



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATÁLIA BERTOLO DOMINGUES

**FATORES SALIVARES RELACIONADOS À CÁRIE DENTÁRIA E
DOENÇA PERIODONTAL EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE
DOWN.**

Araraquara

2015



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATÁLIA BERTOLO DOMINGUES

**FATORES SALIVARES RELACIONADOS À CÁRIE DENTÁRIA E
DOENÇA PERIODONTAL EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE
DOWN.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Ap. Giro

Araraquara

2015

Domingues, Natália Bertolo

Fatores salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down / Natália Bertolo Domingues .-- Araraquara: [s.n.], 2015.

75 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Síndrome de Down 2. Saliva 3. Cárie dentária 4. Estresse oxidativo I. Título

NATÁLIA BERTOLO DOMINGUES

FATORES SALIVARES RELACIONADOS À CÁRIE DENTÁRIA E
DOENÇA PERIODONTAL EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE
DOWN.

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontopediatria

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Ap. Giro

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Marcia Hiromi Tanaka

3º Examinador: Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani

Araraquara, 17 de março de 2015

DADOS CURRICULARES

NATÁLIA BERTOLO DOMINGUES

NASCIMENTO 01/12/1989, São Carlos/SP

FILIAÇÃO José Fernando Domingues
Heleny Rossane Bertolo Domingues

Formação Acadêmica:

2008-2012 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

2013-2015 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Dedico este trabalho...

A Deus, pela oportunidade que me concedeu, por guiar meus passos e iluminar minhas decisões, mesmo em momentos difíceis. Por colocar em minha vida pessoas muito especiais que permitiram meu crescimento e me deram forças para concluir mais esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, José Fernando e Heleny, por toda a confiança e amor que depositaram em mim, por todo apoio e carinho que me proporcionaram durante a minha caminhada e acima de tudo, por me ensinarem valores tão nobres como a humildade, a generosidade e a bondade.

A minha irmã, Larissa, que sempre se fez uma grande amiga, presente nos bons e maus momentos. Que com seu jeito único e cativante de ser alegre meus dias mesmo que distante. Você é e sempre será meu porto seguro e te levo em meu coração aonde quer que esteja.

A toda minha família, que sempre se faz presente em todos os momentos de minha vida, torcendo por mim e vibrando por todas as minhas conquistas.

AMO MUITO TODOS VOCÊS!

Agradecimentos Especiais

Aos meus queridos e amados pais, José Fernando e Heleny, que fizeram possível a conclusão de mais esta etapa de minha formação. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Obrigada por estarem sempre na torcida, por todo o incentivo, por me ouvirem, por aguentarem meus estresses e pelo ombro amigo. A vocês devo tudo! Vocês são a minha base e meus grandes exemplos de vida! Hoje, esta conquista também é de vocês!

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro, agradeço, primeiramente, pela confiança depositada para a execução deste trabalho. Nunca esquecerei todos os ensinamentos a mim proporcionados, por estar sempre presente e dispensar de tempo, paciência e atenção para o bom andamento deste curso de mestrado. Muito obrigada por ser além de minha orientadora, uma amiga tão gentil e não medir esforços para me ajudar. Tia Elisa, esses dois anos passaram voando, mas com o nosso convívio pude perceber o grande exemplo de ser humano e profissional que é. Tenho grande admiração por você, principalmente por sua dedicação e carinho com os pacientes especiais de nossa clínica. A levarei sempre em um lugar muito especial em meu coração.

À Marcia Hiromi Tanaka, por todo empenho e paciência que teve ao ensinar-me. Obrigada, por toda atenção, carinho e incentivo que sempre teve comigo. Mesmo a distância, você esteve presente e acompanhou ativamente a execução deste trabalho. Obrigada pelas consultorias via Skype, pelas ligações, por me ajudar em momentos de dúvida, por sua amizade, e por contribuir, e muito, em minha formação profissional. Fico extremamente feliz de podermos trabalhar juntas e de ter sua presença hoje na minha banca.

Ao Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, pessoa sincera, de coração enorme e caráter inquestionável, que hoje, além de meu professor é um amigo muito especial. Só

tenho a agradecer por todos os ensinamentos, companheirismo, apoio, por todas as risadas e momentos compartilhados. Obrigada por ser esse “paizão” que me adotou com tanto carinho em Araraquara. Cyneu, você é uma pessoa e profissional exemplares e tem a minha eterna admiração.

Ao Matheus Racy Mariusso, agradeço por toda a disponibilidade que teve em me ajudar. Obrigada pela parceria nas inúmeras coletas e viagens que realizamos, e também por todas as risadas, que eram garantidas. Com certeza, hoje você se tornou um amigo muito querido que levarei para a vida toda.

Ao Aion Mangino Messias, que desde meu primeiro dia na FOAr se tornou meu grande parceiro. Obrigada por me ajudar sem medir esforços, pelas palavras de ânimo, pelo incentivo nos momentos de incerteza, pela companhia nos estudos, pela paciência nos momentos de histeria e também, é claro, por alegrar e muito os meus dias. Você é um amigo único a quem tenho grande admiração e estima.

A minha “família” Araraquarense, Aion Messias, Vinícius Krieger, Matheus Mariusso, Diego Giroto, Manuel Restrepo, Fabiano Jeremias, Taisa Pansani, Carolina Mollo, Patrícia Schneider, Maysa Vasconcelos, Chaiene Zago, Tamara Beraldo e Jaqueline Ignácio, palavras me faltam para descrever o que representam para mim. Muito obrigada pelo convívio, pela amizade sincera e por tudo que compartilhamos juntos. Vocês são essenciais em minha vida!

As minhas amigas Inara Storto, Ana Carolina Engler, Ana Maria Assy e Wandressa Ferrarini que nunca deixaram de me ouvir e me ajudar em todos os aspectos. Obrigada pelas ligações inesperadas, pela amizade e por mesmo com a distância estarem tão presentes em minha vida. Eu amo vocês!

A todas as Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) e outras instituições (Conviva Down, Avança Down, Paralelo, AAEE) que colaboraram conosco para a realização deste estudo. Obrigada por toda a gentileza e disposição em nos receber e pelo admirável trabalho que realizam.

A todos os pacientes e seus responsáveis, agradeço imensamente por confiarem em meu trabalho. Foi uma longa jornada, mas com certeza muito recompensadora. Tenho um grande carinho por todos, principalmente aos pacientes com síndrome de Down, pois vocês me permitiram conhecer um “mundo” novo e experimentar o amor na sua mais pura essência. Obrigada por serem tão ESPECIAIS! A todos os meus pacientes, minha gratidão por tornarem a execução deste trabalho possível.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pela digníssima diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barreto Montandon e pela vice-diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgaviolli Massucato.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Prof^a. Dra. Marcia Hiromi Tanaka, por aceitarem prontamente o meu convite. Fico honrada e repleta de alegria em tê-los presentes na minha defesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP coordenado pelo Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior.

Aos docentes da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fabiano Jeremias, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Prof^a. Dr^a Raquel M. Scarel Caminaga, por se mostrar uma exímia professora e pesquisadora, sempre disposta a ajudar e ensinar. Obrigada por disponibilizar o Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, por todo o apoio e confiança em mim depositados.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti, agradeço por todo o apoio dado quando necessário, por sua contribuição para o bom desenvolvimento da análise microbiológica deste trabalho e por seu empenho mesmo com muito afazeres.

À Prof^a. Dr^a. Marcia Mayer, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, por toda sua atenção e gentileza ao nos disponibilizar os plasmídeos bacterianos para execução de parte da metodologia deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de São Paulo – USP, obrigada por disponibilizar o Laboratório de Biologia Oral para execução da análise por HPLC (Cromatografia Líquida de alta performance), pelo auxílio e por me receber de maneira tão gentil.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Ao Prof. Dr. Gelson Luis Adabo, a quem tenho uma enorme admiração pela pessoa e profissional de caráter que é. Sou grata por ter tido a oportunidade de ser sua orientada de iniciação científica. O senhor é uma pessoa exemplar a quem devo muito do que sei hoje. Obrigada por sempre me receber tão gentilmente e de braços abertos.

À Ana Carolina Becci, Thamires Orrico e Flávia Ibuki, por todo o tempo disponibilizado em me ajudar e ensinar algumas técnicas laboratoriais. Sou grata a cada uma de vocês.

Ao Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica, do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti e à estagiária Mayra Delbon.

À Professora Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da Unesp, pela orientação na metodologia para medir a Capacidade Tampão Salivar.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação: Mara , Alexandre e Cristiano por toda atenção e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Dulce, Soninha, Flávia, Odete, Diego, Totó, Pedrinho, Cristina e Márcia, pessoas por quem tenho muito carinho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Marley, Cristina, Ceres, Maria, Sílvia, Odete, Elaine, Ines, Ana e Adriano.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ana Carolina, Matheus, Vinicius, Carolzinha, Yasmin, Diego, Manuel, Thalita, Pops, Camila, Jéssica, Luana, Thamires e Luciana, agradeço por todos os nossos momentos juntos e por todo o carinho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram para a execução desta pesquisa.

"Nada do que vivemos tem sentido
se não tocarmos o coração das pessoas."

Cora Coralina

Domingues NB. Fatores salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar fatores salivares relacionados à cárie e à doença periodontal em crianças com síndrome de Down (SD). Foram selecionadas crianças de 6-15 anos, sendo 18 com SD e 23 não sindrômicas (controle). Inicialmente foram avaliados os índices CPO-D/ceo-d e o índice gengival (IG), realizada a coleta da saliva estimulada e determinados fluxo salivar (mL/min), pH e capacidade tampão. A contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* na saliva foi realizada após cultivo em meios seletivos e a quantificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). A dosagem de proteína total (PT), a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e da Glutaciona Peroxidase (GPx) e a capacidade antioxidante total da saliva (TAOC) foram determinadas por espectroscopia, e o nível de Malondialdeído (MDA) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os resultados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney e Correlação de Spearman ($\alpha=0,05$). Não houve diferença nos índices CPO-D/ceo-d e IG entre os grupos. O fluxo salivar foi menor no grupo SD ($p<0,0001$). Não houve diferença entre os grupos com relação a quantidade de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas. Houve correlação positiva entre contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* e os índices CPO-D/ceo-d ($r=0,621$ e $r=0,540$, respectivamente), apenas para o grupo SD. A GPx e a TAOC não apresentaram diferença significativa entre os grupos, enquanto a dosagem de PT ($p<0,0001$), a SOD ($p=0,0002$) e o MDA ($p=0,0016$) foram maiores na saliva do grupo SD. Houve correlação positiva entre PT e IG ($r=0,491$), e negativa entre SOD e fluxo salivar ($r=-0,475$) para o grupo SD. Pode-se concluir que: (1) O fluxo salivar reduzido nas crianças com SD pode ser um fator importante no processo de desenvolvimento da cárie e da doença periodontal; (2) Níveis elevados de SOD e MDA na saliva evidenciam a influência significativa do estresse oxidativo no desenvolvimento da doença periodontal precoce nos indivíduos SD.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome de Down, saliva, cárie dentária, estresse oxidativo.

Domingues NB. Salivary factors related to dental caries and periodontal disease in children with Down syndrome. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate salivary factors related to dental caries and periodontal disease in children with Down syndrome (DS). Forty-one children aged 6-15 years, being 18 DS and 23 non-syndromic (control) were selected. First, DMFT/dmft and gingival index (IG) were evaluated and stimulated whole saliva was collected. Then, salivary flow (mL/min) was calculated and pH and salivary buffering capacity were measured. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp* counts were determined after culture on selective medium and Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was used for absolute quantification of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Total protein dosage (TP) dosage, superoxide dismutase activity (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and total antioxidant capacity of saliva (TAOC) were quantified by spectroscopy. Malondialdehyde level (MDA) was quantified by High-performance liquid chromatography (HPLC). Data were analyzed using Mann-Whitney test and Spearman correlation ($\alpha = 0.05$). There was no difference in DMFT/dmft and GI index between groups. Salivary flow was significantly lower in DS group ($p < 0.0001$). Related to cariogenic and periodontopathogenic bacteria there was no statistically significant difference between groups. A positive correlation between counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp* and the DMFT/dmft index ($r=0,621$ e $r=0,540$, respectively), was verified only for the DS group. No significant difference between groups was observed for GPx and TAOC, while TP ($p < 0.0001$), SOD ($p=0.0002$) and MDA ($p=0.0016$) were higher in saliva of DS group. There was a positive correlation between TP and GI ($r=0,4915$), and a negative correlation between SOD and salivary flow ($r=-0,4751$) in DS group. We could conclude that: (1) reduced salivary flow in children with DS may be an important factor in development of caries and periodontal disease; (2) high levels of SOD and MDA in saliva show the significant influence of oxidative stress in the early development of periodontal disease in DS people.

KEY-WORDS: Down syndrome, saliva, dental caries, oxidative stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
PROPOSIÇÃO.....	20
CAPÍTULO I.....	21
CAPÍTULO II.....	43
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICES.....	70
ANEXOS.....	72

INTRODUÇÃO

As primeiras imagens documentadas de indivíduos com características físicas semelhantes à síndrome de Down (SD) são de pinturas renascentistas que datam do século XIV a XVII (Berg, Korossy⁹, 2001). Entretanto, esta condição foi descrita clinicamente apenas em 1866, pelo médico John Langdon Haydon Down (Down¹⁸, 1866). Em 1959, foi feita a identificação de um cromossomo extra no par 21 em indivíduos com SD, o que fez com que esta anomalia passasse a ser conhecida também como trissomia do cromossomo 21 (Jacobs et al.²⁷, 1959; Lejeune et al.³⁵, 1959).

A SD afeta aproximadamente um indivíduo a cada 1000-1100 nascimentos, tendo como um dos fatores de risco mais significativos a idade materna avançada (OMS, 2007⁴³; Sherman et al.⁵⁰, 2007). A manifestação em forma de trissomia simples ocorre em 95% dos casos, devido a uma não disjunção cromossômica durante a primeira ou segunda divisão meiótica. Assim um dos gametas recebe dois cromossomos 21 (Polani⁴⁵, 1964). Os outros 5% dos casos somam os eventos conhecidos como Translocação Robertsoniana e Mosaicismo (Polani⁴⁵, 1964).

Indivíduos com SD possuem algumas características fenotípicas marcantes como baixa estatura, prega única palmar e clinodactilia no quinto dedo da mão (Kava et al.²⁹, 2004; Korenberg et al.³³, 1994). Em relação as características faciais, esses indivíduos apresentam linha palpebral oblíqua, prega epicântica, ponte nasal ampla e achatada e orelhas com baixa implantação (Kava et al.²⁹, 2004; Marques et al.³⁸, 2015). São também observadas alterações sistêmicas, sendo mais frequentes a hipotonia muscular (100% dos casos), deficiência imunológica (90% dos casos), anomalias cardíacas congênitas (40% dos casos), infecções respiratórias (40-60% dos casos) e risco aumentado de 12 a 40 vezes para a leucemia (Abanto et al.¹, 2011). Na cavidade bucal as manifestações mais comuns são: atresia maxilar, palato ogival, macroglossia, língua fissurada e anomalias dentárias como agenesias, microdontia, dentes conóides e alterações na cronologia e sequência de erupção dentária (Marques et al.³⁸, 2015). Além disso, a literatura mostra uma associação entre a SD e baixa prevalência de cárie dentária (Barnett et al.⁶, 1986; Davidovich et al.¹⁵, 2010; Hennequin et al.²⁵, 1999; Subramaniam et al.⁵⁵, 2014), e alta prevalência de doença periodontal, quando comparado com indivíduos não sindrômicos (Agholme et al.², 1999; Barnett et al.⁶, 1986; Kumar et al.³⁴, 2012; Reuland-Bosma⁴⁶, 2013; Reuland-Bosma, van Dick⁴⁷, 1986).

A cárie dentária é considerada uma doença multifatorial, sendo modulada pelo tipo de dieta, composição da microbiota e por hábitos inerentes ao hospedeiro, e depende do fator tempo para se desenvolver (Lima³⁶, 2007; Marsh³⁹, 1994). A lesão cariosa instala-se quando os fatores de risco sobressaem os fatores protetores, ou seja, quando a taxa de desmineralização dos tecidos duros dentários é maior do que a de remineralização (Featherstone²¹, 2008).

Estão envolvidos neste processo, dois principais grupos bacterianos, os estreptococos do grupo mutans e espécies de lactobacilos (Featherstone²¹, 2008). A partir do metabolismo de carboidratos fermentáveis, estas bactérias produzem ácidos capazes de causar uma diminuição nos valores de pH da cavidade bucal e de dissolver minerais do esmalte e dentina (Featherstone²⁰, 2000). Este processo pode ser interrompido ou revertido via remineralização, sendo a saliva de fundamental importância devido a sua composição iônica e função neutralizadora (Featherstone¹⁹, 1999).

Desta maneira, o fluxo salivar, o pH e a capacidade tampão da saliva, a contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*, bem como os hábitos de higiene bucal e frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis são alguns dos parâmetros utilizados para a avaliação do risco à cárie dentária, já que estão relacionados com o início e progressão da doença (Siqueira et al.⁵³, 2005)

Alguns estudos avaliaram os valores do pH salivar em crianças SD comparados com um grupo controle de crianças não sindrômicas (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira, Nicolau⁵², 2002; Siqueira et al.⁵³, 2005; Siqueira et al.⁵⁴, 2007). Apesar de um deles ter mostrado valores significativamente menores de pH no grupo de indivíduos SD (Siqueira, Nicolau⁵², 2002), a maioria verificou a ausência de diferença estatística significativa entre os grupos (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira et al.⁵³, 2005; Siqueira et al.⁵⁴, 2007).

A capacidade tampão e o fluxo salivar também foram avaliados em indivíduos SD. Yarat et al.⁶⁰ (1999) observaram valores de fluxo salivar significativamente diminuído no grupo SD e capacidade tampão semelhante em relação a indivíduos normais. Siqueira et al.⁵³ (2005) detectaram fluxo salivar diminuído e capacidade tampão da saliva apresentou-se significativamente maior no grupo SD. Em contrapartida, Cogulu et al.¹³ (2006) verificaram ausência de diferença estatística quando avaliaram as mesmas variáveis nos dois grupos de indivíduos.

Em relação a experiência de cárie dentária, também foram encontrados resultados controversos na literatura, quando crianças SD foram comparadas às não-sindrômicas (Cogulu et al.¹³, 2006; Davidovich et al.¹⁵, 2010; Siqueira, Nicolau⁵², 2002; Siqueira et al.⁵⁴, 2007; Yarat et al.⁶⁰, 1999). Foram observados menores valores de CPO-D e ceo-d no grupo SD em relação ao grupo controle (Cogulu et al.¹³, 2006; Davidovich et al.¹⁵, 2010), bem como ausência de diferença estatística entre os mesmos (Siqueira, Nicolau⁵², 2002; Siqueira et al.⁵⁴, 2007; Yarat et al.⁶⁰, 1999). Considerando que a cárie é uma doença multifatorial, existe a necessidade da realização de mais estudos em pacientes SD, que considerem os vários fatores envolvidos na sua instalação e desenvolvimento.

Com relação a presença de microrganismos cariogênicos Areias et al.⁴ (2012) estudando a saliva de pacientes SD e seus irmãos não sindrômicos, verificaram menor quantidade de *Streptococcus mutans* nos pacientes sindrômicos. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos na contagem de lactobacilos. Em outro estudo (Cogulu et al.¹⁴, 2006), foi observada menor prevalência de cárie no grupo de crianças com SD do que no controle não sindrômico, e ausência de diferença estatística na quantidade de *Streptococcus mutans* entre os grupos. Os autores consideraram que a menor prevalência de cárie no grupo SD pode estar relacionada à colonização por *Streptococcus mutans* com perfil genotípico menos cariogênico nesses indivíduos.

Entretanto, poucos estudos (Areias et al.⁴, 2012; Cogulu et al.¹³, 2006; Cogulu et al.¹⁴, 2006) correlacionaram os fatores salivares (pH, fluxo, capacidade tampão) com a contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*, em crianças com SD. Esta correlação é fundamental para o melhor entendimento do processo de desenvolvimento da cárie dentária nestes indivíduos, uma vez este depende de vários fatores e a prevalência da doença não pode ser explicada apenas pela presença da síndrome.

A doença periodontal é um dos problemas mais relevantes na cavidade bucal de indivíduos com SD, os acometendo ainda em idade precoce (Bagic et al.⁵, 2003; Cichon et al.¹², 1998; Modéer et al.⁴⁰, 1990). Segundo Amano et al.³ (2000) a colonização da cavidade bucal de indivíduos com SD ocorre de maneira precoce, e microrganismos relacionados a periodontite no adulto, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* já estão presentes no biofilme subgingival aos dois anos de idade nestes indivíduos. Também foi verificado o

aumento em 27% da contagem de *Porphyromonas gingivalis* a partir do quinto ano de vida nos indivíduos SD em relação ao controle não sindrômico, o que pode contribuir para o início do processo de inflamação gengival. (Amano et al.³, 2000)

Apesar do principal fator etiológico da doença periodontal ser o acúmulo de biofilme periodontopatogênico, estudos realizados por Sáxén et al.⁴⁸ (1977) e por Cichon et al.¹² (1998) tornam notória a contribuição da resposta imune deficiente para a manifestação precoce e o rápido desenvolvimento da doença periodontal nos indivíduos SD. A deficiência na quimiotaxia das células de defesa e a função de fagocitose diminuída (Izumi et al.²⁶, 1989), bem como os níveis mais elevados de imunoglobulinas do tipo IgG1 presentes na saliva desses indivíduos, contribuem para o processo inflamatório local (Barr-Agholme et al.⁷, 1998).

Alterações no sistema de defesa antioxidante também são observadas em indivíduos com SD (Kedziora, Bartosz³⁰, 1988) e está bem estabelecida sua relação com a doença periodontal (Garcez et al.²², 2005; Kim et al.³¹, 2010; Muchová et al.⁴², 2001; Sinha⁵¹, 2005; Waddington et al.⁵⁸, 2000;).

A presença de bactérias no tecido gengival induz a liberação de citocinas, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que aumentam a ativação de leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) (Diab-Ladki et al.¹⁷, 2003). Os PMNLs, por sua vez, liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^-), com o objetivo de destruir as bactérias invasoras (Canakci et al.¹⁰, 2005; Canakci et al.¹¹, 2009; Kim et al.³¹, 2010). No entanto, uma grande concentração de EROs, se não totalmente neutralizada pelo sistema de defesa antioxidante, pode causar dano oxidativo celular com degeneração de tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar (Wei et al.⁵⁹, 2010).

O dano oxidativo, resultante do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, é um processo que fatalmente ocorre nos organismos vivos, já que a produção de EROs é parte integrante do metabolismo (Vasconcelos et al.⁵⁷, 2007). No caso de uma produção exacerbada das mesmas, há ativação do sistema de defesa antioxidante, que é constituído por componentes não enzimáticos como o ácido úrico, ácido ascórbico e a glutathiona (GSH) (Waddington et al.⁵⁸, 2000) e por componentes enzimáticos como a catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), estando as duas últimas presentes,

predominantemente, em meio intracelular (Sculley et al.⁴⁹, 2002; Vasconcelos et al.⁵⁷, 2007).

A principal isoenzima da SOD é a SOD-1 (CUZnSOD), e seu gene está localizado no braço longo do cromossomo 21 (Hattori et al.²⁴, 2000). Deste modo, os indivíduos com síndrome de Down apresentam um aumento de 50% na expressão dessa enzima (De La Torre et al.¹⁶, 1996), como consequência, sua atividade pode estar aumentada em 42-47% nas células sanguíneas de indivíduos com trissomia simples (De La Torre et al.¹⁶, 1996; Garlet et al.²³, 2013). Esta enzima é responsável por converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual tem grande potencial citotóxico. Assim, a atividade aumentada da SOD-1 causa um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante, por meio da superprodução de peróxido de hidrogênio (Garcez et al.²², 2005; Pinto et al.⁴⁴, 2002). A neutralização do peróxido de hidrogênio é feita pela catalase e GPx. No entanto, a razão entre a SOD e essas enzimas está aumentada nos indivíduos com SD, o que leva a formação de uma maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que elas são capazes de neutralizar, acarretando, assim, em acúmulo deste composto (Canakci et al.¹¹, 2009; Garcez et al.²², 2005; Jovanovic et al.²⁸, 1998; Muchová et al.⁴¹, 2014).

A superprodução de peróxido de hidrogênio traz como consequência a interação com as lipoproteínas da membrana celular, causando a decomposição da mesma (peroxidação lipídica), e como um dos produtos finais tem-se o Malondialdeído (MDA), um importante indicador de danos oxidativos (Bastos et al.⁸, 2012; Canakci et al.¹¹, 2009).

Pesquisas monitorando biomarcadores do stress oxidativo na saliva e no plasma sanguíneo de indivíduos com SD, tem mostrado índices elevados destes biomarcadores (Garcez et al.²², 2005; Jovanovic et al.²⁸, 1998; Komatsu et al.³², 2013; Muchová et al.⁴², 2001; Pinto et al.⁴⁴, 2002;), semelhantes aos observados em pacientes não-sindrômicos portadores de doença periodontal (Kim et al.³¹, 2010; Liu et al.³⁷, 2014; Trivedi et al.⁵⁶, 2014; Wei et al.⁵⁹, 2010).

Assim, a melhor compreensão das alterações que ocorrem pela presença de microrganismos patogênicos e, das alterações determinadas pelo desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante em pacientes SD, ainda na infância e pré-adolescência, é importante para o desenvolvimento de terapias alternativas na prevenção e tratamento da doença periodontal nestes indivíduos.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar fatores relacionados à cárie dentária e à doença periodontal na saliva de crianças com síndrome de Down (SD) e compará-los com crianças não sindrômicas (NS).

PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

- 1) Comparar fluxo salivar, capacidade tampão e pH da saliva, bem como quantificar bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*) e periodontopatogênicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) na saliva de crianças SD e NS.
- 2) Quantificar a proteína total, a atividade das enzimas SOD e GPx, a capacidade antioxidante total (TAOC) e o nível de MDA na saliva de crianças SD e compará-las com crianças NS.

Capítulo 1

Fluxo salivar reduzido e colonização por bactérias
cariogênicas e periodontopatogênicas em crianças
com Síndrome de Down*

RESUMO

Introdução: Indivíduos com síndrome de Down (SD) podem apresentar alterações em fatores salivares que influenciam o desenvolvimento da cárie e doença periodontal. **Objetivo:** Comparar os valores de fluxo salivar, capacidade tampão e pH da saliva e quantificar bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas na saliva de crianças SD e não-sindômicas (controle). **Materiais e Métodos:** Foram selecionadas 18 crianças com SD e 23 controles, as quais tiveram os índices CPO-D/ceo-d e índice gengival (IG) avaliados. A saliva estimulada foi coletada, calculado o fluxo salivar (mL/min) e obtidos os valores de pH e a capacidade tampão salivar. A contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* na saliva foi realizada após cultivo em meios seletivos e a quantificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e Correlação de Spearman ($\alpha=0,05$). **Resultados:** O grupo SD apresentou valores reduzidos de fluxo salivar ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle. Não observou-se diferença estatística entre os grupos para as variáveis pH da saliva, capacidade tampão e quantidade de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas. Houve correlação positiva entre *Streptococcus mutans* e capacidade tampão da saliva ($r=0,489$), *Streptococcus mutans* e índices CPO-D/ceo-d ($r=0,621$) e entre *Lactobacillus spp* e índices CPO-D/ceo-d ($r=0,540$) apenas para o grupo SD. **Conclusão:** Embora não existam diferenças na quantificação de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas na saliva de crianças com síndrome de Down, o fluxo salivar reduzido pode ser um fator importante no processo de desenvolvimento da cárie e da doença periodontal precoce nesses indivíduos.

Palavras-chave: Síndrome de Down, cárie dentária, doença periodontal.

INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é causada pela trissomia do cromossomo 21 e acomete 1:1000-1100 nascidos vivos (OMS³⁷, 2007). Esta síndrome é marcadamente caracterizada por alterações sistêmicas como anomalias cardíacas congênitas, deficiência imunológica e comprometimento intelectual (Abanto et al.¹, 2011), bem como por alterações na cavidade oral, sendo comuns a macroglossia, a atresia maxilar e agenesias (Marques et al.³², 2015). Além disso, alguns autores observaram baixa prevalência de cárie dentária (Barnett et al.⁸, 1986; Davidovich et al.¹⁶, 2010; Hennequin et al.²³, 1999; Subramaniam et al.⁵¹, 2014) e alta prevalência de doença periodontal nestes indivíduos (Agholme et al.², 1999; Barnett et al.⁸, 1986; Kumar et al.²⁷, 2012; Reuland-Bosma, van Dick⁴¹, 1986; Reuland-Bosma⁴², 2013).

Classificada como doença multifatorial, a cárie dentária, se desenvolve basicamente pela associação de dieta cariogênica e presença de microrganismos cariogênicos, entre eles, os estreptococos do grupo mutans e espécies de lactobacilos, exigindo um determinado período de tempo de atuação destes sobre a estrutura dentária. Este conjunto de fatores são, ainda, modulados pela qualidade da higiene bucal, pH e capacidade tampão da saliva, presença de fluoretos, entre outros fatores (Featherstone¹⁸, 2008; Lima²⁹, 2007; Marsh³³, 1994).

Alterações na composição salivar, no pH e na capacidade tampão, bem como, na composição da microbiota podem explicar em parte a baixa prevalência desta doença em indivíduos SD (Areias et al.⁶, 2012; Cogulu et al.¹³, 2006; Davidovich et al.¹⁶, 2010). Estudos mostraram resultados conflitantes em relação aos valores de pH salivar (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002; Siqueira et al.⁴⁸, 2005; Siqueira et al.⁴⁹, 2007), capacidade tampão e fluxo salivar (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira et al.⁴⁸, 2005; Yarat et al.⁵⁶, 1999), índices CPO-D e ceo-d (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002; Siqueira et al.⁴⁹, 2007) e quantidade de microrganismos cariogênicos (Areias et al.⁶, 2012; Cogulu et al.¹⁴, 2006) na saliva de indivíduos SD comparados a indivíduos não sindrômicos, o que implica na necessidade de mais estudos.

A doença periodontal acomete indivíduos com SD de maneira severa, ainda em idade precoce (Bagic et al.⁷, 2003; Modéer et al.³⁶, 1990; Reuland-Bosma⁴², 2013) e se manifesta em aproximadamente 100% dos pacientes na faixa dos 30 anos de idade (Reuland-Bosma, van Dijk⁴¹, 1986). Sabe-se que sua ocorrência é dependente da presença de um biofilme periodontopatogênico composto por alguns

microrganismos importantes como, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* (Darveau et al.¹⁵, 1997). Mas a severidade da mesma em indivíduos SD não pode ser explicada apenas devido ao acúmulo de biofilme (Cichon et al.¹², 1998; Sáxén et al.⁴⁵, 1977).

Uma quantidade aumentada de bactérias periodontopatogênicas foi observada em indivíduos com SD (Amano et al.⁵, 2000; Khocht et al.²⁴, 2012; Martinez-Martinez et al.³⁴, 2013; Tanaka et al.⁵², 2014) e sabe-se que a colonização da cavidade bucal destes indivíduos se inicia ainda na infância (Amano et al.⁵, 2000), o que pode explicar, em parte, o desenvolvimento precoce desta doença.

Num acompanhamento clínico periodontal de adolescentes com SD por um período de 7 anos, Agholme et al.² (1999) verificaram a progressão da doença periodontal, que foi evidenciada pelo aumento do número de sítios doentes e progressão da perda óssea, entretanto, sem que houvesse alteração na microbiota periodontopatogênica.

O estudo da saliva é conveniente, pois, ela possui algumas propriedades interessantes como a capacidade de tamponamento dos ácidos produzidos por bactérias na cavidade bucal e remineralização dos tecidos dentais devido a sua composição iônica, influenciando diretamente o processo da cárie (Featherstone¹⁹, 1999). Além disso, trata-se de um fluido em contato direto e constante com os diversos microrganismos presentes na cavidade bucal e pode ser facilmente coletada, pois é um procedimento não invasivo.

Neste estudo, com a finalidade de compreender de maneira mais clara as diferenças existentes na prevalência de cárie dentária e doença periodontal entre indivíduos SD e não síndrômicos, realizamos a avaliação comparativa do fluxo salivar, capacidade tampão e pH da saliva, e a quantificação de bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*) e de bactérias periodontopatogênicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) presentes na saliva destes indivíduos.

MATERIAL E MÉTODO

1 Seleção da casuística

A aprovação para a realização deste estudo foi obtida junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, parecer

nº 491.702 (Anexo 1), e, antes do seu início foi obtido o consentimento dos responsáveis pelas instituições e escolas.

Os pacientes para este estudo foram selecionados em instituições e escolas para crianças especiais da cidade de Araraquara e região e na Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr - UNESP), após avaliação do histórico médico e odontológico.

Foram selecionadas 18 crianças com síndrome de Down (Grupo SD) e 23 não sindrômicas (Grupo controle), de ambos os gêneros e qualquer etnia, dentro da faixa etária de 6-15 anos de idade, com incisivos centrais e primeiros molares permanentes irrompidos e apresentando bom estado de saúde geral. Não foram incluídas neste estudo crianças que fizeram uso de medicamentos com capacidade de alterar a secreção salivar (anticolinérgicos, neurolépticos, benzodiazepínicos, etc) antibióticos e/ou imunossupressores e antioxidantes nos últimos 3 meses, com histórico de radiação de cabeça e pescoço, com comportamento não colaborador durante a coleta de saliva e indivíduos SD do tipo mosaico. Os objetivos da pesquisa foram explicados aos pais e responsáveis e foi obtida a sua assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

2 Índice CPO-D e ceo-d

Os voluntários, previamente à coleta de saliva, passaram por exame clínico intraoral realizado de acordo com os critérios da OMS (Organização Mundial de Saúde, 2013)³⁸ (Anexo 2), por um examinador calibrado (Kappa=0,97), com a ajuda de um auxiliar para registrar os dados. O objetivo deste exame foi a quantificação dos dentes permanentes em cariados, perdidos e obturados (índice CPO-D) e dos dentes decíduos em cariados, com extração indicada e obturados (índice ceo-d).

O exame clínico intraoral foi realizado utilizando espelho bucal plano e sonda exploradora nº 5 (Duflex - SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em ambiente com boa iluminação, após a escovação profissional, lavagem e secagem prévia dos elementos dentários (Castilho, Marta¹¹, 2010; Cogulu et al.¹³, 2006).

3 Índice Gengival (IG)

O IG foi realizado por um examinador calibrado (Kappa=0,98), utilizando-se sonda milimetrada Williams e espelho bucal plano, de acordo com a metodologia proposta por Løe³¹, 1967:

- Grau 0: Gengiva Normal - gengiva firme, de coloração rósea ou rosa pálido e superfície opaca, com margens finas e grau variado de ponteados.
- Grau 1: Inflamação Suave - margem gengival com ligeira mudança de coloração (avermelhada ou vermelho/azulada) e levemente edemaciada. Sem sangramento à sondagem.
- Grau 2: Inflamação Moderada - gengiva edemaciada (margem arredondada), brilhante e avermelhada ou vermelho/azulada. Há sangramento à sondagem.
- Grau 3: Inflamação Severa - gengiva marcadamente vermelha ou vermelha/azulada, edemaciada e aumentada com ulcerações. Tendência ao sangramento espontâneo.

A avaliação foi realizada apenas nos primeiros molares superiores e inferiores e incisivos centrais superiores e inferiores permanentes, tomando-se o cuidado de em dentes recém-erupcionados considerar a condição imatura do tecido gengival em relação ao acúmulo de placa e grau de inflamação (Franchini et al.²⁰, 2011).

4 Coleta da Saliva

A saliva estimulada, pela mastigação de um pedaço de *Parafilm*, foi coletada entre 9 e 11 horas da manhã, após um período de jejum mínimo de 2 horas. A saliva produzida no primeiro minuto foi descartada e, então, seguiu-se a coleta utilizando sugador portátil a vácuo (Aspiramax modelo MA520-60, São Paulo, SP, Brasil), adaptado a uma sonda e tubo coletor mantido em gelo (Siqueira et al.⁴⁸, 2005). No próprio local de coleta foram realizadas as avaliações de fluxo salivar, pH e capacidade tampão. Em seguida, a saliva mantida no gelo, foi transportada para o laboratório num tempo de até 60 minutos, para a realização da cultura para contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* Aproximadamente 200µl de saliva foram armazenados em freezer -80°C para análises dos microrganismos periodontopatogênicos pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

5 Fluxo Salivar, pH e Capacidade Tampão da Saliva

Após o término da coleta foi realizado o cálculo do fluxo salivar (mL/min), pela razão entre o volume de saliva coletado e o tempo de coleta.

O pH salivar foi aferido utilizando-se pHmetro portátil digital (Qualxtron modelo 8010, São Paulo, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções padrão de pH 7,0 e 4,0.

A capacidade tampão da saliva total foi determinada pela metodologia proposta por Ericson, Bratthall¹⁷ (1989), com uma pequena modificação para volumes menores (Tulunoglu et al.⁵³, 2006). Em 0,5 mL de saliva foram adicionados 1,5 mL de HCl 0,005 mol/L (Synth[®] - Diadema, SP, Brasil). Após a homogeneização foi realizada uma nova leitura do valor do pH (pH_f) e então a capacidade tampão salivar foi classificada como baixa ($pH_f \leq 4,0$), intermediária ($pH_f 4,1 - 5,5$) ou alta ($pH_f \geq 5,6$) (Ericson, Bratthall¹⁷, 1989).

6 Análise Microbiológica de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*

As amostras de saliva foram agitadas por 60 segundos em vortex e diluídas em série decimal em solução de tampão fosfato (PBS: NaCl 0,138 M, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Em seguida foram inoculadas em duplicata, em Ágar Mitis Salivarius (Hi Media Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia), contendo 0,25 U/mL de Bacitracina e 20% de Sacarose para análise de *Streptococcus mutans* (15 μ l da diluição/gota) e em Ágar Rogosa (Hi Media Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) para análise de *Lactobacillus spp* (100 μ L da diluição/placa).

As placas para cultura de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia por 48 h. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix Indústria de Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil). No caso de dúvida na identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans foi feito um esfregaço, corado pelo método de Gram, para observação das características morfotintoriais ao microscópio óptico (Olympus, São Paulo, SP, Brasil) com objetiva de imersão (100x). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva (UFC/mL).

7 Análise Microbiológica de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

Extração do DNA bacteriano

As amostras de saliva previamente armazenadas em freezer -80°C, foram descongeladas e tiveram seu DNA genômico extraído e purificado utilizando-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA, Madison, WI, EUA). A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria de luz UV (Biomate 3 – Thermo

Electron Corporation, Winconsin, EUA) a 260 nm, e a relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm (A260/280), foi considerada adequada entre 1,8-2,0.

Este DNA foi utilizado como molde para a quantificação dos microrganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pela qPCR.

Quantificação Absoluta por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a quantificação absoluta, inicialmente foram construídos padrões de plasmídeos recombinantes albergando uma cópia do gene 16SrRNA de amostras de referência de *Porphyromonas gingivalis* W83, *Tannerella forsythia* ATCC 43037 e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2. As bactérias alvo foram cultivadas em meios específicos, em anaerobiose. Em seguida, as colônias foram resuspensas em água estéril e o DNA foi extraído.

Para a reação de amplificação foi utilizada Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Foi usado DNA molde das amostras de referência, e os iniciadores espécie específicos complementares a 16SrRNA de *Porphyromonas gingivalis* (5' TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC 3' e 5' ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3') (Amano et al.³, 1999), *Tannerella forsythia* (5' GCGTATGTAACCTGCCCGCA 3' e 5' TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT 3') e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (5' GAACCTTACCTACTCTTGACATCCGAA 3' e 3' TGCAGCACCTGTCTCAAAGC 5') (Ramseier et al.⁴⁰, 2009) , originando produtos de 197 pb, 641 pb e 80 pb respectivamente (Boutaga et al.¹⁰, 2005; Kuboniwa et al.²⁵, 2004). Os amplicons gerados foram clonados utilizando o kit TOPO TA Cloning version R (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmação da identidade, os insertos foram sequenciados utilizando iniciadores existentes no vetor (M13 Reverse: CAG GAA ACA GCT ATG AC).

A quantificação de cada espécie nas amostras estudadas foi realizada por meio de qPCR em reações usando os mesmos pares de primers complementares a 16SrRNA de cada espécie bacteriana, utilizando o termociclador SDS 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Os produtos foram detectados por fluorescência usando o SYBR Green Power Kit (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A quantificação foi feita de forma absoluta por meio da realização em cada placa de uma curva padrão usando diluições

seriadas com 5 concentrações conhecidas do DNA molde da bactéria de referência e um controle negativo (água em lugar de DNA), em triplicata.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, usando um volume total de 22 µl em cada poço, sendo 1µl de DNA da amostra (ou do padrão ou do controle negativo), 11µl de SYBR Green mix e 100 nM de primer Reverse e primer Forward para *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Foi adotado o seguinte protocolo térmico: 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s, anelamento a 60°C durante 1 min e extensão a 95°C durante 15 s.

A análise da curva de melting foi realizada a 65-95°C para confirmar que os produtos de PCR das amostras e dos plasmídeos de referência (padrões) apresentavam curvas de melting idênticas.

Os resultados das corridas foram analisados com auxílio do software SDS 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), de modo que a quantidade de bactérias em cada amostra foi obtida em função da curva padrão do referido microrganismo. As curvas padrão utilizadas apresentaram valor mínimo de R²= 0,90 e eficiência de amplificação entre 90% e 110%. Os resultados foram expressos em números de cópias do gene 16SrRNA (Tanaka et al.⁵², 2014).

8 Análise Estatística

Como a amostra que compõe este estudo é pequena e o desvio padrão é grande, testes estatísticos não-paramétricos foram utilizados para realizar a inferência estatística. Portanto, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar as diferenças entre os grupos estudados e a Correlação de Spearman para testar a correlação entre as variáveis. Foi adotado nível de significância igual a 5%.

RESULTADO

Um total de 78 crianças foram examinadas, sendo 43 não-sindrômicas e 35 com SD. Entre as não-sindrômicas, 13 se recusaram a assinar o TCLE ou desistiram de participar previamente a coleta da saliva e 7 não se enquadraram nos critérios de inclusão. No grupo SD, 8 não se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo, 2 se recusaram a participar, 2 desistiram e 5 não colaboraram durante o exame clínico e coleta de saliva. Portanto, 41 crianças foram alocadas em dois grupos de acordo

com sua condição genética: 23 crianças no grupo controle (14 do gênero feminino/9 do gênero masculino, com idade média de 9,6 anos; variando de 7-12 anos) e 18 crianças SD (10 do gênero feminino / 8 do gênero masculino, com idade média de 10,3 anos; variando de 6-15 anos).

A comparação entre as variáveis clínicas, índices CPO-D/ceo-d, dentes cariados (componentes C+c dos índices CPO-D/ceo-d), IG, pH, fluxo e capacidade tampão salivar estão apresentadas na Figura 1. As análises pelo teste de Mann-Whitney apontaram diferença estatística significativa entre os grupos apenas para o número de dentes cariados ($p=0,031$) e para o fluxo salivar ($p<0,0001$), sendo estes valores mais elevados no grupo controle.

O grupo SD apresentou valores mais elevados de UFC/mL para os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* quando comparado ao grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 1). O mesmo foi verificado em relação aos microrganismos periodontais, não havendo diferença estatística significativa nas contagens de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, entre os grupos estudados (Tabela 2).

Figura 1 – (A) Índice CPO-D/ceo-d (mediana , min-max); (B) Dentes cariados (componentes C+c dos índices CPO-D e ceo-d, respectivamente) (mediana, min-max); (C) Índice Gengival (mediana, min-max), sendo: grau 0 = gengiva normal, grau 1 = inflamação leve, grau 2 = inflamação moderada e grau 3 = inflamação severa; (D) pH salivar inicial (média \pm DP); (E) Fluxo Salivar (mL/min) (média \pm DP) e (F) Capacidade tampão da saliva (mediana, min-max), sendo: 1 = baixa ($\text{pH}_i \leq 4,0$), 2= intermediária ($4,1 \leq \text{pH}_i \leq 5,5$) e 3 = alta ($\text{pH}_i \geq 5,6$). Colunas representam as medianas ou as médias, e barras de erros representam os valores mínimo e máximo ou o desvio padrão de acordo com cada uma das variáveis analisadas. SD= síndrome de Down. Valor de $p < 0,05$ denota diferença estatisticamente significativa.

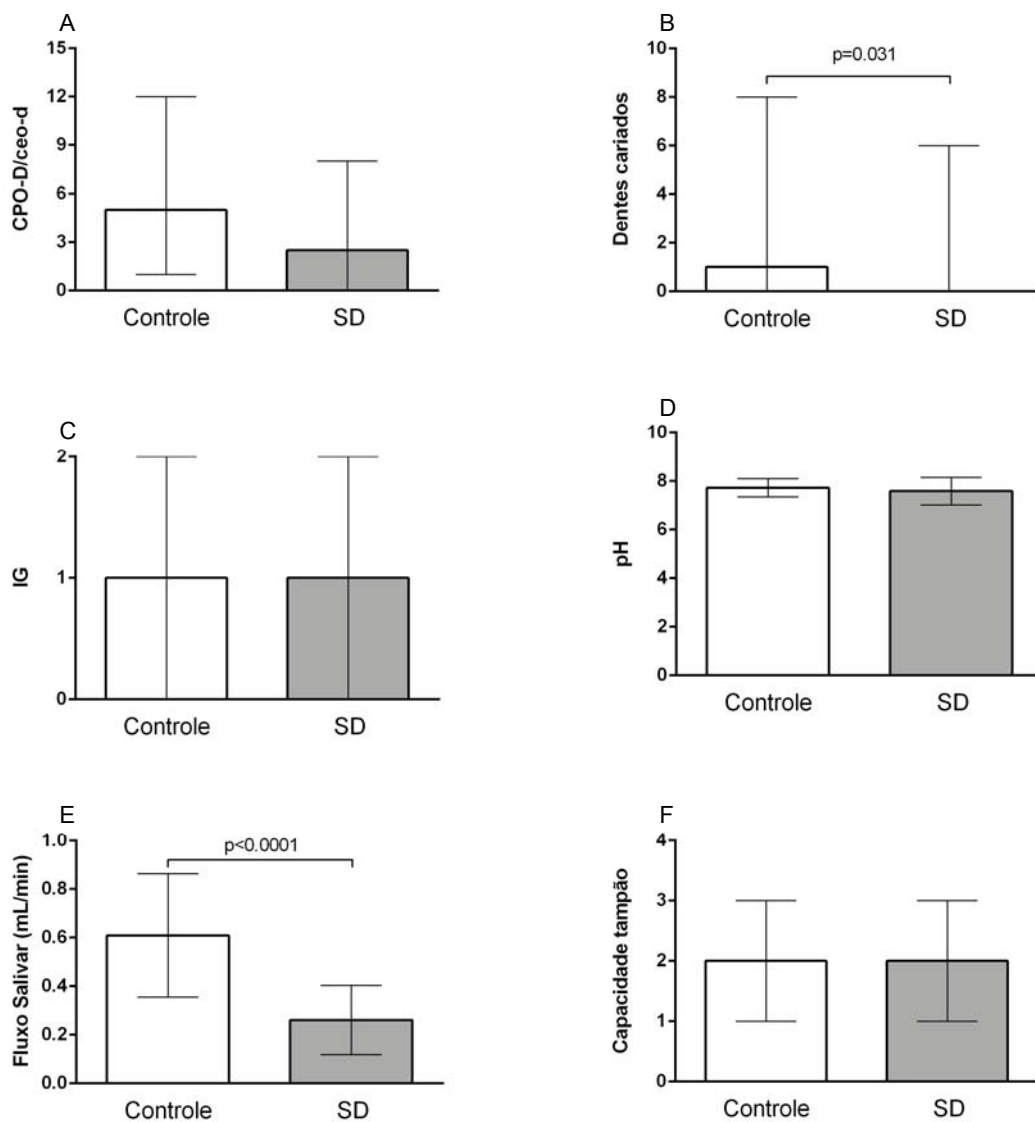


Tabela 1 – Número de UFC/mL (mediana; min-max) dos microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* nas amostras de saliva de acordo com o grupo

UFC/mL	Grupos		valor de p*
	SD	Controle	
<i>S. mutans</i>	2,63x10 ⁶ (2,40x10 ⁵ -7,93x10 ⁹)	3,33 x 10 ⁶ (5,53x10 ⁴ -6,00x10 ⁸)	0,682
<i>Lactobacillus spp</i>	1,81x10 ⁴ (0,00-2,93x10 ⁷)	1,74x10 ⁴ (0,00-1,72x10 ⁶)	0,901

valor de p* = Mann-Whitney para comparação entre os pacientes com SD e Controle.
SD=Síndrome de Down

Tabela 2 - Cópias do gene *16SrRNA* de microrganismos periodontopatogênicos (mediana; min-max) em amostras de saliva de acordo com o grupo

Cópias de <i>16SrRNA</i>	Grupos		valor de p*
	SD	Controle	
<i>P. gingivalis</i>	1505 (129,3-4,535x10 ⁷)	1939 (144,4-4,440x10 ⁶)	0,918
<i>T. forsythia</i>	8725 (31,14-1,013x10 ¹⁰)	718,1 (99,05-7,685x10 ⁸)	0,538
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	122,5 (20,76-678337)	161,7 (4,57- 711531)	0,624

valor de p* = Mann-Whitney para comparação entre os pacientes com SD e Controle.
SD=Síndrome de Down

O coeficiente de correlação de Spearman apontou correlação positiva estatisticamente significativa entre *Streptococcus mutans* e a capacidade tampão da saliva ($r=0,489$ e $p=0.039$), *Streptococcus mutans* e os índices CPO-D/ceo-d ($r=0,621$ e $p=0.006$) e entre *Streptococcus mutans* e o número de dentes cariados ($r=0,620$ e $p=0.006$) apenas para o grupo SD. Para os *Lactobacillus spp* houve correlação positiva apenas com os índices CPO-D/ceo-d ($r=0,540$ e $p=0.020$) também no grupo SD. Para os microrganismos periodontopatogênicos avaliou-se a correlação apenas com as variáveis IG e fluxo salivar, porém não houve correlação significativa para ambos os grupos (SD e Controle).

DISCUSSÃO

Muitas alterações na cavidade bucal de indivíduos com SD são descritas na literatura, dentre elas, a baixa prevalência de carie dentária (Barnett et al.⁸, 1986; Davidovich et al.¹⁶, 2010; Hennequin et al.²², 1999; Subramaniam et al.⁵¹, 2014). Vários estudos buscaram investigar este evento, relacionando-o com os fatores salivares destes indivíduos, porém esta questão ainda não encontra-se totalmente elucidada devido à resultados conflitantes observados (Areias et al.⁶, 2012; Cogulu et al.¹³, 2006; Cogulu et al.¹⁴, 2006; Davidovich et al.¹⁶, 2010; Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002; Siqueira et al., 2005⁴⁸; Siqueira et al.⁴⁹, 2007; Yarat et al.⁵⁶, 1999).

No presente estudo, foram investigados alguns parâmetros relacionados ao desenvolvimento da cárie dentária como fluxo salivar, pH e capacidade tampão da saliva, e também, a presença de microrganismos cariogênicos na saliva de crianças com SD, e compará-las com crianças não sindrômicas.

A experiência de cárie foi avaliada pelos índices CPO-D/ceo-d, não sendo observada diferença significativa entre os grupos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos (Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002; Siqueira et al.⁴⁹, 2007; Yarat et al.⁵⁶, 1999), muito embora haja resultados controversos na literatura (Cogulu et al.¹³, 2006; Davidovich et al.¹⁶, 2010; Orner³⁹, 1975). Diferença significativa foi observada apenas quando se comparou o componente dentes cariados dos índices CPO-D/ceo-d, sendo o número de dentes cariados significativamente maior no grupo controle ($p=0,031$). Isto pode indicar que, em nossa amostra, as crianças do grupo SD buscaram tratamento odontológico mais cedo, porém foi evidenciado que elas apresentavam experiência de cárie similar àquela apresentada pelas crianças não sindrômicas.

Neste estudo verificamos uma diminuição significativa do fluxo salivar nas crianças com SD ($p<0,0001$), o que condiz com os resultados apresentados pela literatura (Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002; Siqueira et al.⁴⁸, 2005; Siqueira et al.⁴⁹, 2007; Yarat et al.⁵⁶, 1999). O fato de as crianças com SD apresentarem fluxo salivar diminuído pode ser visto como um fator de risco para o desenvolvimento da cárie, já que influencia diretamente o processo de remoção de açúcares da cavidade bucal. Apesar disso, vários trabalhos mostram menor prevalência de cárie nos indivíduos com SD (Barnett et al.⁸, 1986; Davidovich et al.¹⁶, 2010; Hennequin et al.²², 1999). Como as crianças com SD deste estudo apresentaram experiência de cárie

semelhante às não sindrômicas, não foi possível relacionar a redução do fluxo salivar com a ocorrência de cárie dentária.

Embora, valores diminuídos de pH salivar (Siqueira, Nicolau⁴⁶, 2002) e capacidade tampão da saliva aumentada (Siqueira et al.⁴⁸, 2005) em crianças com SD tenham sido reportados na literatura, a maioria dos trabalhos (Cogulu et al.¹³, 2006; Siqueira et al.⁴⁸, 2005; Siqueira et al.⁴⁹, 2007; Yarat et al.⁵⁶, 1999), observaram, como neste estudo, ausência de diferença estatística entre os valores de pH e capacidade tampão da saliva para os grupos SD e controle. Esses resultados reforçam a ausência de diferença com relação a experiência de cárie entre os grupos, SD e controle, observada neste estudo.

A composição eletrolítica da saliva também pode interferir no processo de cárie. Assim, vários trabalhos a estudaram em indivíduos SD, e foi verificado uma maior concentração de íons como sódio (Siqueira et al.⁴⁷, 2004; Winer et al.⁵⁵, 1965), bicarbonato (Winer et al.⁵⁵, 1965), cloreto (Davidovich et al.¹⁶, 2010) e potássio (Jara et al.²³, 1991). Esses dados sugerem uma alteração no metabolismo do ducto e/ou ácinos das glândulas salivares destes indivíduos. Além dos fatores salivares (fluxo, pH, composição eletrolítica e capacidade tampão), a quantidade de microrganismos cariogênicos, como, *Streptococcus mutans* e os lactobacilos, presentes na cavidade bucal do hospedeiro, também influenciam no processo de cárie. Alguns trabalhos verificaram uma maior quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes SD (Linossier et al.³⁰, 2008; Mathias et al.³⁵, 2011). Por outro lado, segundo Areais et al.⁶ (2012), a menor quantidade de *Streptococcus mutans* encontrado na saliva de crianças com SD poderia explicar, em parte, a baixa prevalência de cárie em detrimento à hipossalivação. Neste mesmo trabalho, nenhuma diferença na quantidade de lactobacilos foi observada.

No presente estudo, apesar de ter sido observado maior número de dentes cariados no grupo controle, houve ausência de diferença estatística entre os grupos SD e controle para as contagens de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. Estes resultados estão em concordância com os obtidos nos estudos de Cogulu et al.¹⁴ (2006) e Stabholz et al.⁵⁰ (1991). De acordo com Cogulu et al.¹⁴ (2006), a superexpressão da enzima superóxido dismutase (SOD) nos indivíduos SD pode justificar a baixa incidência de cárie por determinar uma maior diversidade nos genótipos de *Streptococcus mutans* da cavidade bucal e consequentemente cepas menos cariogênicas podem estar presentes.

Uma das doenças que mais acomete a cavidade bucal de indivíduos SD de maneira precoce e severa é a doença periodontal (Barnett et al.⁸, 1986). A presença de microrganismos periodontopatogênicos é mandatória para que haja o desenvolvimento e progressão da doença (Darveau et al.¹⁵, 1997). Alguns trabalhos, mostraram ser possível a identificação de microrganismos periodontopatogênicos em amostras de saliva (Kulekci et al.²⁶, 2007; Sakai et al.⁴³, 2007; Umeda et al.⁵⁴, 1998), tratando-se de uma opção menos invasiva, de menor custo, coleta rápida, simples e bem aceita entre pacientes pediátricos (Kulekci et al.²⁶, 2007).

O qPCR foi a metodologia empregada neste estudo, já que trata-se de uma técnica bastante sensível, a qual permite a identificação de bactérias de interesse como, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Lau et al.²⁸, 2004) mesmo que estas estejam presentes em pequena quantidade. Nossos resultados mostram que as bactérias alvo foram detectadas nas amostras de saliva de ambos os grupos, porém não houve diferença significativa entre as quantidades observadas. De acordo com Umeda et al.⁵⁴ (1998), a utilização de amostras de saliva para análise de periodontopatógenos pode subestimar a presença de *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* comparadas ao biofilme subgengival. Estudos realizados em amostras de placa subgengival de pacientes com SD, tem demonstrado maior quantidade estatisticamente significativa de diversas espécies relacionadas a doença periodontal quando comparado com indivíduos não sindrômicos (Amano et al.⁴, 2001; Amano et al.⁵, 2000; Martinez-Martinez et al.³⁴, 2013), porém utilizaram para a análise a metodologia de PCR convencional. Tanaka et al.⁵² (2014), utilizando PCR quantitativo em tempo real, também observaram maior quantidade de *Porphyromonas gingivalis* no fluido gengival de sítios sadios de pacientes com SD comparados com o controle não sindrômico.

As bactérias *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* constituem o chamado complexo vermelho e estão fortemente associadas a periodontite crônica, além de serem as principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença periodontal em indivíduos SD (Martinez-Martinez et al.³⁴, 2013). Estas espécies foram encontradas em quantidades significativamente maiores em crianças com SD (Amano et al.⁵, 2000), sugerindo que a colonização da cavidade bucal por microrganismos periodontopatogênicos em indivíduos com SD ocorre ainda na infância (Amano et al.⁴, 2001; Amano et al.⁵, 2000; Sakellari et al.⁴⁴,

2005). A quantidade desses microrganismos aumenta com o avanço da idade e a alteração na composição do biofilme dental pode contribuir para o início precoce da doença periodontal (Amano et al.⁵, 2000).

A associação entre o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e o desenvolvimento de periodontite agressiva está bem estabelecida (Haubek et al.²¹, 2004). Esta espécie bacteriana foi identificada em crianças com SD com idade entre 2-4 anos (Amano et al.⁵, 2000), no entanto, não foi verificada diferença estatística entre a quantidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre os grupos SD e controle, não sendo comprovada a associação desta bactéria com o desenvolvimento da periodontite nestes indivíduos (Amano et al.⁴, 2001).

Embora não se tenha identificado uma bactéria específica envolvida no estabelecimento da doença periodontal nos indivíduos com SD, de acordo com Martinez-Martinez et al.³⁴ (2013), a *Porphyromonas gingivalis* desempenha um papel de maior importância no seu desenvolvimento do que o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mas a presença deste pode estar relacionada com a maior severidade da doença.

No presente estudo, o IG apresentou-se semelhante nos grupos SD e controle. O índice de sangramento gengival (ISG%) é utilizado como alternativa ao IG, já que tem a mesma finalidade, a de verificar inflamação marginal gengival (Agholme et al.², 1999; Barr-Agholme et al.⁹, 1998; Modéer et al.³⁶, 1990).

Em estudos onde o ISG% ou o IG foram usados como variável de análise, os resultados se mostraram contraditórios, indo desde um índice ISG% significativamente maior nos pacientes com SD (Barr-Agholme et al.⁹, 1998; Modéer et al.³⁶, 1990) até ausência de diferença estatística entre os valores de IG de crianças com SD comparadas ao grupo controle (Amano et al.⁴, 2001; Amano et al.⁵, 2000). No trabalho de Agholme et al.² (1999), foi realizado um acompanhamento clínico periodontal de pacientes SD e verificou-se uma frequência maior de periodontite localizada na região de incisivos inferiores, a qual progrediu marcadamente ao final de um acompanhamento de 7 anos.

Além do IG, outros parâmetros como profundidade à sondagem e perda óssea são utilizados para compor o exame clínico periodontal (Bagic et al.⁷, 2003; Chicon et al.¹², 1998; Modéer et al.³⁶, 1990). Desta maneira, constatou-se que os pacientes com SD apresentam profundidade de bolsas periodontais (Bagic et al.⁷,

2003) e perda óssea alveolar (Agholme et al.²,1999; Modéer et al.³⁶, 1990) significativamente maiores do que pacientes controle na mesma faixa etária.

Neste trabalho, o tamanho da amostra e o tipo de material biológico utilizado (saliva) podem ser considerados fatores limitantes na obtenção de resultados mais expressivos para os fatores salivares e bacterianos envolvidos no processo de cárie e na doença periodontal que pudessem diferenciar pacientes SD de pacientes não sindrômicos (controle). Contudo, a amostra relativamente pequena pode ser justificada pela dificuldade em se obter o consentimento dos pais ou responsáveis e, devido aos critérios de inclusão e exclusão do estudo, principalmente àqueles que remetem ao uso de medicamentos. A saliva foi utilizada para realizar a análise dos microrganismos periodontopatogênicos, porém uma maior concentração destes é encontrada em amostras de fluido gengival e placa subgengival o que também pode ter contribuído para os resultados estatisticamente não significantes obtidos neste estudo.

Apesar dessas limitações, os resultados deste trabalho tem uma contribuição importante para o esclarecimento das condições envolvidas no desenvolvimento da cárie dentária e da doença periodontal em pacientes com SD. Além disso, o fato de o número de microrganismos ter sido semelhante nos dois grupos, não significa que, eles tenham o mesmo potencial para desencadear a doença. Portanto, outros trabalhos devem ser realizados no sentido de avaliar as diferenças nos perfis genômicos desses microrganismos e as diferenças na sua patogenicidade em indivíduos SD e não sindrômicos, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias preventivas e novos tratamentos que possam colaborar com a melhora da saúde bucal desta população.

REFERÊNCIAS

1. Abanto J, Ciamponi AL, Francischini E, Murakami C, de Rezende NP, Gallottini M. Medical problems and oral care of patients with Down syndrome: a literature review. *Spec Care Dentist*. 2011; 31(6): 197-203.
2. Agholme MB, Dahllöf G, Modéer T. Changes of periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-year period. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107(2): 82-8.

3. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol.* 2001; 72(3): 368-73.
4. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol.* 2000; 71(2): 249-55.
5. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5): 1426-30.
6. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira Mde L, Azevedo A, Melo P, Andrade C, et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; 67(9): 1007-11.
7. Bagic I, Verzak Z, Cukovic-Cavka S, Brkic H, Susic M. Periodontal Conditions in Individuals with Down's Syndrome. *Coll Antropol.* 2003; 27 Suppl 2: 75-82.
8. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol.* 1986; 57(5): 288-93.
9. Barr-Agholme M, Dahllof G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol.* 1998; 69(10): 1119-23.
10. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 45(2): 191-9.
11. Castilho ARF, Marta SN. Avaliação da incidência de cárie em pacientes com síndrome de Down após sua inserção em um programa preventivo. *Cien Saude Colet.* 2010; 15 Suppl 2: 3249-53.
12. Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome--clinical interventional study. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 370-80.
13. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1): 23-8.

14. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. Arch Oral Biol. 2006; 51(3): 177-82.
15. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000. 1997; 14: 12-32.
16. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children. Int J Paediatr Dent. 2010; 20(4): 235-41.
17. Ericson D, Bratthall D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. Scand J Dent Res. 1989;97(5): 405-7.
18. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. Aust Dent J. 2008; 53(3): 286-91.
19. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol. 1999; 27(1): 31-40.
20. Franchini R, Petri A, Migliario M, Rimondini L. Poor oral hygiene and gingivitis are associated with obesity and overweight status in paediatric subjects. J Clin Periodontol. 2011; 38(11): 1021-8.
21. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. J Dent Res. 2004; 83(10): 767-70.
22. Hennequin M, Faulks D, Veyrune JL, Bourdiol P. Significance of oral health in persons with Down syndrome: a literature review. Dev Med Child Neurol. 1999; 41(4): 275-83.
23. Jara L, Ondarza A, Blanco R, Rivera L. Composition of the parotid saliva in Chilean children with Down's syndrome. Arch Biol Med Exp (Santiago). 1991; 24(1): 57-60.
24. Khocht A, Yaskell T, Janal M, Turner BF, Rams TE, Haffajee AD, et al. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. J Periodontal Res. 2012; 47(4): 500-7.
25. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19(3): 168-76.

26. Kulekci G, Leblebicioglu B, Keskin F, Ciftci S, Badur S. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. *Anaerobe*. 2008; 14(1): 49-54.
27. Kumar A, Masamatti SS, Viridi MS. Periodontal diseases in children and adolescents: a clinician's perspective part 2. *Dent Update*. 2012; 39(9): 639-42, 645-6, 649-52.
28. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(12): 1061-9.
29. Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2007; 12(6): 119-30.
30. Linossier AG, Valenzuela CY, Toledo H. Differences of the oral colonization by *Streptococcus* of the mutans group in children and adolescents with Down syndrome, mental retardation and normal controls. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(9): E536-9.
31. Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol*. 1967; 38(6): 610-6.
32. Marques LS, Alcântara CE, Pereira LJ, Ramos-Jorge ML. Down syndrome: a risk factor for malocclusion severity? *Braz Oral Res*. 2015; 29(1) : 1-7.
33. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263-71.
34. Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Bonilla-Garro SE, Patiño-Marin N, Haubek D, Amano A, et al. Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. *J Clin Pediatr Dent*. 2013; 37(3): 289-95.
35. Mathias MF, Simionato MR, Guaré RO. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent*. 2011; 12(1): 37-42.
36. Modéer T, Barr M, Dahllöf G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res*. 1990; 98(3): 228-34.

37. Organização Mundial da Saúde. Down syndrome. Genes and human diseases. World Health Organization; 2007. [Disponível no site: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/print.html>. Acesso em 12 de abril 2015].
38. Organização Mundial de Saúde. Levantamento epidemiológico básico de saúde bucal: manual de instruções. 5.ed. França: OMS; 2013.
39. Orner G. Dental caries experience among children with Down's syndrome and their sibs. *Arch Oral Biol.* 1975; 20(10): 627-34.
40. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2009; 80(3): 436-46.
41. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(1): 64-73.
42. Reuland-Bosma W. Dissertations 25 years after date 35. Periodontal disease in Down syndrome: an immunological disorder. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2013;120(10) : 541-5.
43. Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *Int J Paediatr Dent.* 2007; 17(3): 192-9.
44. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6): 684-90.
45. Saxén L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome: an orthopantomographic evaluation. *J Periodontol.* 1977; 48(6): 337-40.
46. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down Syndrome. *Special Care Dentist.* 2002; 22(6): 226-30.
47. Siqueira WL, de Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau J. Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(1): 76-9.

48. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest*. 2005; 9(1): 26–9.
49. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2007; 27(5): 202-5.
50. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*. 1991; 11(5): 203-8.
51. Subramaniam P, Girish Babu K, Mohan Das L. Assessment of salivary total antioxidant levels and oral health status in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2014; 34(4): 193-200.
52. Tanaka MH, Rodrigues TO, Finoti LS, Teixeira SR, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM, et al. The effect of conventional mechanical periodontal treatment on red complex microorganisms and clinical parameters in Down syndrome periodontitis patients: a pilot study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; [Epub 2014 Nov 4].
53. Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidants levels of saliva in children related to caries, age and gender. *Int J Paediatr Dent*. 2006; 16(3): 186-91.
54. Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1998; 69(7): 828-33.
55. Winer RA, Cohen M, Feller RP, Chauncey HH. Composition of human saliva, parotid gland secretory rate, and electrolyte concentration in mentally subnormal persons. *J Dent Res*. 1965; 44(4): 632-4.
56. Yarat A, Akyüz S, Koc L, Erdem H, Emekli N. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. *J Dent*. 1999; 27(2): 115-8.

Capítulo 2

Fatores salivares e marcadores do estresse oxidativo na saliva total de crianças com síndrome de Down*

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas ABNT. Disponível no site: [http:// www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual](http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual)

RESUMO

Introdução: A alta prevalência de doença periodontal nos indivíduos com síndrome de Down (SD) pode estar relacionada com um desequilíbrio do sistema antioxidante e níveis elevados de estresse oxidativo. **Objetivo:** Quantificar a proteína total, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), a capacidade antioxidante total (TAOC) e o nível de Malondialdeído (MDA) na saliva de crianças SD e compará-las com crianças não sindrômicas (controle). **Materiais e Métodos:** Foram selecionadas 41 crianças com índice gengival (IG) semelhante, sendo 18 com SD e 23 controle. A saliva total estimulada foi coletada em tubos mantidos em gelo, centrifugada e congelada a -80°C até a realização das análises. A proteína total, atividade da SOD e GPx e a TAOC foram quantificadas por espectrofotometria. O nível de MDA foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para comparação entre os grupos e correlação entre as variáveis foram aplicados o teste de Mann-Whitney e a Correlação de Spearman, respectivamente, adotando-se nível de significância de 5%. **Resultados:** A dosagem de PT ($p < 0,0001$), a atividade da SOD ($p = 0,0002$) e o nível de MDA ($p = 0,0016$) foram maiores na saliva do grupo SD. Não houve diferença significativa entre os grupos para TAOC e atividade da GPx. Correlação positiva moderada foi observada entre proteína total e IG ($r = 0,491$), e, negativa moderada entre SOD e fluxo salivar ($r = -0,475$), apenas no grupo SD. **Conclusão:** A maior atividade da SOD e os níveis elevados de MDA na saliva evidenciam a influência significativa do estresse oxidativo no desenvolvimento da doença periodontal precoce nos indivíduos SD.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, antioxidantes, saliva.

INTRODUÇÃO

Os radicais livres são moléculas instáveis caracterizadas por apresentarem um desemparelhamento de um ou mais elétrons na última camada, tornando esta espécie extremamente reativa em busca de estabilidade (Guetens et al.¹⁶, 2002). Quando originados do metabolismo do oxigênio, os radicais livres, são conhecidos por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais participam de reações fisiológicas, além de atuarem na regulação do tônus muscular e agirem como agentes tóxicos a microrganismos, fungos, parasitas e células neoplásicas (Dahiya et al.⁸, 2013; Dröge¹², 2002;).

O metabolismo celular aeróbio é vital para a sobrevivência humana, sendo a produção de EROs (entre elas: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^-)) fisiológica (Dahiya et al.⁸, 2013; Vasconcelos et al.⁵⁰, 2007). Porém, sua presença em excesso provoca injúrias graves a componentes celulares e teciduais, como lipídios, proteínas e DNA, alterando a estrutura e a função do organismo (Dahiya et al.⁸, 2013; Dröge¹², 2002).

Desta maneira, para manter a homeostase tecidual, existe o sistema de defesa antioxidante, composto por uma parte não enzimática representada pelo ácido úrico, ácido ascórbico e a glutathione (GSH) (Waddington et al.⁵¹, 2000) e por uma parte enzimática composta pela catalase, glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (Sculley, Langley-Evans³⁹, 2002; Vasconcelos et al.⁵⁰, 2007).

O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante e ocorre quando há produção exacerbada de EROs associada ou não a sua neutralização insuficiente pelo sistema de defesa antioxidante (Dröge¹², 2002; Muchová et al.²⁸, 2014; Vasconcelos et al.⁵⁰, 2007). Falhas neste sistema são observadas em indivíduos com síndrome de Down (SD) (Kedziora, Bartosz²¹, 1988) e estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento da doença periodontal (Garcez et al.¹⁴, 2005; Kim et al.²², 2010; Sinha⁴¹, 2005; Waddington et al.⁵¹, 2000). As endotoxinas bacterianas, particularmente os lipopolissacarídeos (LPS) promovem a ativação e o aumento do número de leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) na gengiva e sulco gengival, por meio da indução de citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Diab-Ladki et al.¹⁰, 2003). Como consequência, há a produção de grande quantidade de EROs pelos PMNLs, (Canakci et al.⁵, 2005; Canakci et al.⁶, 2009; Kim et al.²², 2010). Assim, a progressão

da doença periodontal leva a um constante aumento na produção de peróxidos lipídicos e mediadores inflamatórios, sendo estes, capazes de recrutar mais PMNLs e gerar ainda mais EROs, estabelecendo-se, então, um ciclo vicioso (Dahiya et al.⁸, 2013). Quando há acúmulo ou uma neutralização não eficaz das EROs, fatalmente ocorre dano oxidativo, representado clinicamente e radiograficamente pela degeneração de tecido gengival, tecido ósseo e ligamento periodontal (Wei et al.⁵², 2010).

No braço longo do cromossomo 21, na banda cromossômica 21q22 (lê-se: braço longo do cromossomo 21 região 2, banda 2), localiza-se o gene da SOD-1, a principal isoenzima da SOD (Hattori et al.¹⁸, 2000). Sendo os indivíduos SD trissômicos, há um aumento em 50% na expressão gênica da SOD-1 (De La Torre et al.⁹, 1996), sendo observado um aumento de 42% (De La Torre et al.⁹, 1996) a 47,2% (Garlet et al.¹⁵, 2013) na atividade da SOD no sangue de crianças e adolescentes com SD. Esta enzima tem a função de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual tem grande potencial citotóxico. Desta maneira, ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante devido a maior produção deste composto (Garcez et al.¹⁴, 2005; Pinto et al.³⁶, 2002).

As enzimas catalase e GPx são responsáveis pela neutralização do peróxido de hidrogênio. Porém, como existe um desbalanço entre a SOD e essas enzimas nos indivíduos com SD há uma falha neste processo e o consequente acúmulo de peróxido de hidrogênio no organismo (Canakci et al.⁶, 2009; Garcez et al.¹⁴, 2005; Jovanovic et al.¹⁹, 1998).

A interação das EROs com as lipoproteínas da membrana celular tem como consequências a alteração da permeabilidade das membranas e organelas, e um aumento de líquidos intracelulares, o que pode culminar com o evento de morte celular (Sies, Cadenas⁴⁰, 1985). A partir desta reação tem-se a liberação de um composto chamado Malondialdeído (MDA), o qual funciona como biomarcador de danos oxidativos (Bastos et al.⁴, 2012; Canakci et al.⁶, 2009).

A destruição tecidual pode ser avaliada pela medição dos níveis de biomarcadores de peroxidação lipídica, como o MDA (Dahiya et al.⁸, 2013). Estudos demonstram que indivíduos com SD apresentam índices aumentados destes biomarcadores na saliva, bem como no plasma sanguíneo (Garcez et al.¹⁴, 2005; Jovanovic et al.¹⁹, 1998; Komatsu et al.²⁴, 2013; Muchová et al.²⁹, 2001; Pinto et al.³⁶, 2002). Também está bem estabelecido que a saliva é rica em antioxidantes e que

desempenha um papel importante na supressão da peroxidação lipídica (Terao, Nagao⁴⁹, 1991).

Com o intuito de investigar as alterações que ocorrem no sistema de defesa antioxidante e no processo de stress oxidativo em crianças SD, o objetivo do presente estudo foi realizar a dosagem de PT, quantificar a atividade das enzimas SOD e GPx, a capacidade antioxidante total (TAOC) e o nível de MDA na saliva de crianças SD comparando-as com crianças não-sindrômicas.

MATERIAL E MÉTODO

1 Seleção da amostra

A seleção dos pacientes para este estudo foi realizada em instituições e escolas para crianças especiais da cidade de Araraquara e região e na Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr - UNESP).

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, parecer nº 491.702 (Anexo 1), foram examinadas um total de 74 crianças (34 com SD e 40 não sindrômicas), de ambos os gêneros e qualquer etnia, na faixa etária entre 6 e 15 anos de idade. Destas, um total de 41 foram alocadas em dois grupos, de acordo com a condição genética: 18 crianças no Grupo SD (crianças com síndrome de Down, 10 do gênero feminino/ 8 do gênero masculino, com idade média: 10,3 anos; variação: 6 - 15 anos) e 23 crianças no grupo controle (crianças não sindrômicas, 14 do gênero feminino/ 9 do gênero masculino, com idade média: 9,6 anos; variação: 7 - 12 anos) Estas apresentavam incisivos centrais e primeiros molares permanentes irrompidos e bom estado de saúde geral. Não foram incluídas crianças que tinham feito uso de medicamentos que pudessem interferir com a secreção salivar (anticolinérgicos, neurolépticos, benzodiazepínicos), antibióticos, imunossupressores ou antioxidantes nos últimos 3 meses, com histórico de radiação de cabeça e pescoço, com comportamento não colaborador durante a coleta de saliva e indivíduos SD do tipo mosaico.

Antes das crianças serem alocadas nos grupos, os objetivos da pesquisa foram explicados aos pais e responsáveis e foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

2 Índice CPO-D e ceo-d e Índice Gengival (IG)

Os índices CPO-D/ceo-d e IG foram realizados por um único examinador treinado e calibrado (Kappa=0,97 e Kappa=0,98, respectivamente).

Para os índices CPO-D/ceo-d obedeceu-se os critérios estabelecidos pela (Organização Mundial de Saúde, 2013)³² (Anexo 2). Para a determinação do IG foram examinados os primeiros molares permanentes superiores e inferiores e incisivos centrais permanentes superiores e inferiores utilizando-se sonda milimetrada Williams e espelho bucal plano de acordo com a metodologia proposta por Løe²⁵ (1967), sendo: Grau 0 - Gengiva Normal, Grau 1 – Inflamação Suave, Grau 2 – Inflamação Moderada, Grau 3 – Inflamação Severa.

3 Coleta da Saliva

A saliva estimulada pela mastigação de *Parafilm*, foi coletada entre as 9 e 11 horas da manhã, pelo menos 2 horas após a última alimentação e higienização bucal, com a finalidade de evitar alterações na composição salivar. A saliva produzida no primeiro minuto foi desprezada e, em seguida, foi iniciada a coleta utilizando sugador portátil a vácuo (Aspiramax modelo MA 520-60, São Paulo, SP, Brasil), com o cuidado de manter o tubo coletor em gelo durante todo o período de coleta (Siqueira et al.⁴³, 2005). Seguiu-se com a coleta de saliva até a obtenção de uma quantidade suficiente para a realização das metodologias propostas tomando-se o cuidado de não ultrapassar o tempo de 15 minutos.

Imediatamente após a coleta de saliva foram realizadas as análises de fluxo salivar, pH e capacidade tampão da saliva. Em seguida, a saliva foi transportada para o laboratório, num prazo máximo de 60 minutos e centrifugada a 5000 rpm (Centrífuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a 4°C por um período de 20 minutos para eliminar resíduos sólidos. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL em microtubos esterilizados de 2,0mL (Eppendorf Safe-Lock – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), e armazenadas em freezer a -80°C para realização das demais análises.

4 Análise da Saliva

4.1 Fluxo Salivar, pH e Capacidade Tampão da Saliva

O fluxo salivar (mL/min) foi calculado pela razão entre o volume de saliva coletado e o tempo de coleta.

A aferição do pH salivar inicial (pHi) foi realizada com pHmetro portátil digital (Qualxtron modelo 8010, São Paulo, SP, Brasil), previamente calibrado com padrão de pH 7,0 e 4,0 (Siqueira et al.⁴³, 2005).

Para a avaliação da capacidade tampão da saliva foram adicionados e homogeneizados em um tubo falcon de 50 mL (Sarstedt - Nümbrecht, Alemanha), 0,5 mL de saliva e 1,5 mL de HCl 0,005 mol/L (Synth[®] - Diadema, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada uma nova aferição do valor do pH (pH_f) e a capacidade tampão da saliva foi classificada em: capacidade tampão baixa (pH_f≤4,0), intermediária (4,1≤pH_f≤5,5) ou alta (pH_f≥5,6) (Ericson, Bratthall¹³, 1989).

4.2 Proteína Total

A análise de proteína total da saliva foi realizada utilizando o kit BCA Protein Assay (Sigma Aldrich, Saint-Louis, EUA), composto por: reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹) e reagente B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m/v). A água destilada foi utilizada como branco e a albumina bovina sérica (BSA) como padrão.

A detecção colorimétrica e quantificação de proteína total da saliva se desenvolve em duas etapas. Inicialmente, na Reação de Biureto, proteínas em meio alcalino promovem a redução do Cu⁺² em Cu⁺¹, dando origem a um complexo de cor azul claro. Em seguida, ocorre a reação do ácido bicinconínico (BCA) com o Cu⁺¹, formando um complexo solúvel em água de cor púrpura, cuja intensidade é diretamente proporcional a concentração de proteína (Olson, Markwell³¹, 2007).

Para confecção da curva padrão foram usadas 5 diluições a partir da BSA 1000 µg/mL. Em placa de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) foram misturados 25 µL de cada diluição do padrão (curva padrão), ou 25 µL da amostra ou do branco, com 200 µL dos reagentes A e B, e gentilmente agitados por 30 segundos. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C. No final deste período, a taxa de desenvolvimento da cor fica lenta, indicando o término da reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 562 nm pelo período de 1 minuto. As análises foram feitas em duplicata e as médias dos valores de absorbância de cada amostra foram convertidos em concentração de proteína total por mililitro de saliva e expressos em mg/mL de saliva.

4.3 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a oxidação da Glutathione (GSH), que é realizada pelo hidroperóxido de cumeno. A metodologia para a quantificação da atividade da GPx foi realizada de acordo com Paglia, Valentine³³ (1967), utilizando-se o kit Ransel (Modelo RS505 – Randox – São Paulo, SP, Brasil). A análise foi feita em duplicata, usando placas de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). A água destilada foi utilizada como branco.

Inicialmente, foram misturados 4 µL do branco ou das amostras de saliva com 200 µL do reagente (Glutathione 4 mmol/L, Glutathione Redutase ≥ 0,5 U/L, NADPH - nicotinamida adenina di-nucleotídeo fosfato – 0,34 mmol/L).

A mistura foi levada ao agitador (Modelo 255 – Fanem, Karnataka, Índia) por 1 min e, em seguida, foram adicionados 8 µL de solução de Hidroperóxido de Cumeno (10 mL de Hidroperóxido de Cumeno + 10 mL de água destilada). Foi realizada a leitura da absorbância em leitor de Elisa (BioTek ELX 800, Winooski, Vermont, EUA) em comprimento de onda de 340 nm por um período de 3 minutos, sendo registrada a absorbância inicial e final.

A diferença entre a absorbância inicial e a final em função do tempo foi utilizada para a realização do cálculo da atividade da GPx, e, usando um fator fornecido pelo kit os resultados foram transformados em U/mL.

4.4 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para avaliação da SOD foi utilizado o kit Ransod (Modelo SD125 – Randox – São Paulo, SP, Brasil), composto por: Substrato Misto [Xantina 0,05 mmol/L e I.N.T. (2-(4 iodophenyl)-3-(4 nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride) 0,025 mmol/L], Tampão [CAPS (ácido N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfônico) 40 mmol/L pH 10,2 e EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,94 mmol/L], Xantina Oxidase 80 U/L e Padrão (4,12 U/mL).

Este método se baseia na reação da xantina-xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxidos que reagem com o I.N.T formando o composto vermelho de formazan. A atividade da SOD foi medida por meio do grau de inibição desta reação (Sun et al.⁴⁸, 1988).

A curva padrão foi confeccionada a partir de diluições do padrão (4,12 U/mL, 2,06 U/mL, 1,03 U/mL, 0,51 U/mL, 0,17 U/mL). Em uma placa de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) foram pipetados em cada

compartimento 6 μL das diluições do padrão (curva padrão), de saliva, ou do diluente puro (branco) e adicionados 200 μL do substrato misto. Em seguida, a mistura foi agitada por um período de 1 minuto e a absorbância (A1) foi determinada em leitor de Elisa (VERSAmix absorbance microplate reader, California, EUA) em comprimento de onda de 505 nm. Após a leitura inicial, em cada compartimento foram adicionados 30 μL de xantina oxidase e repetida a leitura, desta vez por um período de 3 min, sendo registrada a absorbância final (A2). Foi calculada a diferença entre a absorbância inicial (A1) e a final (A2) em função do tempo e, os resultados foram transformados em U/mL de saliva, tendo como base a curva padrão.

4.5 Capacidade Antioxidante Total da Saliva (TAOC)

A TAOC foi avaliada pelo kit TAS (Modelo NX2332 – Randox – São Paulo, SP, Brasil). O método utilizado tem como princípio o ensaio ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]). Neste ensaio o ABTS é incubado com a metamioglobina e H_2O_2 para produzir o cátion ABTS^+ , o qual é estável e apresenta coloração azul-esverdeada. As substâncias antioxidantes, presentes na amostra, impedem esta reação, havendo uma redução na intensidade da cor. Esta mudança na intensidade da cor é proporcional a concentração de antioxidantes totais (Nagler et al.³⁰, 2002; Sousa et al.⁴⁵, 2014).

Em cada poço de uma placa de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), foram pipetados 4 μL de água MiliQ (branco), padrão (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ou amostra de saliva e acrescentados 200 μL do cromógeno (Metamioglobina 6,1 $\mu\text{mol/L}$ e $\text{ABTS}^{\text{®}}$ 610 $\mu\text{mol/L}$). As análises foram feitas em duplicata. Esta mistura foi agitada por 1 minuto e determinou-se a absorbância em um comprimento de onda de 660 nm.

Após esta leitura inicial (A1), foram acrescentados, em cada poço, 400 μL do substrato (H_2O_2 250 $\mu\text{mol/L}$, na forma estabilizada). A mistura foi novamente agitada por um período de 1 minuto, e, a leitura final (A2) da absorbância foi realizada após 3 minutos.

A TAOC foi calculada de acordo com a fórmula: $\text{TAOC} = \text{Fator} \times (\Delta \text{ Branco} - \Delta \text{ Amostra})$, onde $\Delta \text{ Amostra} = (\text{A1} - \text{A2})/\text{Tempo}$ e, $\text{Fator} = \text{Concentração do padrão}/(\Delta \text{ Branco} - \Delta \text{ Padrão})$, sendo expressa em mM de antioxidante.

4.6 Nível de Malondialdeído (MDA)

O nível de MDA foi quantificado pelo método High-performance liquid chromatography (HPLC) de acordo com o protocolo de Karatas et al.²⁰ (2002). Esta análise foi realizada no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Odontologia de São Paulo (USP – São Paulo).

4.6.1 Condições cromatográficas

As análises de HPLC foram realizadas com o sistema Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com uma bomba LC-10AD, sistema de controle SCL-10A, leitora Diode Array SPD-M10A, forno para coluna CTO-10AS e software Shimadzu CLASS-VP (Chromatography Laboratory Automation Systems Software). O sistema de eluição foi o seguinte: em uma coluna ACE C18 (150 x 4,6 mm i.d., 5 µm, Aberdeen, Escócia, UK) foi eluído em modo isocrático uma fase móvel composta por KH₂PO₄ 50 mM:Metanol (65:35) a uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min e temperatura de 24°C.

4.6.2 Preparo dos Padrões de MDA

Em um tubo de ensaio, foi realizada a diluição de 10 µL de tetraetoxipropano em 10 mL de HCl 0,1N e, então, esta solução foi colocada em água fervente por um período de 5 minutos seguido por resfriamento em gelo (Solução X). A solução de estoque de MDA foi preparada adicionando-se 1 mL da solução X em 100 mL de água destilada (2,92 µg de MDA/mL ou 40,5 µM de MDA). A partir da solução de estoque de MDA foram feitas 5 diluições (1:10) correspondentes a curva padrão.

4.6.3 Preparo das amostras e procedimento de ensaio

Um volume de 200 µL de saliva foi homogeneizado por 1 minuto com 700 µL de Ácido Perclórico 0,4 M gelado (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), incubado em gelo por 30 minutos, e, em seguida centrifugado a 4°C (Centrífuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos a 20.000g. O sobrenadante foi neutralizado com K₂CO₃ 5M (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), usando 8 µL para cada 100 mL de sobrenadante, mantido em gelo por 10 minutos e então, levado ao freezer a -80°C por 1 hora. Em seguida, foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi pipetado e colocado em microtubos que foram armazenados em freezer -80°C até o momento das análises.

Foi injetado no sistema HPLC, 20 µL da amostra em um fluxo de 0,6 mL/min a 24°C por um período de 5 minutos e a leitura foi realizada a 254 nm. O tempo de retenção do MDA foi aproximadamente de 3 minutos. Os resultados foram obtidos em mA e transformados em em µM tendo como base a curva padrão.

5 Análise Estatística

Como dados coletados apresentaram uma distribuição não-normal e a amostra para este estudo foi considerada pequena e o desvio padrão foi alto, testes estatísticos não-paramétricos foram selecionados para realizar a análise inferencial. Assim, para comparar as diferenças entre os grupos estudados foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para testar a correlação entre as variáveis foi aplicada a correlação de Spearman. Foi adotado nível de significância igual a 5%.

RESULTADO

Na tabela 1 estão apresentadas as medianas (mín-máx) das variáveis clínicas estudadas: CPO-D/ceo-d, Índice Gengival, fluxo salivar e capacidade tampão da saliva para os grupos SD e controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apenas para o fluxo salivar, que se mostrou menor no grupo SD.

Tabela 1 – Mediana (min-max) das características clínicas e salivares estudadas de acordo com o grupo.

Variável	Grupos		valor de p*
	SD (n=18)	Controle (n=23)	
CPO-D/ceo-d	2,5 (0 - 8)	5 (1 - 12)	0,097
Índice Gengival	1 (0 - 2)	1 (0 - 2)	0,064
Fluxo Salivar (mL/min)	0,2 (0,1 – 0,5)	0,6 (0,2 – 1,1)	<0,0001
pH	7,7 (6,7 – 8,5)	7,8 (6,9 – 8,3)	0,589
Capacidade Tampão**	2 (1 - 3)	2 (1 - 3)	0,111

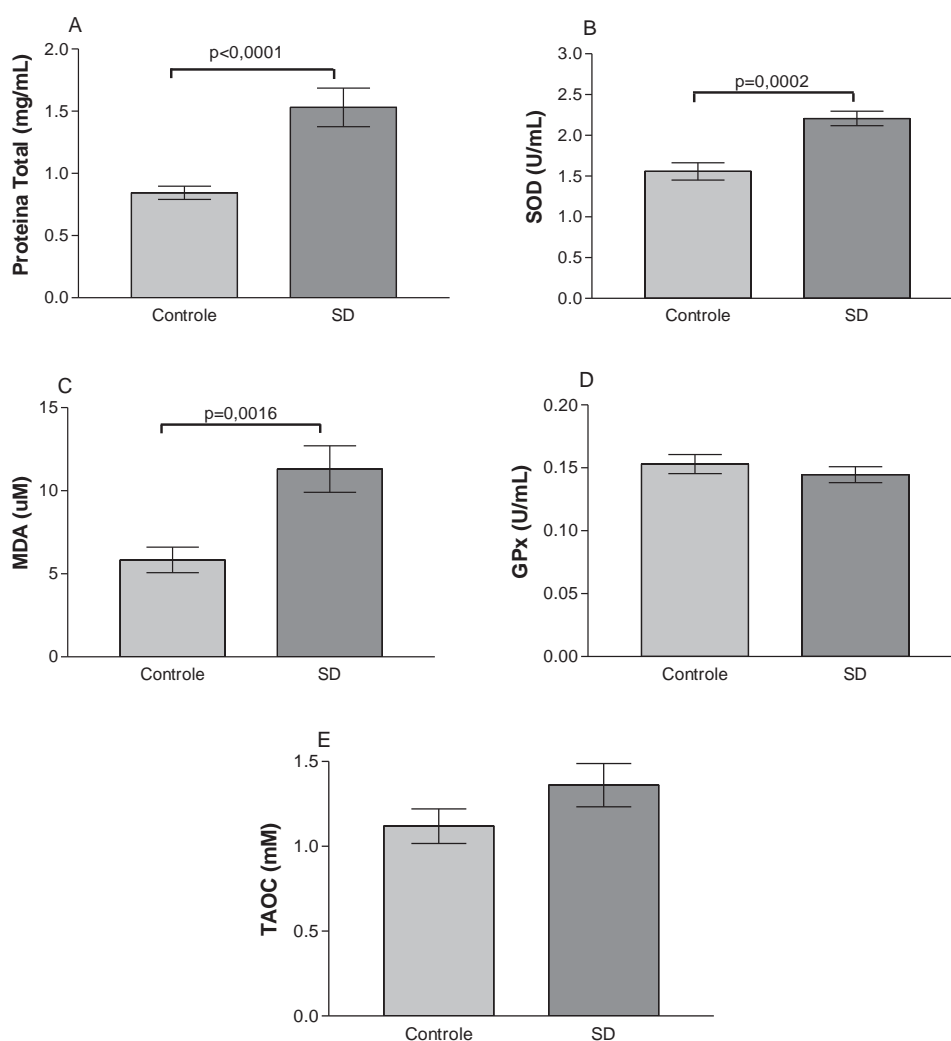
valor de p* = Mann-Whitney para comparação entre os pacientes com e sem SD. Diferença estatisticamente significativa p<0,05.

SD=Síndrome de Down.

Capacidade Tampão**= 1-capacidade tampão baixa ($pH_{final}<4,0$); 2-capacidade tampão intermediária ($4,1\leq pH_{final}\leq 5,5$) e 3-capacidade tampão alta ($pH_{final}\geq 5,6$).

Valores mais elevados de PT ($1,53 \pm 0,64$ mg/mL), atividade da SOD ($2,21 \pm 0,38$ U/mL) e nível MDA ($11,30 \pm 4,86$ μ M) foram observados para o grupo SD quando comparado com o controle (PT: $0,84 \pm 0,25$ mg/mL; SOD: $1,56 \pm 0,51$; MDA: $5,84 \pm 3,83$), sendo estes estatisticamente significantes ($p < 0,0001$; $p = 0,0002$ e $p = 0,0016$, respectivamente). Nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos foi observada para a atividade da GPx (SD: $0,14 \pm 0,03$; controle: $0,15 \pm 0,04$) e TAOC (SD: $1,36 \pm 0,54$; controle: $1,12 \pm 0,48$), $p > 0,05$ (Figura 1).

Figura 1 – Representação gráfica de: (A) concentração de proteína total - PT (mg/mL); (B) Atividade da Superóxido Dismutase -SOD (U/mL); (C) Nível de Malondialdeído - MDA (μ M); (D) Atividade da Glutathiona Peroxidase - GPx (U/mL) e (E) Capacidade Anti-Oxidante Total da saliva - TAOC (mM) entre os grupos SD (síndrome de Down, $n=18$) e controle (não síndrômico, $n=23$). Colunas representam as médias e barras de erros, os desvios padrão. O valor de p foi calculado usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Diferença estatisticamente significativa: $p < 0,05$.



Correlação positiva moderada estatisticamente significativa foi constatada entre a concentração de proteína total e o IG ($r=0,491$; $p=0,0383$) e correlação negativa, também moderada foi observada entre a atividade da SOD e o fluxo salivar ($r=-0,475$; $p=0,0463$) para o grupo SD.

DISCUSSÃO

Está bem estabelecido pela literatura que indivíduos com SD apresentam uma maior quantidade de microrganismos periodontopatogênicos e que a colonização da cavidade bucal se inicia ainda na infância (Amano et al.², 2001; Amano et al.³, 2000). Além deste agravante, outro fator de risco para essa parcela da população em relação a maior prevalência de doença periodontal é a higiene bucal precária (Reuland-Bosma, van Dijk³⁸, 1986).

A quantidade aumentada de bactérias nocivas ao periodonto induz a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNLs), com o intuito de provocar a morte e fagocitose destes microrganismos. Neste processo, há o desencadeamento do estresse oxidativo, pela liberação de radicais livres, o que gera inflamação do tecido periodontal e danos ao mesmo (Ram, Chinen³⁷, 2011).

Assim, tem sido demonstrado que os indivíduos com SD apresentam uma maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Garcez et al.¹⁴, 2005). Com o objetivo de reestabelecer a homeostase tecidual, os componentes do sistema de defesa antioxidante são ativados, dentre eles as enzimas GPx e SOD (Sculley, Langley-Evans³⁹, 2002).

No presente estudo foi avaliada a atividade das enzimas GPx e SOD na saliva. Foi constatada ausência de diferença estatística entre os grupos SD e controle não sindrômico para a atividade da GPx. Estes resultados foram consistentes com o trabalho de Garlet et al.¹⁵ (2013), onde foi verificado ausência de diferença significativa na atividade da GPx no sangue de crianças com SD comparado com não sindrômicas. Resultados controversos também foram relatados, sendo observada uma atividade aumentada desta enzima em células sanguíneas, sangue total e fibroblastos de indivíduos com SD (Meguid et al.²⁶, 2001; Muchová et al.²⁹, 2001; Parisotto et al.³⁴, 2014; Pastor et al.³⁵, 1998; Sinha⁴¹, 2005). Contudo, o gene que expressa a GPx1, principal forma avaliada no presente estudo, está localizado no cromossomo 3 (Kiss et al.²³, 1997) e resultados semelhantes da

atividade desta enzima para os dois grupos de crianças estudados são bastante consistentes.

A enzima SOD tem a função de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, sendo portanto uma importante enzima antioxidante (Akalin et al.¹, 2005). No presente estudo, a atividade da SOD na saliva dos indivíduos SD foi significativamente maior em comparação ao grupo controle. Estes resultados contemplam outros estudos que demonstraram uma atividade aumentada desta enzima nos pacientes com SD (Garcez et al.¹⁴, 2005; Garlet et al.¹⁵, 2013; Meguid et al.²⁶, 2001; Muchová et al.²⁸, 2014; Muchová et al.²⁹, 2001; Parisotto et al.³⁴, 2014; Sinha⁴¹, 2005; Sousa et al.⁴⁵, 2014). Este evento pode ser explicado devido a presença de um cromossomo extra no par 21, onde localiza-se o gene da SOD-1 (De La Torre et al.⁹, 1996; Hattori et al.¹⁸, 2000). Apesar de sua função antioxidante, um aumento da SOD provoca um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante, por meio da superprodução de peróxido de hidrogênio (Garcez et al.¹⁴, 2005; Pinto et al.³⁶, 2002), que não é totalmente neutralizado pelas enzimas catalase e GPx, e funciona como um importante agente oxidante celular (Garcez et al.¹⁴, 2005).

A interação do peróxido de hidrogênio e outras EROs com as lipoproteínas da membrana celular provoca a decomposição da mesma, sendo um dos produtos resultantes, o MDA. Este tem sido usado, como indicador do estresse oxidativo (Canakci et al.⁶, 2009) e os estudos tem demonstrado que pacientes com SD apresentam índices mais elevados desses marcadores na saliva e plasma sanguíneo (Garcez et al.¹⁴, 2005; Jovanovic et al.¹⁹, 1998; Komatsu et al.²⁴, 2013; Muchová et al.²⁹, 2001; Pinto et al.³⁶, 2002; Sousa et al.⁴⁵, 2014) e que o aumento dos níveis de MDA estão relacionados ao maior estresse oxidativo no organismo (Canakci et al.⁶, 2009; Wei et al.⁵², 2010).

Em estudo anterior, Sousa et al.⁴⁵ (2014) avaliaram a concentração de MDA na saliva de pacientes SD e não sindrômicos, por meio da quantificação por espectrofotometria do produto da reação deste com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Verificaram índices mais elevados de MDA na saliva de pacientes com SD, podendo este fluido ser usado como uma alternativa não invasiva para a investigação de biomarcadores do estresse oxidativo. O presente estudo, avaliando os níveis de MDA por HPLC, apontou resultados semelhantes aos encontrados por Sousa et al.⁴⁵ (2014). A metodologia utilizada neste estudo é mais sensível e precisa do que métodos baseados na reação com o ácido tiobarbitúrico e, até onde é do

conhecimento dos autores deste trabalho, esta é a primeira vez que o nível de MDA na saliva de crianças com SD foi mensurado usando essa metodologia.

A extensão do dano tecidual pode ser avaliada pela mensuração de biomarcadores como o MDA, mas também pela análise de antioxidantes (Gutteridge¹⁷, 1995). Contudo, a medição destes antioxidantes, individualmente, pode ser menos representativa do que a capacidade antioxidante total (Dodwad et al.¹¹, 2011). Desta maneira este trabalho também avaliou a TAOC da saliva das crianças com SD e controle. Não houve diferença estatística entre os valores de TAOC entre os grupos. Este resultado também foi reportado na literatura, utilizando-se a mesma metodologia empregada neste trabalho (Sousa et al.⁴⁵, 2014). Resultados controversos, mostrando valores diminuídos de TAOC para o grupo de crianças com SD foram observados em estudos usando tanto a saliva (Subramanian et al.⁴⁶, 2014) quanto o plasma sanguíneo (Carratelli et al.⁷, 2001; Sulthana et al.⁴⁷, 2012) como fluido de análise.

A concentração de proteína total na saliva observada neste estudo exibiu valores superiores para o grupo de crianças com SD em comparação ao grupo controle, o que corrobora com outros estudos (Siqueira, Nicolau⁴², 2002; Siqueira et al.⁴⁴, 2007; Sousa et al.⁴⁵, 2014). O fluxo salivar reduzido contribui em parte para explicar este aumento na concentração de proteína total, contudo, é importante ressaltar que neste trabalho, o fluxo salivar nas crianças com SD mostrou-se cerca de 57,3% inferior quando comparado com crianças não sindrômicas, enquanto, a concentração de proteína total foi 81,5% maior nas primeiras. Portanto, este aumento na concentração de proteína total na saliva não está unicamente relacionado com a redução do fluxo salivar nos SD.

Assim, consideramos que a saliva é uma ferramenta eficiente para o diagnóstico do estresse oxidativo e, os altos níveis de SOD e MDA presentes neste fluido reforçam a hipótese de ocorrência de um maior dano oxidativo em indivíduos SD. Portanto, outros estudos devem ser realizados a fim de melhor entender os mecanismos que levam ao maior estresse oxidativo nos pacientes com SD, e possibilitar o desenvolvimento de terapias que contribuam para um melhor equilíbrio nesse processo, minimizando os danos por ele causados.

REFERÊNCIAS:

1. Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(3): 238-43.
2. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol*. 2001; 72(3): 368-73.
3. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*. 2000; 71(2): 249-55.
4. Bastos AS, Loureiro AP, de Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Júnior CR, et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem*. 2012; 423(1): 141-6.
5. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70(6): 619-28.
6. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent*. 2009; 3(2): 100-6.
7. Carratelli M, Porcaro L, Ruscica M, De Simone E, Bertelli AA, Corsi MM. Reactive oxygen metabolites and prooxidant status in children with Down's syndrome. *Int J Clin Pharmacol Res*. 2001; 21(2): 79-84.
8. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17(4): 411-6.
9. De La Torre R, Casado A, López-Fernández E, Carrascosa D, Ramírez V, Sáez J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia*. 1996; 52(9): 871-3.
10. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig*. 2003; 7(2): 103-7.

11. Dodwad R, Betigeri AV, Preeti BP. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent* 2011; 2(1):17-20.
12. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 47-95.
13. Ericson D, Bratthall D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. *Scand J Dent Res.* 1989; 97(5): 405-7.
14. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative Stress and Hematologic and Biochemical Parameters in Individuals with Down Syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(12): 1607-11.
15. Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM, et al. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci.* 2013; 93(16): 558-63.
16. Guetens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2002; 39(4-5): 331-457.
17. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-28.
18. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 2000; 405(6784): 311-9.
19. Jovanovic SV, Clements D, Macleod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down Syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(9): 1044-8.
20. Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2002; 311(1): 76-9.
21. Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 1988; 4(5): 317-30.
22. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40(4): 164-71.

23. Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, et al. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 79(3-4): 228-30. Apud: Martins-Júnior AC. Avaliação dos polimorfismos de ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD) e glutathione peroxidase (GPx) sobre estresse oxidativo em trabalhadores ocupacionalmente expostos ao chumbo [dissertação mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, 2014.
24. Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, et al. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9): 1246-50.
25. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967; 38(6): 610-6.
26. Meguid NA, Kholoussi NM, Afifi HH. Evaluation of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes and their cofactors in Egyptian children with Down's syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 81(1): 21-8.
27. Modéer T, Barr M, Dahllöf G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res.* 1990; 98(3): 228-34.
28. Muchová J, Zitnanová I, Duracková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiol Res.* 2014; 63(5): 535-42.
29. Muchová J, Sustrová M, Garaiová I, Liptáková A, Blazicek P, Kvasnicka P, et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down Syndrome patients. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(4): 499-508.
30. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(3): 268-77.
31. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein sci.* 2007; 48 (Chapter 3:Unit 3.4): 1-29.
32. Organização Mundial de Saúde. Levantamento epidemiológico básico de saúde bucal: manual de instruções. 5. ed. França: OMS; 2013.
33. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1): 158-69.

34. Parisotto EB, Garlet TR, Cavalli VL, Zamoner A, da Rosa JS, Bastos J, et al. Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil*. 2014; 35(6): 1228-36.
35. Pastor MC, Sierra C, Doladé M, Navarro E, Brandi N, Cabré E, et al. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem*. 1998; 44(5): 924-9.
36. Pinto M, Neves J, Palha M, Bicho M. Oxidative stress in Portuguese children with Down Syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2002; 8(2): 79-82.
37. Ram G, Chinen J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2011; 164(1): 9-16.
38. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(1): 64-73.
39. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61(1): 137-43.
40. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985; 311(1152): 617-31.
41. Sinha S. Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome. *Life Sci*. 2005; 76(12): 1407-26.
42. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down Syndrome. *Special Care Dentist*. 2002; 22(6): 226-30.
43. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest*. 2005; 9(1): 26–9.
44. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2007; 27(5): 202-5.
45. Sousa MC, Vieira RB, Dos Santos DS, Carvalho CA, Camargo SE, Mancini MN, et al. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 2014; 60(4): 600-5.
46. Subramaniam P, Girish Babu K, Mohan Das L. Assessment of salivary total antioxidant levels and oral health status in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2014; 34(4): 193-200.

47. Sulthana SM, Kumar SN, Sridhar MG, Bhat BV, Rao KR. Levels of non enzymatic antioxidants in Down syndrome. *Indian J Pediatr.* 2012; 79(11): 1473-6.
48. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34(3): 497-500.
49. Terao J, Nagao A. Antioxidative effect of human saliva on lipid peroxidation. *Agric Biol Chem.* 1991; 55(3): 869-72.
50. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30(5): 1323-38.
51. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* 2000; 6(3): 138-51.
52. Wei D, Zhang X-L, Wang Y-Z, Yang C-X, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010; 55(1):70-8.

CONCLUSÃO

- Apesar de apresentarem fluxo salivar significativamente reduzido, não foram detectadas diferenças na quantificação de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas na saliva de crianças com síndrome de Down quando comparadas com crianças não sindrômicas. Ainda assim, esta redução no fluxo salivar, pode ser considerada um fator importante no processo de desenvolvimento da cárie e da doença periodontal precoce nesses indivíduos, pelo fato reduzir a eficiência da saliva na limpeza da cavidade bucal.
- A maior atividade da SOD e os níveis elevados de MDA detectados na saliva de crianças com síndrome de Down evidenciam a ocorrência de um maior dano oxidativo, e pode explicar o desenvolvimento da doença periodontal precoce nesses indivíduos.

REFERÊNCIAS*

1. Abanto J, Ciamponi AL, Francischini E, Murakami C, de Rezende NP, Gallottini M. Medical problems and oral care of patients with Down syndrome: a literature review. *Spec Care Dentist*. 2011; 31(6): 197-203.
2. Agholme MB, Dahllöf G, Modéer T. Changes of periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-year period. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107(2): 82-8.
3. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*. 2000; 71(2): 249-55.
4. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira Mde L, Azevedo A, Melo P, Andrade C, et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67(9): 1007-11.
5. Bagic I, Verzak Z, Cukovic-Cavka S, Brkic H, Susic M. Periodontal conditions in individuals with Down's syndrome. *Coll Antropol*. 2003; 27 Suppl 2: 75-82.
6. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol*. 1986; 57(5): 288-93.
7. Barr-Agholme M, Dahllöf G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol*. 1998; 69 (10): 1119-23.
8. Bastos AS, Loureiro AP, de Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Júnior CR, et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem*. 2012; 423(1): 141-6.
9. Berg JM, Korossy M. Down syndrome before Down: a retrospect. *Am J Med Genet*. 2001; 102 (2): 205-11.
10. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70 (6): 619-28.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

11. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent.* 2009; 3(2): 100-6.
12. Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome--clinical interventional study. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 370-80.
13. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1): 23-8.
14. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(3): 177-82.
15. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. *Int J Paediatr Dent.* 2010; 20 (4): 235-41.
16. De La Torre R, Casado A, López-Fernández E, Carrascosa D, Ramírez V, Sáez J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia.* 1996; 52(9): 871-3.
17. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig.* 2003; 7(2): 103-7.
18. Down JLH. Observation on the ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports.* 1866; 3: 259-62.
19. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27(1): 31-40.
20. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000; 131(7): 887-99.
21. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008; 53(3): 286-91.

22. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(12): 1607-11.
23. Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros GS, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM, et al. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci.* 2013; 93(16): 558-63.
24. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 2000; 405(6784): 311-9.
25. Hennequin M, Faulks D, Veyrune JL, Bourdiol P. Significance of oral health in persons with Down syndrome: a literature review. *Dev Med Child Neurol.* 1999; 41(4): 275-83.
26. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol.* 1989; 60(5): 238-42.
27. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolismo. *Lancet.* 1959; 1 (7075): 710.
28. Jovanovic SV, Clements D, Macleod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down Syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(9): 1044-8.
29. Kava MP, Tullu MS, Muranjan MN, Girisha K.M. Down syndrome: clinical profile from india. *Arch Med Res.* 2004; 35 (1): 31-5.
30. Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 1988; 4(5): 317-30.
31. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40 (4): 164-71.
32. Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, et al. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9): 1246-50.
33. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91 (11): 4997-5001.

34. Kumar A, Masamatti SS, Viridi MS. Periodontal diseases in children and adolescents: a clinician's perspective part 2. *Dent Update*. 2012; 39(9) : 639-42, 645-6, 649-52.
35. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1959; 248 (11): 1721-2.
36. Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2007; 12(6): 119-30.
37. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2014; 2014: 931083.
38. Marques LS, Alcântara CE, Pereira LJ, Ramos-Jorge ML. Down syndrome: a risk factor for malocclusion severity? *Braz Oral Res*. 2015; 29(1) : 1-7.
39. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263-71.
40. Modéer T, Barr M, Dahllöf G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res*. 1990; 98(3): 228-34.
41. Muchová J, Zitnanová I, Duracková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiol Res*. 2014; 63(5): 535-42.
42. Muchová J, Sustrová M, Garaiová I, Liptáková A, Blazicek P, Kvasnicka P, et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down Syndrome patients. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(4): 499-508.
43. Organização Mundial da Saúde. Down syndrome. Genes and human diseases. World Health Organization; 2007. [Disponível no site: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/print.html>. Acesso em 12 de abril 2015].
44. Pinto M, Neves J, Palha M, Bicho M. Oxidative stress in Portuguese children with Down Syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2002; 8(2): 79-82.
45. Polani PE. Chromosome anomalies. *Annu Rev Med*. 1964; 15: 93-114.
46. Reuland-Bosma W. Dissertations 25 years after date 35. Periodontal disease in Down syndrome: an immunological disorder. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2013;120(10) : 541-5.

47. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(1): 64-73.
48. Saxén L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome: an orthopantomographic evaluation. *J Periodontol.* 1977; 48(6): 337-40.
49. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61(1): 137-43.
50. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2007; 13(3): 221-7.
51. Sinha S. Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome. *Life Sci.* 2005; 76(12): 1407-26.
52. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2002; 22(6): 226-30.
53. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest.* 2005; 9 (1): 26–9.
54. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2007; 27(5): 202-5.
55. Subramaniam P, Girish Babu K, Mohan Das L. Assessment of salivary total antioxidant levels and oral health status in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2014; 34(4): 193-200.
56. Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Mittal M, Singh B, Pandey S. Evaluation of antioxidant enzymes activity and malondialdehyde levels in patients with chronic periodontitis and diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2014; 85(5): 713-20.
57. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30(5): 1323-38.
58. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* 2000; 6(3): 138-51.

59. Wei D, Zhang X-L, Wang Y-Z, Yang C-X, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010; 55 (1): 70–8.
60. Yarat A, Akyüz S, Koc L, Erdem H, Emekli N. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. *J Dent.* 1999; 27 (2): 115-8.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu,

_____,
(nacionalidade) _____, portador do RG nº
_____, residente à
_____, na cidade de
_____, estado de _____, responsável pelo menor
_____, concordo voluntariamente

com a sua participação da pesquisa “Estudo de componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down” e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem quaisquer dúvidas sobre a sua participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo avaliar na saliva alguns fatores relacionados ao desenvolvimento da cárie dental e da doença periodontal em crianças com síndrome de Down e não sindrômicas. Para isso, o participante da pesquisa passará por um exame clínico odontológico usando luz do refletor, sonda e espelho bucais, e, em seguida, será submetido à coleta de saliva com o auxílio de um sugador portátil por um período de 5 minutos. Esta coleta será realizada no período da manhã (9 – 11 horas) com jejum mínimo de 2 horas, unicamente com o objetivo da realização da pesquisa. Permito que seja feita essa coleta para o desenvolvimento da pesquisa. Sei que o participante não sofrerá por submeter-se ao exame clínico nem pela coleta de saliva e que não há nenhum risco para o mesmo.

Fui esclarecido que as amostras obtidas a partir da coleta serão congeladas e posteriormente estudadas em laboratório, e que a realização da pesquisa não implica em riscos ao participante, pois serão utilizados materiais descartáveis e instrumentais estéreis.

Estou ciente que estarei contribuindo espontaneamente para a realização de uma pesquisa que trará informações para melhor compreensão da Doença Periodontal e Atividade de Cárie resultando em benefícios para a população de uma forma geral.

Estou ciente que receberei orientação de correta escovação dental e outras medidas para a manutenção da saúde bucal e geral, mas mesmo que eu não concorde em

participar da pesquisa, se apresentar alguma alteração bucal serei encaminhado para a realização do tratamento necessário.

Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo da identidade do voluntário, assegurando a sua privacidade.

Estou ciente que a participação na pesquisa será voluntária e não será oferecido nenhum tipo de remuneração.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Responsável

Professor Responsável: Elisa Maria Aparecida Giro



Polegar Direito

Telefones para contato:

Telefone do Pesquisador Responsável: (16) 3301 – 6336

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: FOAr – (16) 3301- 6432/6434

ANEXO 1

Parecer de Aprovação do CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down.

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19741913.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 491.702

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "Estudo de componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down", é classificado como um estudo observacional transversal. Este trabalho pretende testar a hipótese nula (H0) de que não há diferença estatística significativa nos componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down comparadas com um grupo controle (ausência da síndrome), levando-se em conta que a hipótese alternativa (H1) consiste na existência de diferença estatisticamente significativa nos componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down comparadas com um grupo controle (ausência da síndrome).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é avaliar componentes salivares relacionados à cárie dentária e doença periodontal em crianças com síndrome de Down e compará-los com crianças não sindrômicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos, ao que se refere ao exame clínico, eventuais riscos serão minimizados pelo uso de materiais estéreis. Em relação ao desenvolvimento da pesquisa, não haverá riscos aos participantes, pois, para coleta da saliva serão utilizados materiais estéreis e

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 491.702

descartáveis. Caso algum participante venha a sentir qualquer mal-estar ou desconforto decorrente do exame clínico ou durante a coleta de saliva, ele será totalmente assistido pelo pesquisador responsável e demais pesquisadores.

Em relação aos benefícios, caso durante o exame clínico seja observada a necessidade de tratamento odontológico, o voluntário será encaminhado para receber os cuidados necessários. Será oferecida também orientação sobre adequada higienização oral, enfatizando sua importância para a manutenção da saúde oral. Além disso, os indivíduos e seus responsáveis estarão contribuindo espontaneamente para que a comunidade científica obtenha respostas importantes sobre os componentes salivares relacionados com o desenvolvimento da cárie dentária e doença periodontal em indivíduos com Síndrome de Down em relação aos não-sindrômicos (indivíduos cromossomicamente normais).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho e sua metodologia foram apresentadas de modo a realizar o trabalho dentro das normas éticas, seu cronograma adequado, e sua propostas alinhadas para o projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação então apresentados de maneira adequada para a submissão e apreciação

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

a metodologia apresentada, cronograma, delineamento, propostas e objetivos estão adequados

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto APROVADO em sessão de 10 de dezembro de 2013.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

ANEXO 2

ÍNDICES DE CÁRIE DENTÁRIA (CPO e ceo)

Índice de cárie dentária (decíduos entre parênteses) – (OMS, 2013)

Códigos	Critérios para avaliação
0(A) - Coroa hígida	<p>Não há evidência de cárie. Estágios iniciais da doença não são levados em consideração. Os seguintes sinais devem ser codificados como hígidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • manchas esbranquiçadas ou porosas; • descolorações ou manchas rugosas que não sejam amolecidas ao toque de uma sonda IPC metálica; • áreas escuras, brilhantes, duras e fissuradas do esmalte de um dente com fluorose moderada ou severa; • sulcos e fissuras pigmentadas no esmalte, mas que não apresentam sinais visuais de base amolecida, esmalte socavado ou amolecimento das paredes, detectáveis com a sonda IPC; • lesões que, com base na sua distribuição ou história, ou exame táctil/visual, parecem ser devidas à abrasão.
1(B) - Coroa cariada	<p>A cárie é considerada presente quando uma lesão em uma fóssula ou fissura, ou em uma superfície lisa, tem uma cavidade inconfundível, esmalte socavado, assoalho ou parede detectavelmente amolecidos. Um dente com restauração provisória, ou que está selado [código 6 (F)], mas também cariado, também deve ser incluído nesta categoria. No caso em que a coroa tenha sido destruída por cárie e somente a raiz tenha restado, a cárie é considerada como tendo originado-se na coroa, e portanto somente classifica-se como cárie coronária. A sonda IPC deve ser utilizada para confirmar evidências visuais de cárie na oclusal, vestibular e lingual. Na dúvida, considerar o dente hígido.</p>
2(C) - Coroa restaurada, porém cariada.	<p>Há uma ou mais restaurações e ao mesmo tempo, uma ou mais áreas estão cariadas. Não há distinção entre cáries primárias e secundárias, ou seja, se as lesões estão ou não em associação física com a(s) restauração(ões).</p>
3(D) - Coroa restaurada e sem cárie.	<p>Há uma ou mais restaurações definitivas e inexistente cárie em algum ponto da coroa. Um dente com coroa colocada devido à cárie inclui-se nesta categoria. Se a coroa resulta de outras causas, como suporte de prótese, é codificada como 7 (G).</p> <p><i>Nota:</i> Com relação aos códigos 2(C) e 3(D), apesar de ainda não ser uma prática consensual, a presença de ionômero de vidro em qualquer elemento dentário será considerada, neste estudo, como condição para elemento restaurado.</p>
4(E) - Dente ausente como resultado de cárie	<p>Dente permanente ou decíduo extraído por causa de cárie e não por outras razões. Essa condição é registrada na casela correspondente à coroa. Dentes decíduos: aplicar apenas quando o indivíduo está numa faixa etária na qual a esfoliação normal não constitui justificativa suficiente para a ausência dentária.</p> <p><i>Nota:</i> Em algumas idades pode ser difícil distinguir entre dente não irrompido (código 8) e dente perdido (códigos 4 ou 5). Fazer relações (cronologia da irrupção, experiência de cárie etc.) pode ajudar na tomada de decisão.</p>

5(F) - Dente perdido por outra razão	Ausência se deve à razões ortodônticas, periodontais, traumáticas ou congênitas. Nota: O código para decíduos (F) nestes casos deverá ser mais utilizado na faixa etária de 18 a 36 meses, uma vez que, a partir dos 5 anos, geralmente o espaço vazio se deve à exfoliação natural e deverá ser codificado como coroa não erupcionada (código 8).
6(G) - Selante	Há um selante de fissura ou a fissura oclusal foi alargada para receber um compósito. Se o dente possui selante e está cariado, prevalece o código 1 ou B (cárie).
7(H) - Apoio de ponte ou coroa	Indica um dente que é parte de uma prótese fixa. Este código é também utilizado para coroas instaladas por outras razões que não a cárie ou para dentes com facetas estéticas. Dentes extraídos e substituídos por um elemento de ponte fixa são codificados, na casela da condição da coroa, como 4 ou 5.
8(K) - Coroa não irrompida	Dente permanente ou decíduo ainda não está irrompido, atendendo à cronologia da irrupção. Não inclui dentes perdidos por problemas congênitos, trauma etc. Os dentes classificados como não irrompidos são excluídos de todos os cálculos relativos à cárie dentária.
T(T) - Trauma (Fratura)	Parte da superfície coronária foi perdida em consequência de trauma e não há evidência de cárie.
9(L) - Dente excluído	Aplicado a qualquer dente permanente que não possa ser examinado (bandas ortodônticas, hipoplasias severas etc.).

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 17/03/2017

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 17 de março de 2015

NATÁLIA BERTOLO DOMINGUES