, para conferir a informação recolhida e registada pelos investigadores, designadamente para assegurar o rigor dos dados que lhe dizem respeito e para garantir que o estudo se encontra a ser desenvolvido corretamente e que os dados obtidos são fiáveis.

7. Nos termos da lei, tem o direito de, através de um dos médicos envolvidos no estudo, solicitar o acesso aos dados que digam respeito ao seu educando(a), bem como de solicitar a rectificação dos dados de identificação.
8. Tem ainda o direito de retirar este consentimento em qualquer altura através da notificação ao investigador, o que implicará que o seu educando(a) deixe de participar no estudo. No entanto, os dados recolhidos ou criados como parte do estudo até essa altura que não identifiquem o seu educando(a) poderão continuar a ser utilizados para o propósito de estudo, nomeadamente para manter a integridade científica do estudo, e a informação médica do seu educando(a) não será removida do arquivo do estudo.
9. Se não der o seu consentimento, assinando este documento, o seu educando(a) não poderá participar neste estudo. Se o consentimento agora prestado não for retirado e até que o faça, este será válido e manter-se-á em vigor.

10. COMPENSAÇÃO

Este estudo é da iniciativa do investigador e, por isso, solicita-se a participação do seu educando(a) sem uma compensação financeira para a sua execução, tal como também acontece com os investigadores e o centro de estudo. Não haverá qualquer custo para o participante pela sua inclusão no estudo.

11. CONTACTOS

Se tiver perguntas relativas aos seus direitos como participante deste estudo, deve contactar:

Presidente da Comissão de Ética da FMUC

Azinhaga de Santa Comba, Celas – 3000-548 Coimbra

Telefone: 239 857 707 e-mail: comissaoetica@fmed.uc.pt

Se tiver questões sobre este estudo deve contactar:

Ana Luísa Moreira Costa, Joana Leonor Sousa Almeida Pereira

Tel: +351 239 484 183 Morada: Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas, 3000-075 Coimbra



NÃO ASSINE ESTE FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO A MENOS QUE TENHA TIDO A OPORTUNIDADE DE PERGUNTAR E TER RECEBIDO RESPOSTAS SATISFATÓRIAS A TODAS AS SUAS PERGUNTAS.

CONSENTIMENTO INFORMADO

De acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial e suas atualizações:

1. Declaro ter lido este formulário e aceito de forma voluntária que o meu educando(a) participe neste estudo.
2. Foi devidamente informado(a) da natureza, objetivos, riscos e duração provável do estudo, bem como do que é esperado da parte do meu educando(a).
3. Tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo e percebi as respostas e as informações que me foram dadas. A qualquer momento posso fazer mais perguntas ao médico responsável do estudo. Durante o estudo e sempre que quiser, posso receber informação sobre o seu desenvolvimento. O médico responsável dará toda a informação importante que surja durante o estudo que possa afetar a minha vontade ou do meu educando(a) continuar a participar.
4. Aceito que utilizem a informação relativa à história clínica e registos clínicos do meu educando(a) no estrito respeito do segredo médico e anonimato. Os dados do meu educando(a) serão mantidos estritamente confidenciais. Autorizo a consulta dos dados do meu educando(a) apenas por pessoas designadas pelo promotor e por representantes das autoridades reguladoras.
5. Aceito que o meu educando(a) siga todas as instruções que lhe forem dadas durante o estudo. Aceito que o meu educando(a) colabore com o médico e informá-lo-ei imediatamente das alterações não usuais do estado de saúde e bem-estar do meu educando(a) que ocorram.
6. Autorizo o uso dos resultados do estudo para fins exclusivamente científicos e, em particular, aceito que esses resultados sejam divulgados às autoridades sanitárias competentes.
7. Aceito que as dados gerados durante o estudo sejam informatizados pelo promotor ou outrem por si designado. Eu posso exercer o meu direito de rectificação e/ ou oposição.
8. Tenho conhecimento que sou livre de desistir que o meu educando(a) participe no estudo a qualquer momento, sem ter de justificar a minha decisão e sem comprometer a qualidade dos seus cuidados médicos. Eu tenho conhecimento que o médico tem o direito de decidir sobre a saída prematura do estudo e que me informará da causa da mesma.
9. Foi informado que o estudo pode ser interrompido por decisão do investigador, do promotor ou das autoridades reguladoras.

Nome do Participante _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Nome de Testemunha / Tutor legal: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Confirmo que expliquei ao participante acima mencionado a natureza, os objetivos e os potenciais riscos do estudo acima mencionado.

Nome do Investigador: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

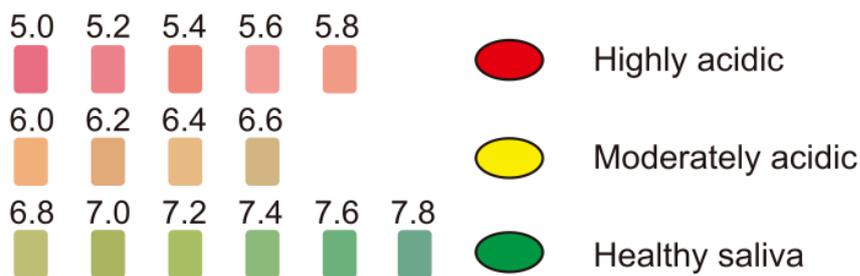
Anexo 3 - Kit de diagnóstico Saliva-Check Buffer (GC America, Inc., Alsip, IL)



Disponível em: http://www.gcamerica.com/products/preventive/Saliva_Check_BUFFER/

TEST 3 – pH measurement

Instruct the patient to expectorate any pooled saliva into the collection cup. Take a pH test strip, place this into the sample of resting saliva for 10 seconds, and then check the colour of the strip. This should be compared with the testing chart available in the package.



Disponível em:

http://www.gcamerica.com/products/preventive/Saliva_Check_BUFFER/Saliva-CheckBUFFER_8IFU.pdf

11. Lista de abreviaturas

SNE - Saliva não estimulada

SE - Saliva estimulada

SP - Salivação passiva

SCA - Saliva Collection Aid[®] (Salimetrics, State College, PA, USA)

SV - Salivette[®] (Sarstedt, Newton, NC)

SCS - SalivaBio's Children Swab[®] (Salimetrics, State College, PA, USA)

SCRS - *Saliva Collection Rating Scale*

OMS - Organização Mundial de Saúde

ICDAS - *International Caries Detection and Assessment System II*

12. Índice de tabelas e imagens

Figura 1 - Colheita de SNE através do método SP.

Figura 2 - Colheita de SNE através do métodos SCA (Salimetrics, State College, PA, USA).

Figura 3 - Aspeto do tubo coletor SCA (Salimetrics, State College, PA, USA).

Figura 4 - Colheita salivar através do dispositivo absorvente SV (Sarstedt, Newton, NC) e aspeto do mesmo.

Figura 5 - Colheita salivar através do dispositivo absorvente SV (Sarstedt, Newton, NC) e aspeto do mesmo.

Figura 6 - Colheita recorrendo ao dispositivo absorvente SCS (Salimetrics, State College, PA, USA).

Figura 7 - Colheita recorrendo ao dispositivo absorvente SCS (Salimetrics, State College, PA, USA).

Tabela I - Distribuição das amostras obtidas.

Tabela II - Volume (mL) de saliva não estimulada obtido com cada método.

Tabela III - Registo do pH salivar das amostras colhidas.