



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI



UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

# **Stresul și nivelul proteinelor salivare ca indicatori ai experienței carioase la copii**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducători de doctorat:

PROF. DR. DIDILESCU ANDREEA CRISTIANA

DR. BRAND HENDRIK SIMON

Student-doctorand:

VACARU RALUCA-PAULA

2023

## CUPRINS

<b>LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA ABREVIERILOR .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>6</b>
<b>Capitolul 1. Caria dentară și nivelul proteinelor salivare .....</b>	<b>6</b>
1.1. Caria dentară .....	6
1.1.1. Epidemiologia cariei dentare .....	6
1.1.2. Factorii implicați în apariția cariei dentare .....	7
1.1.3. Patogenia cariei dentare .....	8
1.1.4. Consecințele cariei dentare .....	10
1.1.5. Diagnosticul cariei dentare .....	11
1.2. Nivelul proteinelor salivare .....	12
1.2.1. Diagnosticul salivar .....	12
1.2.2. Concentrația totală a proteinelor salivare .....	13
1.2.3. Activitatea enzimatică salivară .....	14
1.2.4. Activitatea metaloproteinazelor matriciale salivare .....	15
<b>Capitolul 2. Caria dentară și nivelul stresului .....</b>	<b>21</b>
2.1. Stresul și anxietatea dentară .....	21
2.2. Metode obiective pentru evaluarea stresului și a anxietății dentare .....	22
2.2.1. Cortizolul salivar .....	23
2.2.2. Alfa amilaza salivară .....	24
2.3. Metode subiective pentru evaluarea stresului și a anxietății dentare .....	26
2.4. Efectul stresului asupra cariei dentare .....	27
<b>II. CONTRIBUȚII PERSONALE .....</b>	<b>28</b>
<b>Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale .....</b>	<b>28</b>
3.1. Obiective generale .....	28
3.2. Obiective specifice .....	28
3.3. Ipoteză de lucru .....	29
<b>Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării .....</b>	<b>30</b>
4.1. Condiții de desfășurare și considerații etice .....	30
4.2. Participanții la studiu .....	30
4.3. Indicii de experiență a cariilor dentare .....	31
4.4. Colectarea salivei .....	32
4.5. Concentrația totală a proteinelor salivare .....	33
4.6. Activitatea proteolitică totală salivară .....	33
4.7. Activitatea metaloproteinazelor matriciale salivare .....	34
4.8. Alfa amilaza salivară .....	34
4.9. Cortizolul salivar .....	34
4.10. Evaluări comportamentale .....	35
4.11. Evaluări psihometrice .....	35
4.12. Analiza statistică a datelor .....	36
4.13. Limitările studiului .....	37
<b>Capitolul 5. Evaluări ale experienței carioase la copii în relație cu activitatea enzimatică salivară .....</b>	<b>38</b>
5.1. Introducere (ipoteză și obiective specifice) .....	38
5.2. Material și metodă .....	41
5.2.1. Designul studiului .....	41
5.2.2. Participanții la studiu .....	41

5.2.3. Evaluări clinice .....	41
5.2.4. Colectarea salivei .....	42
5.2.5. Concentrația totală a proteinelor salivare .....	42
5.2.6. Activitatea proteolitică totală salivară .....	42
5.2.7. Activitatea metaloproteinazelor matriciale salivare .....	43
5.2.8. Analiza statistică a datelor .....	43
5.3. Rezultate .....	44
5.3.1. Date despre participanții la studiu .....	44
5.3.2. Experiența carioasă .....	45
5.3.3. Activitatea enzimatică salivară și concentrația totală a proteinelor salivare .....	47
5.3.4. Diferențe statistice între grupele de vârstă privind activitatea enzimatică salivară și concentrația totală a proteinelor salivare .....	48
5.3.5. Corelații între experiența carioasă și nivelul proteinelor salivare și a activității enzimatică salivare .....	50
5.4. Discuții .....	54
5.5. Concluzii .....	58
<b>Capitolul 6. Stresul la copii în asociere cu experiența carioasă și nivelul activității enzimatică salivare .....</b>	<b>60</b>
6.1. Introducere (ipoteză și obiective specifice) .....	60
6.2. Material și metodă .....	62
6.2.1. Designul studiului .....	62
6.2.2. Evaluări clinice .....	63
6.2.3. Activitatea enzimatică salivară .....	63
6.2.4. Biomarkeri salivari ai stresului .....	64
6.2.5. Analiza statistică a datelor .....	64
6.3. Rezultate .....	65
6.3.1. Nivelul biomarkerilor salivari ai stresului .....	65
6.3.2. Diferențe statistice între grupele de vârstă privind nivelurile alfa amilazei și cortizolului salivar .....	66
6.3.3. Corelații între nivelul biomarkerilor salivari ai stresului și experiența carioasă .....	67
6.3.4. Corelații între nivelul biomarkerilor salivari ai stresului și activitatea enzimatică salivară .....	70
6.4. Discuții .....	72
6.5. Concluzii .....	77
<b>Capitolul 7. Efectul diferitelor tipuri de tratamente dentare utilizate în managementul cariilor asupra stresului și a nivelului proteinelor salivare .....</b>	<b>79</b>
7.1. Introducere (ipoteză și obiective specifice) .....	79
7.2. Material și metodă .....	81
7.2.1. Designul studiului .....	81
7.2.2. Participanții la studiu .....	82
7.2.3. Colectarea salivei .....	83
7.2.4. Biomarkeri salivari ai stresului .....	83
7.2.5. Evaluări comportamentale .....	84
7.2.6. Evaluări psihometrice .....	84
7.2.9. Analiza statistică a datelor .....	84
7.3. Rezultate .....	85
7.3.1. Date despre participanții la studiu .....	85

7.3.2. Evaluări ale nivelurilor biomarkerilor salivari ai stresului înainte și după tratamentele dentare .....	86
7.3.3. Evaluări comportamentale și ale anxietății dentare în timpul tratamentelor dentare .....	91
7.3.4. Corelații între nivelul anxietății dentare și nivelul biomarkerilor salivari ai stresului .....	92
7.3.5. Diferențe statistice între grupul celor care au beneficiat de profilaxie dentară și grupul celor care au beneficiat de preparări de cavități privind nivelul stresului generat de tratamentele dentare .....	94
7.4. Discuții .....	95
7.5. Concluzii .....	100
<b>Capitolul 8. Discuții generale, concluzii și contribuții personale .....</b>	<b>102</b>
<b>REZUMAT .....</b>	<b>109</b>
<b>NEDERLANDSE SAMENVATTING .....</b>	<b>115</b>
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE .....</b>	<b>121</b>

## **Ipoteză de lucru și obiective**

Factorii psihosociali induc individului o stare de stres cronic, care are efecte atât psihologice, cât și fiziologice. Modificările biologice includ răspunsuri ale sistemului neuroendocrin, cu consecințe multiple, inclusiv la nivel salivar. Deoarece saliva joacă rolul de mediu de protecție pentru cavitatea bucală, chiar și modificări minore ale compoziției sale ar putea avea un impact asupra funcționării corespunzătoare a acestui ecosistem. Prin urmare, în contextul cariei dentare, pierderea proprietăților protectoare ale salivei poate duce la o incidență crescută a cariilor dentare.

Pornind de la aceste observații și de la faptul că modificările din cavitatea bucală reflectă starea generală de sănătate, am elaborat ipoteza de studiu conform căreia experiența carioasă la copii este influențată de stres și de nivelul proteinelor salivare. Obiectivul general al prezentului studiu a fost de a investiga dacă stresul și diferitele tipuri de proteine salivare au o influență asupra experienței carioase la copii.

În primul studiu (**Capitolul 5**) am evaluat experiența carioasă și nivelurile activității enzimatică salivare – activitatea proteazei totale și activitatea metaloproteinazelor matriceale, la un grup de școlari, precum și elucidarea relației dintre cele menționate mai sus. În plus, ne-am propus să investigăm dacă nivelurile acestor proteine salivare reflectă severitatea afectării prin carie dentară și dacă diferă între copiii din diferite categorii de vârstă.

În cel de-al doilea studiu (**Capitolul 6**) am evaluat nivelurile biomarkerilor salivari ai stresului, alfa amilază salivară și cortizol, la un grup de școlari, în relație cu experiența carioasă și cu activitatea enzimatică salivară.

În cel de-al treilea studiu (**Capitolul 7**) am evaluat nivelul de anxietate dentară la un grup de școlari care s-au prezentat pentru tratament stomatologic într-o clinică specializată de stomatologie pediatrică. În continuare, ne-am propus să determinăm nivelul de stres indus de două tratamente dentare diferite (o intervenție neinvazivă constând în proceduri de profilaxie dentară versus o intervenție invazivă constând în prepararea unei cavități și aplicarea unei restaurări dentare). Nivelurile de stres au fost determinate prin combinarea evaluărilor psihometrice (scala State-Trait Anxiety Inventory for Children) și comportamentale observaționale (Frankl Behavior Rating Scale) cu măsurători ale nivelurilor biomarkerilor salivari ai stresului (alfa amilaza salivară și cortizolul salivar).

## **Metodologia generală a cercetării**

### **Condiții de desfășurare și considerații etice**

Studiile au fost efectuate pe un grup restrâns de școlari sănătoși, care s-au prezentat la Clinica de Pedodontie a Facultății de Stomatologie, a Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, pentru tratamente stomatologice în perioada ianuarie 2019 – iunie 2022, ținând cont de condițiile generate de pandemia COVID-19.

Studiile au fost aprobate de Comisia de Etică a Cercetării a Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila București (nr. 188/28 ianuarie 2019) și au fost realizate în conformitate cu recomandările Declarației de la Helsinki (2008) a Asociației Medicale Mondiale și cu Ghidurilor de Bună Practică Clinică. Înainte de a fi incluși în grupul de studiu, părinții sau tutorii legali ai participanților au fost informați despre scopurile și protocoalele studiului și, dacă au acceptat să participe, au semnat un consimțământ informat scris.

### **Participanții la studiu**

Copiii care s-au prezentat pentru prima dată la Clinica Universitară de Pedodontie au fost recrutați în grupul de studiu dacă au îndeplinit următoarele criterii de includere:

- sănătos fizic și psihic;
- cu vârsta cuprinsă între 5 și 14 ani;
- prezența a cel puțin unei leziuni de carie dentară pe dinții temporari sau permanenți;
- absența leziunilor mucoasei orale sau a bolii parodontale.

Participanții au fost excluși pe baza următoarelor criterii:

- antecedente de boli sistemice;
- prezența dizabilităților intelectuale;
- administrarea de tratamente medicamentoase care ar fi putut afecta activitatea glandelor salivare în cele 3 luni anterioare admiterii în studiu;
- refuzul participării din partea părinților sau a tutorilor legali care îi însoțesc la clinică;
- prezența unei urgențe dentare care a necesitat un tratament complex imediat (durere acută datorată afecțiunilor pulpare, abcese dentare, leziuni traumatice);
- copii cu experiențe traumatice în cabinetul stomatologic.

## **Indicii de experiență a cariilor dentare**

Experiența carioasă a subiecților incluși în studiu a fost stabilită prin evaluări clinice folosind instrumente standard de examinare. Examinările au fost efectuate de un singur examinator instruit (R.-P.V.) într-un cabinet stomatologic, respectând recomandările Organizației Mondiale a Sănătății (Peterson et al., 2013). Ulterior, au fost calculați indicii de experiență a cariilor dentare. Indicii Decay-Missing-Filled (DMF/dmf) au fost calculați raportat la numărul dinților (DMFT/dmft) și suprafețelor (DMFS/dmfs). Având în vedere că participanții cu dentiție mixtă au avut experiența carioasă evaluată prin intermediul a patru indici diferiți care nu reflectau o viziune globală asupra situației actuale, am folosit și indicele Manifest Caries Lesion (MCL) pentru a obține o mai bună înțelegere a afectării prin carii active. Scorurile MCL au fost calculate prin însumarea numărului de dinți cu carii dentare netratate. În plus, am definit MCL% ca procentul de dinți cu carii dentare netratate din numărul total de dinți prezenți în cavitatea orală.

## **Colectarea probelor de salivă**

Pentru a standardiza protocolul de colectare a salivei, toate colectările de salivă au fost efectuate între orele 8 și 11 a.m. Acest timp a permis evitarea discrepanțelor majore între înregistrările pacienților, care ar fi putut fi generate de variațiile diurne ale parametrilor salivari investigați (Dawes, 1972). Înainte de prelevarea probelor de salivă, au fost furnizate instrucțiuni specifice în scris părinților sau tutorilor legali ai participanților (Kelly et al., 2008). În ziua recoltării salivei, la sosire, copiii au fost invitați în cabinetul stomatologic și s-au așezat confortabil pe scaunul stomatologic. Subiecților li s-au oferit recipiente sterile și gradate din polipropilenă, iar examinatorul a indicat pe recipient cantitatea de salivă care ar fi necesar să fie depozitată. Metoda de recoltare prin salivare pasivă a fost realizată sub supravegherea examinatorului, până când aproximativ 2 ml de salivă s-au acumulat în recipiente (Putnam et al., 2012). Probele de salivă au fost centrifugate la 3500 g timp de 15 minute și alicote din supernatanții de salivă au fost transferate în flacoane Eppendorf de 0,5 ml și depuse la  $-80^{\circ}\text{C}$ , pentru a evita ciclurile multiple de înghețare și dezghețare ale aceleiași probe de salivă.

## **Activitatea enzimatică salivară**

Concentrația totală a proteinelor salivare (TPC) a fost determinată folosind kitul Pierce™BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Landsmeer, The Netherlands), așa cum

a fost descris anterior (Prodan și colab., 2015). Rezultatele au fost exprimate în  $\mu\text{g/mL}$ . Activitatea proteolitică totală salivară a fost detectată utilizând substraturi peptidice cuplate prin metoda Fluorescence (sau Förster) Resonance Energy Transfer (FRET). Substraturile peptidice FRET utilizate în acest studiu au fost PEK-054 ([FITC]-NleKKKKVLPIQLNAATDK-[KDbc]) și PFU-089 ([FITC]-FR-[KDbc]), așa cum a fost descris anterior (Janus și colab., 2015). Activitatea proteolitică totală salivară a fost exprimată în creșteri ale fluorescenței pe minut ( $\Delta F/\text{min}$ ). Nivelurile salivare ale MMP-8 și MMP-9 au fost determinate utilizând tehnologia Luminex xMAP (multianalyte profiling) pentru detectare și cuantificare. Un panou multiplex a fost obținut prin combinarea a două kit-uri Simplex care conțin anticorpi specifici pentru fiecare metaloproteinază testată (ProcartaPlex Multiplex Immunoassay, Affymetrix, eBioscience, Thermofischer, Viena, Austria). Testul a fost efectuat pe baza protocolului furnizat de producător (Vacaru și colab., 2022a).

### **Biomarkeri salivari ai stresului**

Activitatea alfa amilazei salivare a fost determinată cu un test colorimetric al activității enzimatică. Substratul specific alfa amilazei utilizat a fost 2-clor-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriozidă (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands), care a fost dizolvat într-o soluție tampon de testare (100 mM MES, 350 mM NaCl, 6 mM Calcium Acetate, 900 mM Potassium Thiocyanate, 0.1% Sodium Azide) pentru a obține soluția de substrat. Rezultatele au fost exprimate în U/mL. (Vacaru și colab., 2022a).

Cortizolul salivar a fost evaluat folosind o metodă ELISA – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, cu un kit disponibil comercial (NovaTec Immundiagnostica GmbH, REF DSNOV20, Dietzenbach, Germania). Rezultatele au fost exprimate în ng/mL (Vacaru și colab., 2022b).

### **Evaluare comportamentală observațională**

Frica asociată unui eveniment specific a fost măsurată subiectiv folosind scala de evaluare a comportamentului Frankl (FBRS) (Frankl SN, 1962). Reacția comportamentală a subiectului la tratamentul stomatologic a fost evaluată de medicul stomatolog pediatru care a efectuat intervenția (R.-P.V.) și a fost clasificată în una din următoarele categorii de comportament: categoric negativă (--), negativă (-), pozitivă (+), categoric pozitivă (++)



## **Evaluări psihometrice**

Pentru evaluările psihometrice, a fost administrată versiunea în limba română validată a scalei State-Trait Anxiety Inventory for Children (Mindgarden, Inc., Menlo Park, CA, SUA, licență OL-00008675/ 2019-11.22 distribuită de D&D Consultants/TestCentral) (Spielberger CD, 1973). Testul a fost compus din două chestionare ce au evaluat anxietatea ca stare și ca trăsătură, fiecare conținând 20 de itemi. Chestionarele au fost administrate la sfârșitul ședințelor de tratament, în același cabinet stomatologic, înainte de recoltarea probei post-tratament de salivă. Copilul a fost îndrumat și supravegheat de medicul stomatolog pediatru, care a oferit și răspunsuri explicative ori de câte ori subiectul a întâmpinat dificultăți în înțelegerea termenilor folosiți în formulare. Forma de anxietate ca „stare” (STAIC S-Anxiety) evaluează modul în care subiectul se simte într-o situație dată, iar forma de anxietate ca „trăsătură” (STAIC T-Anxiety) evaluează modul în care se simte subiectul în situații generale.

## **Analiza statistică a datelor**

Analiza statistică a datelor a fost efectuată folosind programul Stata/IC 16 (StataCorp.2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX, USA: StataCorp LLC). Distribuția normală a fost testată folosind testul Shapiro-Wilk. Distribuțiile datelor au fost exprimate ca medii, abateri standard (SD), mediane, quartile (Q1 și Q3), intervale și procente. Corelațiile dintre variabile au fost investigate folosind fie coeficienții de corelație Pearson ( $r$ ), fie Spearman ( $r_s$ ). Pentru evaluările variabilelor categorice s-au folosit teste Pearson Chi-squared. Testul Fisher Exact a fost utilizat când frecvența așteptată a oricărei celule din tabel a fost  $<5$ . Comparațiile între nivelurile pre-post au fost determinate folosind paired t-test sau sign test. Comparațiile între grupuri au fost efectuate folosind testul unpaired t-test sau one-way ANOVA, cu corecție Scheffé. Semnificația statistică a fost luată în considerare pentru valorile  $p < 0,05$ .

## **Capitolul 5. Evaluări ale experienței carioase la copii în relație cu activitatea enzimatică salivară**

Acesta a fost un studiu clinic observațional transversal efectuat pe un lot de 22 de școlari sănătoși (vârsta medie  $8,2 \pm 2,6$  ani), care s-au prezentat pentru tratamente stomatologice la Clinica de Pedodontie a Facultății de Stomatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, în perioada ianuarie 2019 – martie 2020. În timpul primei vizite, au fost explicate obiectivele și protocolul studiului, au fost furnizate informații scrise privind descrierea studiului și instrucțiunile specifice și, dacă au acceptat să participe, au fost efectuate evaluări clinice. Colectarea probelor de salivă a fost programată în a doua vizită, în scopuri de standardizare. La a doua vizită s-au efectuat evaluarea clinică și prelevarea probelor de salivă. Ulterior au fost calculați indicii de experiență a cariei dentare și au fost efectuate analize biochimice salivare pentru a determina conținutul total de proteine, activitatea proteolitică totală și nivelurile MMP-8 și -9.

În **Capitolul 5** am demonstrat că a existat o relație între experiența carioasă și activitatea enzimatică salivară. Am observat că indicii de experiență a cariei dentare au diferit între diferitele grupe de vârstă. O explicație plauzibilă este faptul că majoritatea copiilor incluși în studiu au prezentat o dentiție mixtă la momentul participării la studiu. Prin urmare, numărul de carii dentare netratate deja existente la nivelul dinților temporari s-a cumulat cu numărul de carii dentare ce au apărut la nivelul dinților permanenți, ce au afectat cel mai frecvent primii molari permanenți. În contextul unei experiențe carioase crescute, primii molari permanenți sunt adesea afectați de carie dentară din mai multe motive: lipsa unei igiene orale adecvate - copiii nu sunt capabili să igienizeze suprafețele dentare posterioare, expunerea la diete cariogene și lipsa de informare a părinților – care ar putea să nu fie conștienți de faptul că ultimul molar aparține dentiției permanente și din acest motiv adesea ignoră necesitatea sigilării imediate sau, în unele cazuri, chiar a tratamentului acestui dinte (Llena et al., 2020). Prin urmare, este importantă informarea părinților despre igiena orală și obiceiurile alimentare adecvate, despre necesitatea tratamentului cât mai precoce al leziunilor carioase a dinților temporari și despre implementarea unor terapii profilactice, cum ar fi fluorizarea locală și sigilarea dinților permanenți nou erupți.

Nivelurile activității enzimatică salivare nu au arătat diferențe semnificative între diferitele categorii de vârstă. În ceea ce privește activitatea proteolitică totală, cele două substraturi utilizate, PFU-089 și PEK-054, au prezentat relații diferite cu experiența carioasă.

Această observație este justificată de diferența dintre cele două substraturi în ceea ce privește lungimea și componența secvenței de aminoacizi și, prin urmare, prin diferitele tipuri și numărul de proteaze salivare care ar putea degrada aceste substraturi. Considerând rezultatele noastre, PEK-054 pare mai probabil să fie un indicator al afectării prin carie dentară, spre deosebire de PFU-089. Secvența de aminoacizi mai lungă a PEK-054, conținând o varietate de aminoacizi diferiți, oferă o gamă mult mai largă de situsuri de scindare pentru diferite enzime, spre deosebire PFU-089, ce prezintă o combinație unică de fenilalanină-arginină. Având în vedere asocierea puternic pozitivă dintre degradarea PEK-054 și experiența carioasă, realizarea de experimente viitoare pentru a determina care parte (părți) din secvența substratului PEK-054 sunt scindate în prezența cariei dentare par justificate și ar putea ajuta la dezvoltarea unui substrat și mai specific, cu un potențial îmbunătățit în diagnosticul cariei dentare. Pe baza preferințelor de scindare ale MMP-8, ar putea fi posibil ca PEK-054 să fie degradat de această metaloproteinază matriceală (Rawlings și colab., 2002). Rezultate nepublicate din experimente preliminare tind să confirme această ipoteză, dar sunt necesare cercetări suplimentare.

În ceea ce privește activitatea metaloproteinazelor matriceale, nivelurile salivare ridicate atât ale MMP-8, cât și ale MMP-9 au fost asociate cu o experiență carioasă crescută. Această observație ar putea fi justificată de o relație bidirecțională între activitatea MMP-urilor salivare și experiența carioasă. În primul rând, în timpul apariției cariei cavitare, datorită pH-ului acid local, pro-MMP-urile sunt eliberate din dentină și sunt activate, contribuind la degradarea structurii dentare, ulterior ajungând și în saliva, unde devin detectabile. În al doilea rând, MMP-urile provenite din saliva sau din lichidul crevicular gingival, deja prezente în cavitatea bucală, pot pătrunde prin joncțiunea smalț-dentină și pot fi implicate în procesul de degradare a structurilor dentare (Chaussain-Miller et al., 2006, Chaussain et al., 2013).

Având în vedere că nivelurile salivare ridicate ale MMP-8 și MMP-9 sunt indicatori ai leziunilor distructive existente în cavitatea bucală și că subiecții incluși în prezentul studiu nu au prezentat semne de boală parodontală sau alte leziuni orale, precum și faptul că probele de salivă nu au fost contaminate cu sânge, putem concluziona că, la acest grup de pacienți, nivelurile ridicate ale MMP-8 și MMP-9 sunt indicatori ai experienței carioase.

În plus, în studiile viitoare, evaluările nivelurilor salivare ale MMP-8 și MMP-9 în relație cu prezența cariilor dentare ar trebui să fie realizate prin comparație cu un grup de

participanți control indemn de carii. Mai mult, nivelurile de MMP-8 și MMP-9 salivare înregistrate la copiii afectați de carie dentară ar trebui comparate și cu nivelurile înregistrate la copiii indemni de carie dentară, dar care sunt afectați de boală parodontală. Din păcate, având în vedere că studiul a fost realizat într-o clinică universitară, unde de obicei se prezintă pacienți cu diverse probleme stomatologice, rareori este cazul ca un copil lipsit de carii să se prezinte, cu excepția situațiilor în care se asociază o altă patologie orală, precum traumatismele dentare sau anomaliile dentare. Prin urmare, în studiul de față nu a fost inclus niciun grup de control indemn de carie. Pentru a crea un astfel de grup de control, studiile viitoare ar trebui să recruteze copii și prin alte mijloace, de exemplu, recrutarea cu ajutorul cabinetelor școlare.

În plus, cercetările ulterioare ar trebui efectuate folosind un design de studiu longitudinal. Un posibil design longitudinal ar putea presupune recrutarea unui grup de copii fără carii și determinarea nivelurilor inițiale ale activității enzimatică salivare. Acest lucru ar oferi niveluri de referință individuale pentru fiecare copil. Ulterior, modificările nivelurilor enzimatică ar trebui monitorizate în timpul controalelor viitoare. Obiectivul ar fi de a evalua dacă activitatea enzimatică salivară se modifică la copiii care dezvoltă carii dentare în perioadele de urmărire. Un alt design longitudinal posibil ar putea fi să includem copii cu diferite grade ale experienței carioase și să evaluăm dacă după tratamentul cariilor dentare se modifică nivelul activității enzimatică salivare. Un obiectiv suplimentar ar fi să se investigheze dacă după tratamentul cariilor dentare nivelurile de activitate enzimatică sunt comparabile cu nivelurile înregistrate la copiii indemni de carie. Abordările longitudinale propuse ar trebui să ofere informații valoroase cu privire la rolul acestor enzime salivare asupra progresiei cariilor dentare în timp. Activitatea enzimatică salivară s-ar putea dovedi a fi un indicator practic al nivelurilor de experiență carioasă, precum și un indicator al eficacității tratamentului în reducerea afectării prin carie dentară.

În mod optimist, activitatea enzimatică salivară ar putea fi evaluată în viitorul apropiat cu teste de diagnostic utilizate în cabinetul stomatologic, similare cu cele utilizate pentru a determina pH-ul salivar, capacitatea tampon sau încărcătura bacteriană salivară. Aceste teste ar putea fi utilizate ca instrumente practice pentru a monitoriza activitatea cariilor pacienților de-a lungul timpului, ca parte integrată a stomatologiei minim invazive, pentru a detecta perioadele în care nivelul de activitate a cariilor crește. Acest instrument ar putea oferi medicului stomatolog informații pentru a ști când este necesar să implementeze metode de

tratament preventiv sau curativ. Dimpotrivă, în cazul unei activități carioase scăzute, așa cum este indicată de nivelurile activității enzimaticice salivare, leziunile de carie incipiente sau superficiale ar putea fi pur și simplu monitorizate și ținute sub control prin metode profilactice de rutină. În plus, disponibilitatea unui test rapid ar putea ajuta la motivarea pacienților să se conformeze mai bine la controalele stomatologice periodice și să implementeze rutine eficiente de îngrijire orală.

## Capitolul 6. Stresul la copii în asociere cu experiența carioasă și activitatea enzimatică salivară

Acesta a fost un studiu clinic observațional transversal realizat pe același grup de 22 de școlari sănătoși (vârsta medie  $8,2 \pm 2,6$  ani) recrutați la prima vizită în Clinica de Pedodonție a Facultății de Stomatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, în perioada ianuarie 2019 – martie 2020, care a fost prezentat în *Capitolul 5. Evaluări ale experienței carioase la copii în relație cu activitatea enzimatică salivară*. Protocolul de cercetare a inclus evaluări ale experienței carioase și colectarea probelor de salivă. Din aceleași probe de salivă care au fost deja colectate în studiul precedent, așa cum s-a descris anterior, pe lângă evaluarea activității enzimatice salivare, au fost efectuate analize biochimice suplimentare pentru a determina nivelurile salivare ale biomarkerilor de stres, alfa amilază și cortizol.

În **Capitolul 6** am arătat că cele două sisteme de răspuns la stres, axa HPA și SNA, par să aibă efecte diferite asupra experienței carioase la copii. Evenimentul potențial stresant, așa cum a fost perceput de subiecții din acest studiu, a fost reprezentat de vizita într-o clinică stomatologică. Ambii biomarkeri de stres, alfa amilaza salivară și cortizolul salivar, au răspuns în consecință, așa cum a fost demonstrat de asocierea dintre nivelurile lor normalizate la concentrația proteinelor totale salivare. Cu toate acestea, atunci când relația lor cu experiența carioasă a fost explorată în continuare, acești biomarkeri salivari au acționat diferit. De fapt, alfa amilaza salivară pare să aibă un rol protector, deoarece niveluri mai mari au fost asociate cu o experiență carioasă mai scăzută, spre deosebire de nivelurile de cortizol salivar care nu au arătat nicio legătură cu experiența carioasă. Relația negativă observată între alfa amilaza salivară și experiența carioasă ar putea fi justificată de activitatea sa enzimatică (Lahiri et al., 2021), deși nivelurile sale sunt influențate de răspunsurile sistemului SNA la stimuli stresanți (Ali și Nater, 2020). În timp ce AOC reprezintă un răspuns combinat și coordonat al activității sistemelor HPA și SNA (Ali și Pruessner, 2012), relația sa cu experiența carioasă se datorează, cel mai probabil, relației dintre alfa amilaza salivară și experiența carioasă.

Având în vedere perioadele lungi de timp necesare pentru apariția unei leziuni de carie dentară, este puțin probabil ca stresul situațional să aibă o influență directă asupra apariției cariilor dentare. În acest studiu, am evaluat nivelurile acute ale biomarkerilor de stres salivar, în asociere cu o situație dată și nu am evaluat nivelurile de stres cronic, care ar fi mai plauzibil

să aibă o influență asupra apariției cariei dentare. Pentru a obține informații despre stresul cronic resimțit, trebuie să se colecteze mai multe probe de salivă de la copiii participanți, în diferite momente de-a lungul zilei, precum și în diferite zile pe o perioadă mai lungă de timp. Această abordare ar permite o comparație între diferitele situații ce pot avea efect asupra nivelurilor de stres. Astfel de studii ar trebui să includă și evaluări ale nivelurilor bazale de referință, evaluate din probe de salivă colectată dimineața, acasă, la trezire, în zile succesive.

Suplimentar, am investigat potențialele interacțiuni dintre biomarkerii salivari ai stresului și activitatea enzimatică salivară. Am arătat că niveluri mai mari de alfa amilază salivară au fost asociate cu o activitate proteolitică totală salivară mai scăzută și cu niveluri salivare mai scăzute ale MMP-9. Având în vedere că am demonstrat anterior că nivelurile mai mari ale alfa amilazei salivare sunt asociate cu o experiență carioasă mai scăzută și că nivelurile scăzute ale activității proteolitice totale și ale MMP-9 sunt asociate cu o experiență carioasă scăzută, interacțiunea menționată mai sus pare plauzibilă. Din cunoștințele noastre, această relație nu a fost explorată anterior în studii clinice, iar potențialele interacțiuni dintre aceste proteine salivare și influența lor asupra experienței carioase reprezintă subiecte de cercetare interesante și promițătoare care ar trebui explorate în viitor.

## **Capitolul 7. Efectul diferitelor tipuri de tratamente dentare utilizate în managementul cariilor asupra stresului și a nivelului proteinelor salivare**

Acesta a fost un studiu clinic pre-post efectuat pe un grup de 28 de școlari sănătoși, care s-au prezentat pentru tratamente stomatologice la Clinica de Pedodonție a Facultății de Stomatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, în perioada ianuarie 2019 - iunie 2022. Înainte de a fi incluși în grupul de studiu, părinții sau tutorii legali ai participanților au fost informați despre scopurile și protocoalele studiului și, dacă au acceptat să participe la studiu, au semnat un consimțământ informat scris. Copiii au avut nevoie de tratamente stomatologice și în funcție de nevoile lor au fost repartizați în două grupuri de studiu: un grup de profilaxie (PR) și un grup de preparare a unei cavitații dentare (CP). În cadrul următoarei vizite în clinică, copiii din grupul PR (n = 14) au beneficiat de un tratament profilactic constând în igienizare profesională cu instrumentar rotativ și fluorizare topică cu geluri cu fluor. Copiii din grupul CP (n = 14) au beneficiat de un tratament stomatologic restaurator. Înainte și la 30 de minute după finalizarea ședinței de tratament, copiilor li s-a cerut să colecteze o probă de salivă totală nestimulată pentru analiza nivelurilor biomarkerilor de stres salivar. În plus, nivelurile de anxietate au fost evaluate folosind metode observaționale și psihometrice, așa cum a fost descris anterior.

În **Capitolul 7**, am arătat că diferite tratamente dentare au un efect diferit asupra nivelurilor salivare ale biomarkerilor de stres, alfa amilază și cortizol, și că cele două sisteme de stres, axa HPA și SNA, au reacționat diferit la niveluri de stres comparabile. Cu cât evenimentul a fost mai stresant, cu atât a fost mai mare creșterea nivelurilor salivare ale ambilor biomarkeri de stres. Cu toate acestea, acești biomarkeri și-au urmat în continuare tiparul diurn (McCarthy et al., 2009, Rohleder și Nater, 2009), ceea ce a însemnat că, indiferent de expunerea la un eveniment care induce stres, cum ar fi cele două tratamente stomatologice pe care le-am efectuat, nivelurile post-tratament ale cortizolului salivar au scăzut, în timp ce nivelurile post-tratament ale alfa-amilazei salivare au crescut în comparație cu nivelurile pre-tratament. Având în vedere că nivelurile post-tratament au înregistrat o scădere mai mare a cortizolului salivar și o creștere mai mică a alfa amilazei salivare în cazul profilaxiei dentare comparativ cu prepararea unei cavitații dentare, înseamnă că profilaxia dentară, o intervenție neinvazivă, a fost percepută ca fiind mai puțin stresantă în comparație cu prepararea cavitații dentare, care a fost percepută ca o intervenție mai complexă și mai



invazivă. Vârsta și experiența carioasă nu au influențat gradul de stres sau nivelul de anxietate în cazul copiilor expuși la tratamente stomatologice.

Suplimentar, copiii care au manifestat un comportament mai puțin cooperant în timpul tratamentelor stomatologice au înregistrat niveluri mai mari de anxietate ca stare. Această observație arată că, cu cât o situație dată este percepută ca fiind mai stresantă, cu atât copilul se va comporta mai puțin cooperant. Cu toate acestea, scorurile State-Trait Anxiety Inventory for Children nu au reușit să arate vreo asociere cu nivelurile salivare ale biomarkerilor de stres, alfa amilază și cortizol. Mai mult, în acest studiu, evaluările psihometrice nu au fost suficient de sensibile pentru a face diferența între copiii expuși la tratamente stomatologice non-invazive și copiii expuși la tratamente stomatologice invazive. Cu toate acestea, în studii pe loturi mai mari de participanți, aceste evaluări psihometrice ar putea arăta rezultate promițătoare și ar trebui explorate în continuare în studiile din sfera stomatologică.

Mai mult, o strategie importantă de prevenire a anxietății dentare ar fi includerea copiilor într-un program de educație și prevenție stomatologică, precum și inițierea primelor lor vizite la stomatolog la o vârstă mai fragedă, când nu au apărut încă afecțiuni dentare. Vârsta și experiența carioasă nu au influențat gradul de stres sau nivelul de anxietate la copii, ceea ce înseamnă că este necesară evaluarea mai multor factori pentru înțelegerea anxietății dentare și a nivelurilor de stres induse de tratamentele dentare. Copiii care au manifestat un comportament mai puțin cooperant în timpul tratamentelor stomatologice au înregistrat niveluri mai ridicate de anxietate de stare, asociată cu o anumită experiență, dar nu și de anxietate de trăsătură, care ar defini o anxietate cronică, generală.

## **Discuții generale, concluzii și contribuții personale**

Aceste studii au demonstrat rezultate interesante, în ciuda mai multor limitări care vor fi discutate în continuare. Restricțiile impuse de pandemia de COVID-19 au limitat procesul de recrutare al participanților, ceea ce înseamnă că dimensiunea eșantionului din acest studiu a fost relativ mică. Designul inițial al studiului a avut și o componentă longitudinală, ce presupunea ca după realizarea tuturor tratamentelor stomatologice să fie efectuate reevaluări ale nivelurilor salivare ale parametrilor investigați pentru a evalua dacă reducerea experienței carioase are un efect asupra acestor parametri salivari. Din păcate, restricțiile pandemiei de COVID-19 au făcut imposibilă urmărirea tuturor participanților incluși sau, în unele cazuri, chiar finalizarea tuturor tratamentelor stomatologice, limitând acest studiu la un design transversal. Acesta nu a fost singurul motiv pentru pierderea monitorizării pacienților, dar, de asemenea, după ce li s-au efectuat toate tratamentele stomatologice, unii pacienți nu au mai revenit la controlul periodic.

O provocare neașteptată cu care ne-am confruntat a fost colectarea probelor de salivă. Colectarea salivei în general și capacitatea de a furniza volumul necesar de salivă au părut problematice pentru unii copii, în special pentru cei mai mici de vârstă, care aveau nevoie de mai mult timp pentru a finaliza această sarcină. Acesta este, de asemenea, unul dintre motivele pentru care am exclus posibilitatea de a avea mostre de salivă recoltate acasă de către părinți ce ar fi servit pentru stabilirea unor valori de referință. În această situație nu am fi putut controla procesul de colectare, precum nici condițiile de depozitare și de transport ale probelor.

O altă limitare metodologică este faptul că evaluările comportamentale au fost realizate de un singur investigator, existând astfel riscul de a introduce o oarecare subiectivitate acestor evaluări. O opțiune de reducere a acestui risc ar fi utilizarea înregistrărilor video ale ședințelor de tratament, care ar putea fi folosite pentru ca alți investigatori să evalueze comportamentul subiecților.

În final, trebuie să luăm în considerare și faptul că copiii au fost incluși în studiu pe măsură ce s-au prezentat în clinica universitară în cadrul turei de lucru a investigatorului principal (R.-P.V.), și numai dacă au îndeplinit toate criteriile de eligibilitate. Acest lucru a însemnat că au existat intervale de timp între diferiți pacienți și, prin urmare, probele de salivă colectate de la diferiți subiecți au avut timpi diferiți de depozitare în congelator. Pentru

a minimiza acești timpi de depozitare, analizele biochimice au fost efectuate în loturi și executate imediat ce a fost recoltat un număr rezonabil de probe. Deși această procedură a redus degradarea biochimică a parametrilor salivari în timpul depozitării, totuși, a introdus o anumită variație inter-test asociată cu procesarea în lot.

Considerând aceste limitări ale studiilor efectuate, concluziile noastre contribuie la cunoștințele existente despre modul în care diferitele proteine salivare sunt asociate cu experiența carioasă la copii. De fapt, noutatea acestui studiu este reprezentată de faptul că am realizat un studiu interdisciplinar cuprinzător prin realizarea de evaluări pe mai multe niveluri într-un grup de pacienți pediatrici. Din cunoștințele noastre, această asociere de evaluări efectuate în cadrul aceluiași studiu nu a fost realizată anterior.

Acest studiu oferă informații valoroase despre modul în care diferite proteine salivare interacționează și își modulează reciproc activitatea, precum și despre cum aceste proteine salivare ar putea influența progresia cariilor dentare. Acest fapt le recomandă ca potențiali indicatori pentru monitorizarea evoluției cariei dentare. Dintre parametrii investigați, alfa amilaza salivară, MMP-8 și MMP-9 s-au dovedit a fi indicatori ai experienței carioase. Deși determinarea activității proteolitice totale salivare folosind substratul PEK-054 nu a demonstrat o specificitate pentru diagnosticul cariei dentare, are totuși potențialul de a fi un indicator promițător. O altă perspectivă valoroasă a cercetării descrise în această teză este demonstrarea interacțiunilor dintre cele două sisteme de răspuns la stres, axa HPA și SNA. Dintr-o perspectivă practică, prin integrarea unor evaluări obiective și subiective ale comportamentului și reacțiilor copiilor în timpul ședințelor de tratament stomatologic, medicii stomatologi pediatri ar putea să-și optimizeze abordarea terapeutică și să gestioneze mai eficient nivelul de stres al pacienților, mai ales luând în considerare faptul că un comportament cooperant nu exclude întotdeauna prezența anxietății dentare.

În concluzie, rezultatele noastre subliniază necesitatea unei mai bune înțelegeri a mecanismelor prin care stresul și nivelul proteinelor salivare ar putea influența experiența carioasă și modul în care diferite tratamente dentare influențează comportamentul și nivelul de stres al copiilor.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- ALI, N. & NATER, U. M. 2020. Salivary Alpha-Amylase as a Biomarker of Stress in Behavioral Medicine. *Int J Behav Med*, 27, 337-342.
- ALI, N. & PRUESSNER, J. C. 2012. The salivary alpha amylase over cortisol ratio as a marker to assess dysregulations of the stress systems. *Physiol Behav*, 106, 65-72.
- CHAUSSAIN, C., BOUKPESSI, T., KHADDAM, M., TJADERHANE, L., GEORGE, A. & MENASHI, S. 2013. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Frontiers in Physiology*, 4.
- CHAUSSAIN-MILLER, C., FIORETTI, F., GOLDBERG, M. & MENASHI, S. 2006. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*, 85, 22-32.
- DAWES, C. 1972. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol*, 220, 529-45.
- FRANKL SN, S. F., FOGELS HR 1962. Should the parent remain with the child in the dental operatory? *ASDC J Dent Child* 29, 150-163.
- JANUS, M. M., KEIJSER, B. J., BIKKER, F. J., EXTERKATE, R. A., CRIELAARD, W. & KROM, B. P. 2015. In vitro phenotypic differentiation towards commensal and pathogenic oral biofilms. *Biofouling*, 31, 503-10.
- KELLY, S. J., YOUNG, R., SWEETING, H., FISCHER, J. E. & WEST, P. 2008. Levels and confounders of morning cortisol collected from adolescents in a naturalistic (school) setting. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 1257-1268.
- LAHIRI, D., NAG, M., BANERJEE, R., MUKHERJEE, D., GARAI, S., SARKAR, T., DEY, A., SHEIKH, H. I., PATHAK, S. K., EDINUR, H. A., PATI, S. & RAY, R. R. 2021. Amylases: Biofilm Inducer or Biofilm Inhibitor? *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 660048.
- LLENA, C., CALABUIG, E., SANZ, J. L. & MELO, M. 2020. Risk Factors Associated with Carious Lesions in Permanent First Molars in Children: A Seven-Year Retrospective Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*, 17.
- MCCARTHY, A. M., HANRAHAN, K., KLEIBER, C., ZIMMERMAN, M. B., LUTGENDORF, S. & TSALIKIAN, E. 2009. Normative salivary cortisol values and responsivity in children. *Appl Nurs Res*, 22, 54-62.
- PETERSON, S. N., SNESRUD, E., LIU, J., ONG, A. C., KILIAN, M., SCHORK, N. J. & BRETZ, W. 2013. The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS One*, 8, e58487.
- PRODAN, A., BRAND, H. S., LIGTENBERG, A. J., IMANGALIYEV, S., TSIVTSIVADZE, E., VAN DER WEIJDEN, F., CRIELAARD, W., KEIJSER, B. J. & VEERMAN, E. C. 2015. Interindividual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. *Eur J Oral Sci*, 123, 149-57.
- PUTNAM, S. K., LOPATA, C., FOX, J. D., THOMEER, M. L., RODGERS, J. D., VOLKER, M. A., LEE, G. K., NEILANS, E. G. & WERTH, J. 2012. Comparison of saliva collection methods in children with high-functioning autism spectrum disorders: acceptability and recovery of cortisol. *Child Psychiatry Hum Dev*, 43, 560-73.
- RAWLINGS, N. D., O'BRIEN, E. & BARRETT, A. J. 2002. MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Research*, 30, 343-346.
- ROHLEDER, N. & NATER, U. M. 2009. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 469-85.
- SPIELBERGER CD, E. C., LUSHENE RE, MONTUORI J, PLATZEK D 1973. *STAIC Preliminary Manual for the State-Trait Anxiety Inventory for Children ("How I feel questionnaire")*, California, Consulting Psychological Press Inc.
- VACARU, R. P., DIDILESCU, A. C., CONSTANTINESCU, I., MĂRUNȚELU, I., TĂNASE, M., STANCIU, I. A., KAMAN, W. E. & BRAND, H. S. 2022a. Salivary Enzymatic Activity and Carious Experience in Children: A Cross-Sectional Study. *Children (Basel)*, 9.
- VACARU, R. P., DIDILESCU, A. C., SFEATCU, R., TĂNASE, M., MUNTEANU, A., MIRICESCU, D., KAMAN, W. E. & BRAND, H. S. 2022b. The Effect of Dental Treatments in Caries Management on Stress and Salivary Protein Levels. *J Clin Med*, 11.

## LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

### ARTICOLE PUBLICATE ÎN REVISTE DE SPECIALITATE:

**Vacaru RP**, Didilescu AC, Constantinescu I, Mărunțelu I, Tănase M, Stanciu IA, Kaman WE, Brand HS. Salivary Enzymatic Activity and Carious Experience in Children: A Cross-Sectional Study. *Children* (Basel). 2022 Mar 2;9(3):343. doi: 10.3390/children9030343. PMID: 35327715; PMCID: PMC8947358. ISI-indexed *Impact factor* – 2,863. <https://www.mdpi.com/2227-9067/9/3/343>

**Vacaru RP**, Didilescu AC, Sfeatcu R, Tănase M, Munteanu A, Miricescu D, Kaman WE, Brand HS. The Effect of Dental Treatments in Caries Management on Stress and Salivary Protein Levels. *J Clin Med*. 2022 Jul 27;11(15):4350. doi: 10.3390/jcm11154350. PMID: 35893440; PMCID: PMC9332813. ISI-indexed *Impact factor* – 4,964. <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/15/4350>