

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

HEITOR CEOLIN ARAUJO

A severidade da lesão de cárie induz maior atividade de sistemas antioxidantes e consequente redução do estresse oxidativo na saliva de crianças

Araçatuba

2018

HEITOR CEOLIN ARAUJO

A severidade da lesão de cárie induz maior atividade de sistemas antioxidantes e consequente redução do estresse oxidativo na saliva de crianças

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof. Associada Cristina Antoniali

Araçatuba- SP

2018

Catalogação-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A663s Araujo, Heitor Ceolin.
A severidade da lesão de cárie induz maior atividade de sistemas antioxidantes e conseqüente redução do estresse oxidativo na saliva de crianças / Heitor Ceolin Araújo. - Araçatuba, 2018
51 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Cárie dentária 2. Estresse oxidativo 3. Antioxidantes
4. Saliva I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados curriculares

Heitor Ceolin Araujo

Nascimento	31.12.1994- Presidente Prudente- SP
Filiação	Luiz Pedro de Araujo Sueli Rejani Ceolin Araujo
2013/2016	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista- UNOESTE.
2017/2018	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, área de Concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
Associações	CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

A Deus,

Que esteve comigo em todos os meus momentos de tristeza, aflito e desespero, sempre sendo a minha força para alcançar a alegria, a sua sabedoria infinita, foi um importante guia em minha trajetória. Sempre dedicarei o meu melhor a ti, pois o seu melhor tens me oferecido.

A minha família,

Pois a verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família. O apoio financeiro e emocional me motivaram e proporcionaram que mais esta etapa em minha vida fosse concluída. Os finais de semana que juntos passávamos eram motivadores, para que mais uma semana fosse iniciada e concluída. A conquista deste título é nossa. Vocês são o lugar seguro onde me sinto amado e protegido. Amo vocês.

Agradecimientos

Agradecimentos

Aos meus **pais**,

Por acreditarem e proporcionarem a realização dos meus sonhos, desde a graduação, que com todo os nossas limitações e dificuldades, nós vencemos. A minha mãe, mulher guerreira e cheia de uma força e disposição não deixava faltar nada, além das diversas ligações diárias, para matar a saudade e me animar nos momentos de maior dificuldade, desespero e ansiedade. Ao meu pai, que com todo o seu jeito rústico, de produtor rural, não mediu esforços para me ajudar, pois sabia o quão importante era esse momento em minha vida, e sempre dizia que sem o estudo, seria muito difícil ter um futuro promissor. Amo vocês.

Ao meu **irmão Renan**,

Que tenhamos ainda inúmeros motivos para continuar comemorando e celebrando juntos, agradeço a Deus todos os dias por ter sua presença em minha vida e que a nossa amizade e companheirismo continuem sempre assim. Você fez falta física em minha vida de pós. Te amo.

A minha **prima- irmã Isadora**,

Desde quando éramos pequenos, é a minha melhor amiga, aquela em que pude confiar, contar os primeiros segredos, dividir cenas em muitos casamentos como padrinhos de aliança e comemorar as primeiras conquistas, obrigado por estar presente sempre em minha vida, me ouvindo e me auxiliando quando preciso. Deus nos escolheu para sermos irmãos. Te amo.

Ao meu **primo- irmão Diego,**

Que desde que eu era pequeno, fazia todas as minhas vontades, embora tenhamos uma diferença um pouco grande de idade, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de minha vida e deu a nossa família, a coisa mais rica que temos, o meu sobrinho Diogo. Amo você.

Aos meus **padrinhos, Roberto e Eliete,**

Além de serem excelentes tios, Deus e meus pais vos escolheram para que tivéssemos uma ligação maior. Desde a minha graduação sempre tive vosso apoio e incentivo. Admiro e amo vocês e que por onde passem, continuem levando vossa animação e carisma.

Aos meus **tios e tias, primos e primas,**

Que juntos comemoramos e festamos muito, desde quando entrei no curso superior e quando consegui realizar o meu sonho de realizar o meu mestrado, agradeço pela nossa união, companheirismo e todos os momentos de alegria que juntos comemoramos, obrigado por terem vocês em minha vida. Amo muito vocês.

A minha orientadora, **Cristina Antoniali,**

Que com muito carinho me recebeu em seu laboratório, e que em meio a tanta correria, sempre estava disposta a ajudar, agradeço os seus conselhos e ensinamentos pois me fizeram crescer na vida pessoal, profissional e acadêmica. Muito obrigado pela sua ajuda e suas inúmeras ideias, fizeram com que o nosso trabalho fosse finalizado com sucesso. Levarei comigo, o seu jeito e sua disposição em ensinar.

A Professora **Ana Cláudia Nakamune**,

Que com todo o seu jeito calmo e sua paciência de ensinar, me fizeram perder o medo da tão temida bioquímica. Obrigado por toda sua colaboração e paciência ao me ensinar cada uma das técnicas utilizadas neste trabalho, foram primordiais para que chegássemos com sucesso nos nossos resultados.

Ao Professor **Juliano Pessan**,

Por compartilhar experiências clínica e acadêmica, pelos conselhos e motivações, e por estar sempre preocupado e disposto a colaborar com o nosso trabalho, as suas ideias foram fundamentais para a elaboração e desempenho no nosso projeto. Minha eterna gratidão.

Ao professor **Wilson**,

Por ter compartilhado inúmeras experiências nas creches municipais e principalmente por ser nosso guia, realizando o contato com a secretaria da educação e de saúde da cidade de Birigui, para que este projeto se tornasse real.

Aos meus **amigos de Laboratório de Farmacologia**,

Jessica Luiza, Jessica Troiano, Murilo, Stella, Luisa, Emilly, Priscila e Leticia, que faziam os dias de trabalho animado, sempre me motivando a ser melhor. Além terem muita paciência de transmitirem conhecimentos sobre farmacologia. A nossa união e companheirismo foram essenciais para que este trabalho fosse finalizado. Agradeço a acolhida e a amizade que criamos dentro e fora do laboratório. Todos os momentos com vocês, foram únicos e especiais.

Aos meus amigos do **Laboratório da Odontopediatria**,

Por estarem sempre dispostos a compartilharem experiências clínicas e de laboratório e pela paciência para me ensinarem algumas metodologias. A vossa amizade foi

combustível para que a jornada fosse mais leve e que o caminho fosse concluído. A minha gratidão.

A Marcele Danelon,

Por ter uma facilidade em transmitir os seus conhecimentos de uma forma simples e fácil, e que além de ser uma excelente profissional, é uma ótima pessoa, está sempre preocupada e disposta em ajudar o próximo. Minha gratidão a você, desde o momento que me acolheu no departamento.

A Priscila Vieira,

Por ter iniciado esta linha de pesquisa, e padronizado as técnicas que foram utilizadas neste trabalho, e também, pela sua disposição e ajuda para sancionar todas as minhas dúvidas. Meu muito obrigado.

A cirurgiã Dentista Ester,

Pessoa na qual tive o prazer de conhecer, conviver e trocar diversas experiências durante o período de coleta das amostras, muito obrigado por ser essa pessoa atenciosa, receptiva e disposta a ajudar.

A toda a equipe da CEI Dionisia,

Por reconhecerem a importância da minha pesquisa, pela ajuda e disposição que tiveram em todo o decorrer das minhas coletas das amostras de saliva. Além da troca de experiências, que pude ter com cada funcionário desta creche, podem ter a certeza que jamais esquecerei que todos fizeram parte desta etapa de minha vida.

A minha orientadora de graduação, Karine Takahashi,

Por me inspirar a seguir na área de Odontopediatria, e ser uma das pessoas que mais me incentiva a querer ir além, pois acredita no meu potencial. Agradeço pelas aulas, pelos ensinamentos de vida, pelos livros que me emprestou enquanto estava me

preparando para a prova do mestrado, e pelo tempo que se dedicava a esclarecer minhas dúvidas, foram essenciais para o fim deste ciclo. Você é especial para mim.

A minha orientadora de iniciação científica, **Graziela Galhano**, Por ser essa pessoa tão rígida que nos motiva a querer sempre a perfeição, pelo apoio e incentivo que sempre me deu, mostrando que eu era capaz de realizar os trabalhos, e de que eu seria capaz também de ir além dos trabalhos e que se eu tivesse determinação e garra eu chegaria onde eu queria. Muito obrigado por tudo.

Ao professor **Robson**, Que com um simples caso clínico, consegue nos dar uma aula, compartilhando toda sua vasta experiência, que vai além da odontologia, que nos faz olhar ao próximo, como um todo, buscando sempre um atendimento com humanidade e qualidade. Agradeço a oportunidade de estar ao seu lado.

A professora **Sandra Aguiar**, Pela sua alegria e energia contagiante, disponibilidade e paixão pelos pacientes com necessidades especiais, que nos motiva e inspira a sairmos da nossa zona de conforto e nos colocarmos no lugar do próximo. O meu muito obrigado por compartilhar as suas experiências e sua energia positiva.

A professora **Cristiane Duque**, Que foi uma conselheira nos dias em que me encontrava triste e desanimado, e me mostrava que para todos os problemas haveria uma solução. Além de ser uma grande inspiração como professora, pelo seu jeito simples e fácil de abordar os temas. Agradeço pela oportunidade de estar sempre por perto me conduzindo, e me motivando.

A minha amiga de graduação **Isabela, e sua família**,

Que mesmo de longe, estão sempre por perto, enviando energias positivas, vibrando em todas as minhas conquistas, além de sempre me deixarem confiante, e por me fazerem acreditar que nada na vida seria por acaso e que minha hora iria chegar. O carinho que tenho por vocês, nos une em uma única família.

A minha amiga **Jordana**,

Pois morar com você foi uma experiência única e inesquecível, criamos laços de irmãos e compartilhávamos nossas angústias, sonhos e desejos, além dos nossos jantares, e nossas risadas, que me aliviam das tensões recebidas durante o dia. Obrigado pela sua presença em minha vida.

Ao meu amigo **Marcio Oliveira**,

Por ser este amigo, que tão bem me acolheu em sua casa assim que cheguei em Araçatuba, e por estar sempre me motivando a querer seguir em frente, na busca dos meus sonhos. Gratidão.

Aos **amigos e amigas Regentenses**,

São inúmeros, não irei citá-los, para não correr o risco de me esquecer, sei que esta frase é clichê, porém verdadeira, no presente momento. Há anos fazem parte da minha história e vibraram e vibram em cada uma de minhas conquistas. É muito bom estar com vocês, pois a vossa amizade me motiva a querer sempre ir além e me fazem acreditar que eu posso e consigo chegar em todos os meus objetivos. Vida longa e amizade eterna para nós.

Aos meus amigos **Carolina, Isabela, Caio e Vanessa**,

Por terem sido os primeiros a me acolherem e tornarem os meus dias em Araçatuba mais suaves e por me darem a oportunidade de compartilharmos inúmeros momentos de alegria e angústia. Sinto que a vida me ofereceu as melhores pessoas para estarem ao meu lado. E nem sei como agradecer-los devidamente!

Aos **Professores e Alunos Departamento de Ciências Básicas,**

Que de maneira direta e indireta contribuíram para o meu crescimento quanto Aluno de Pós-graduação. Agradeço pela amizade que construímos e pelos conhecimentos e ensinamentos que foram compartilhados.

As **Crianças participantes desta Pesquisa,**

Que mesmo não entendendo a importância da minha pesquisa, cederam o material biológico (saliva) para que o meu trabalho fosse executado. Agradeço aos pequenos pois fizeram os meus dias de coleta super animado e descontraído.

Aos **pais ou responsáveis,**

Que entendem a importância da ciência na vida da população e autorizaram os seus filhos a participarem desta pesquisa, pois este trabalho trouxe novas informações e conhecimentos para o campo da pesquisa.

Agradecimentos Institucionais

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, pela oportunidade de usufruir das condições institucionais que proporcionaram a transmissão de conhecimento e a possibilidade de realizar integralmente o curso de pós-graduação, para obtenção do título de Mestre.

Epígrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Resumo

Araujo HC. **A severidade da lesão de cárie induz maior atividade de sistemas antioxidantes e consequente redução do estresse oxidativo na saliva de crianças** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os níveis de biomarcadores de estresse/ dano oxidativo na saliva de crianças e a severidade de cárie dentária classificada pelo Sistema Internacional de Classificação e Gerenciamento de Cárie (ICCMS™, termo em inglês *International Caries Classification and Management System*). Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas de pacientes de 1-3 anos de idade, após 2 horas de jejum, no período da manhã, em uma creche do município de Birigui, SP, Brasil. As crianças foram divididas em 4 grupos (n=30/grupo), de acordo com a severidade de cárie, sendo livre de cárie (grupo A), lesão de cárie em estágio inicial (grupo B), lesão de cárie intermediária (grupo C) e lesão de cárie em estágio avançado (grupo D). Foram avaliados os seguintes biomarcadores salivares de estresse oxidativo: dano oxidativo ou malonaldeído (MDA), mensurado pelo método de TBARS; capacidade antioxidante total (TAC), medida pelo ensaio do poder antioxidante férrico redutor; atividade antioxidante enzimática da superóxido dismutase (SOD) e atividade antioxidante não enzimática do ácido úrico (UA). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, e regressão linear multivariada ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a quantidade de proteína total, TAC, atividade antioxidante enzimática e não-enzimática salivar aumentaram de acordo com a severidade das lesões de cárie, levando a redução do dano oxidativo salivar. Podemos concluir que quanto maior a severidade das lesões de cárie, maior atividade dos sistemas antioxidantes salivares, havendo, conseqüentemente, diminuição gradual do dano oxidativo salivar.

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

Abstract

Araujo HC. **Carious lesion severity induces higher activity of antioxidant systems and consequent reduction of oxidative stress in saliva of children** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the relationship between the levels of biomarkers of oxidative stress / oxidative damage in children's saliva and the severity of dental caries classified by the International Caries Classification and Management System (ICCMS™). Unstimulated saliva samples were collected from patients 0-3 years old after 2 hours of fasting in the morning in a day care center in Birigui municipality. The children were divided into 4 groups (n = 30 / group), according to caries severity, being caries free (group A), early caries lesion (group B), intermediate caries lesion (group C) and advanced carious lesion (group D). The following salivary biomarkers of oxidative stress were evaluated: oxidative or malonaldehyde damage (MDA), measured by the TBARS method; total antioxidant capacity (TAC), as measured by the ferric reducing antioxidant power test; enzymatic antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) and non-enzymatic antioxidant activity of uric acid (UA). Data were analyzed by ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls test, Pearson and Spearman correlation coefficients, and multivariate linear regression (p <0.05). The results showed that the concentration of total protein, TAC, enzymatic antioxidant and non-enzymatic salivary activity increased according to the severity of caries lesions, leading to reduction of salivary oxidative damage. We can conclude that the greater the severity of caries lesions, the greater the activity of the salivary antioxidant systems, and consequently the gradual decrease of salivary oxidative damage.

Key Words: dental caries, oxidative stress, antioxidants, saliva.

Listas de figuras

Figura 1- Concentração de Proteína Total (mg/mL) e substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) na saliva de crianças do grupo A (livres de cáries) e com cárie em diferentes estágios (grupos B- D). Barras representam a média \pm DP. ^{*,#} $p < 0,001$ quando comparado aos outros grupos. **43**

Figura 2- Capacidade Antioxidante Total salivar (TAC, $\mu\text{mol}/\text{L}$ FeSO_4) e concentração de ácido úrico (UA, em mg/mL) na saliva de crianças livres de cárie (grupo 0) e com cárie em diferentes estágios (grupos B-D). Barras representam a média \pm DP. ^{*,#} $p < 0,001$ quando comparado aos outros grupos. **45**

Figura 3- Atividade da superóxido Dismutase (SOD) (UE/mL) na saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). Barras representam \pm DP. ^{*,#} $p < 0,001$ quando comparado aos outros grupos.

Lista de tabelas

- Tabela 1- Correlação de Pearson (valores de r) entre as variáveis dependentes: Proteína total, MDA (Malonaldeído) TAC (Capacidade Antioxidante Total), AU (Ácido Úrico) e SOD (Superóxido Dismutase) **46**
- Tabela 2- Análise de regressão linear multivariada de fatores associados com o dano oxidativo **48**

Listas de abreviatura

CPSI	Cárie precoce severa da infância
FeSO₄	Sulfato ferroso
FRAP	“Ferric reducing antioxidant power”, poder antioxidante férrico reduzido
GPx	Glutathiona peroxidase
L	Litro
MDA	Malonaldeído
mL	Mililitro
mg	Miligrama
EO	Estresse oxidativo
HCA	Heitor Ceolin Araujo
ROS	“ <i>Reactive oxygen species</i> ”, espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
TAC	“ <i>Total antioxidant capacity</i> ”, capacidade antioxidante total
TBARS	“ <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ”, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UA	“Uric acid”, ácido úrico
UE	Unidade enzimática
μL	Microlitro
μmol/L	Micromol por litro
ICDAS	“ <i>International Caries Detection and Assessment System</i> ”, Sistema Internacional de Detecção e Avaliação da Cárie
ICCMSTM	“ <i>International Caries Classification and Management System</i> ”, Sistema Internacional de Classificação e Gerenciamento de Cárie

Sumário

Sumário

Introdução	28
Materiais e métodos	29
Resultados	32
Discussão	33
Agradecimento	38
Referências	38
Figuras	43
Tabelas	46
Material suplementar	48
Anexo I- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	49

A severidade da lesão de cárie induz maior atividade de sistemas antioxidantes e consequente redução do estresse oxidativo na saliva de crianças (Title)

(Carious lesion severity induces higher activity of antioxidant systems and consequent reduction of oxidative stress in saliva of children)

Lesão de cárie reduz estresse oxidativo salivar em crianças (Running head)

Heitor Ceolin Araujo^{1,2}, Ana Cláudia Melo Stevanato Nakamune^{3,4}, Wilson Galhego Garcia⁴, Juliano Pelim Pessan^{1,2}, Cristina Antoniali^{1,3,4*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, ²Departamento de Odontologia Social e Infantil, ³Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,

⁴Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP– Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*Autor para correspondência

Cristina Antoniali

Faculdade de Odontologia

Departamento de Ciências Básicas

Univ Estadual Paulista- UNESP

Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 – Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Tel/Fax: +55-18-3636-2816

E-mail: cristina.antoniali@unesp.br (C. Antoniali)

1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os níveis de biomarcadores de estresse/ dano oxidativo na saliva de crianças e a severidade de cárie dentária classificada pelo Sistema Internacional de Classificação e Gerenciamento de Cárie (ICCMS™, termo em inglês *International Caries Classification and Management System*). Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas de pacientes de 1-3 anos de idade, após 2 horas de jejum, no período da manhã, em uma creche do município de Birigui, SP, Brasil. As crianças foram divididas em 4 grupos (n=30/grupo), de acordo com a severidade de cárie, sendo livre de cárie (grupo A), lesão de cárie em estágio inicial (grupo B), lesão de cárie intermediária (grupo C) e lesão de cárie em estágio avançado (grupo D). Foram avaliados os seguintes biomarcadores salivares de estresse oxidativo: dano oxidativo ou malonaldeído (MDA), mensurado pelo método de TBARS; capacidade antioxidante total (TAC), medida pelo ensaio do poder antioxidante férrico redutor; atividade antioxidante enzimática da superóxido dismutase (SOD) e atividade antioxidante não enzimática do ácido úrico (UA). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, e regressão linear multivariada ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a quantidade de proteína total, TAC, atividade antioxidante enzimática e não-enzimática salivar aumentaram de acordo com a severidade das lesões de cárie, levando a redução do dano oxidativo salivar. Podemos concluir que quanto maior a severidade das lesões de cárie, maior atividade dos sistemas antioxidantes salivares, havendo, conseqüentemente, diminuição gradual do dano oxidativo salivar.

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

2.INTRODUÇÃO

A cárie precoce severa da infância (CPSI), afeta crianças menores de 3 anos de idade e é definida como qualquer sinal de cárie em superfície dentária lisa (American Academic of Pediatric Dentistry) que pode surgir logo após a erupção dos primeiros dentes e quando não tratada, progride de forma rápida (Colak et al., 2013). A cárie dentária é a doença bucal mais prevalente e que afeta grande parte da população mundial (Hegde et al., 2014; Volckova et al., 2014). Quando as lesões de cárie são diagnosticadas precocemente, é possível a realização de tratamentos menos invasivos e traumáticos (Volgenant et al., 2017). Além disso, a detecção das lesões de cárie em diferentes estágios favorece a aplicação de tratamentos diferenciados e mais eficazes na prática clínica. Baseado no Sistema Internacional de Detecção e Avaliação da Cárie (ICDAS, do inglês *International Caries Detection and Assessment System*), que já é bem estabelecido e amplamente utilizado (Ismail et al., 2015), o Sistema Internacional de Classificação e Gerenciamento de Cárie (ICCMS™, termo em inglês *International Caries Classification and Management System*), permite que os dentistas integrem e sintetizem informações sobre a condição dentária, incluindo o risco de cárie, a fim de planejar, gerenciar e revisar sua prática clínica, bem como ações de saúde pública (Pitts et al., 2013).

A saliva tem sido utilizada como fluido biológico para o diagnóstico e prognóstico de doenças sistêmicas e orais em substituição às amostras de plasma, uma vez que a coleta é feita de forma não invasiva e segura (Xinggun et al., 2017; Liu et al., 2017). Com relação à cárie dentária, concentrações mais elevadas de proteína total foram encontradas na saliva de crianças com CPSI (Silva et al., 2016) e de crianças com cárie quando comparadas ao grupo livre de cárie (Tulunoglu et al., 2006). Na saliva, os biomarcadores do estresse oxidativo são estáveis, encontrados em concentrações detectáveis e refletem vias de oxidação específicas associadas à cárie e periodontite (*apud* Tóthová et al., 2015). Estudos correlacionaram concentrações mais elevadas de proteína total salivar com a maior capacidade antioxidante total da saliva (TAC, do termo em inglês *total antioxidant capacity*) em pacientes com lesões de cárie (Silva et al., 2016; Preethi et al., 2010; Dodwad et al., 2011). Por outro lado, concentrações reduzidas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do termo em inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) foram observadas na saliva de crianças com cárie severa da infância quando comparadas com crianças livres de lesões de cárie, ou em adultos com lesões de cárie ativa (17-50 anos de idade) (Silva et al., 2016; Sarode et al. al., 2012). Em acréscimo, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) salivar e o ácido úrico (UA) foram significativamente maiores na saliva de crianças com cárie severa da infância quando comparado ao grupo de

crianças livres de cárie (Silva et al., 2016), sugerindo que a redução do dano oxidativo na saliva de pacientes com lesões de cárie poderia ser uma consequência do aumento da atividade dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Por outro lado, a diminuição das concentrações de glutathione, um antioxidante enzimático, na saliva de pacientes com lesões de cárie ativa poderia sugerir uma tendência à diminuição do status antioxidante (Oztürk et al., 2008). Esses achados contraditórios sugerem que o dano oxidativo e os marcadores de status antioxidante podem ser alterados dependendo da patogênese e progressão da doença.

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre os níveis de biomarcadores de estresse/dano oxidativo na saliva de crianças e a severidade de cárie dentária, classificada pelo índice ICCMSTM. A hipótese do estudo foi que a severidade das lesões de cárie influencia os níveis de antioxidantes salivares, ou seja, nos estágios iniciais das lesões de cárie haveria um aumento dos marcadores de dano oxidativo, enquanto em estágios mais avançados haveria a ativação de sistemas salivares antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos pacientes

Todos os procedimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP- Univ. Estadual Paulista (CAAE 71063417.4.0000.5420).

Foram selecionadas 120 crianças de 1 a 3 anos, com média de idade $1,9 \pm 0,75$ anos, que participavam de um programa educativo-preventivos de saúde bucal, do Centro de Educação Infantil Dionisia Miragaia Carmine, na cidade de Birigui, São Paulo, Brasil, localizada, a uma latitude $21^{\circ}17'19''$ sul, longitude $50^{\circ}20'24''$ oeste, e a uma altitude de 450 metros, temperatura média anual de $22,1^{\circ}$ C e com o índice de desenvolvimento humano (IDH) de 0,780.

Inicialmente, uma reunião foi realizada com os diretores da creche e com os pais/cuidadores das crianças, para explicação do protocolo e esclarecimento de dúvidas. Em seguida, os termos do consentimento livre e esclarecido foram distribuídos a todos os pais/cuidadores das crianças. Os critérios de exclusão de crianças foram: crianças que não entregaram os termos assinados, crianças portadoras de doenças sistêmicas, crianças que não apresentavam dentes erupcionados e crianças que apresentaram mais de uma classificação do

ICCMS™. Foram examinadas sob luz natural com o auxílio de um espelho clínico, sonda OMS e gaze para secagem, e foram divididas em 4 grupos (n = 30/grupo) de acordo com critérios do ICCMS™ (Pitts et al., 2014), por um cirurgião-dentista calibrado e experiente na área (HCA). As crianças foram incluídas nos seguintes grupos:

Grupo A. Livres de cárie

Grupo B. Lesão inicial de cárie- lesão de cárie sem cavitação.

Grupo C. Lesão intermediária de cárie- Lesão de cárie com cavitação em esmalte

Grupo D. Carie em estágio avançado- Lesão de cárie com cavitação em dentina

Nos grupos A e C, 46,6% eram do gênero masculino, enquanto nos grupos B e D houve distribuição igualitária entre gêneros.

O tamanho da amostra foi determinado com base no estudo de Silva et al. (2016), no qual foram avaliados marcadores de estresse oxidativo em crianças livres de cárie e com CPSI.

3.2 Coleta da saliva

Amostras de saliva não estimulada foram coletadas entre as 7:00 e as 8:00 da manhã, após 2 horas de jejum, com a finalidade de minimizar variações relacionadas ao ritmo circadiano, bem como influência de alimentos e bebidas ingeridos recentemente. A higiene bucal foi feita em casa, pelos pais ou responsáveis, utilizando apenas água e escova de dente sem produtos fluoretados. Nos casos de intercorrências (choro intenso, não colaboração), o procedimento foi interrompido sem uma nova tentativa. As amostras de saliva foram coletadas com o algodão do Salivette®, posicionado e mantido no espaço sublingual por 5 minutos. As amostras coletadas foram mantidas em gelo, sendo posteriormente foram centrifugadas a 5500 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram divididos em 5 alíquotas (100-250µL) e armazenados a -80 °C até o momento das análises.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas através de reações colorimétricas, analisadas em leitora de micro placas Power Wave 340-Biotek, em placas de 96 poços, com exceção da SOD, que foi lida em placas de 24 poços, usando apenas o primeiro poço, por leitura.

3.3 Determinação da concentração de proteína total

A quantificação de proteínas foi feita em alíquotas de 20 µL de saliva pelo método de Lowry et al. (1951). Foi utilizada uma curva padrão de diferentes concentrações de albumina de soro bovino, variando de 0.02-0.08 mg/mL. Quando concentrações acima do último ponto da curva

padrão foram detectadas, as amostras foram diluídas e uma nova determinação foi feita. Os valores de absorvância foram determinados a 660 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

3.4 Quantificação de malondialdeído (MDA)

O MDA é um dos produtos de peroxidação lipídica, avaliado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e considerado um biomarcador de dano oxidativo. Foi determinado como descrito por Buege e Aust (1978). O ácido tricloroacético (10% m/v) foi adicionado a 125 µL de saliva para precipitar as proteínas e acidificar a solução. Esta mistura foi então centrifugada (1000 x g, 3 min) e, posteriormente, o ácido tiobarbitúrico (TBARS, 0,67% m/v) foi adicionado a solução. A solução foi mantida em banho-maria a 100° C por 15 min. A absorvância foi lida a 535 nm e o coeficiente de absorção molar utilizado foi de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em µmol/L/mg de proteína.

3.5 Capacidade antioxidante total salivar (TAC)

A capacidade antioxidante total salivar foi avaliada pelo poder antioxidante de redução férrica (FRAP, do termo em inglês *Ferric-Reducing Ability of Plasma*), previamente padronizada por Benzie & Strain (1996). Este método baseia-se na redução do complexo férrico tripiridil-triazina (Fe^{3+} TPTZ) para formar Fe^{2+} em meio ácido. Uma alíquota de saliva (15µL) foi utilizada. A absorvância da solução foi determinada a 595 nm usando uma curva padrão de sulfato ferroso com valores variando entre 20-260 µmol/L FeSO_4 . Os resultados foram expressos em µmol/L FeSO_4 .

3.6 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

Com base na inibição da auto-oxidação do pirogalol, a atividade da SOD foi determinada na saliva pelo método de Maklund (1985). Foi utilizada uma alíquota de saliva (20 µL) previamente diluída em Tris (1:10 v/v). A absorvância foi detectada a 420 nm. Foram feitas 5 leituras a cada 1 minuto. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da auto-oxidação do pirogalol foi considerada como uma unidade de atividade enzimática. Os resultados foram expressos em UE/mL.

3.7 Ácido úrico

Um kit comercial (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil) foi utilizado para determinação do ácido úrico na saliva (20 µL), baseado no método enzimático de Trinder, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/mL.

3.8. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm DP (desvio padrão). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro- Wilk) e por haver distribuição normal, foram submetidos a ANOVA a um critério, seguida do teste *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. A relação entre as variáveis dependentes foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson, enquanto a relação entre grupos (ICCMSTM) e variáveis dependentes foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman (Graph Pad, versão 3.0, GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, USA). Valores de $r > \pm 0.50$ foram considerados correlação moderada, valores de $r > \pm 0.70$ foram considerados correlação forte, valores de $r > \pm 0.90$ foram considerados correlação muito forte (Makuka, 2012). O teste de regressão linear multivariada foi aplicado para verificar a influência dos grupos (ICCMSTM), idade (em meses), e número de lesões de cárie no dano oxidativo (software SPSS versão 17, SPSS Inc., Chicago). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

O número de lesões nos grupos B (cárie inicial), C (cárie intermediária) e D (cárie avançada) foi de 1.93 ± 0.94 , 1.83 ± 0.87 e 2.57 ± 1.10 , sem diferenças significativas entre os grupos.

A concentração de proteína total salivar foi maior ($p < 0.001$) no grupo D (cárie avançada) em relação aos demais grupos. No grupo C (cárie intermediária), foi maior ($p < 0.001$) que nos grupos A (livres de cárie) e B (Cárie em estágio inicial) e não foram observadas diferenças entre os grupos A e B ($p > 0.05$) (Figura 1). Observamos correlação positiva moderada entre a concentração de proteína total salivar e os diferentes severidade das lesões de cárie (Spearman $r = 0.6998$, $p < 0.0001$).

As concentrações salivares de MDA foram menores ($p < 0.0001$) no grupo de cárie avançada (Grupo D) do que nos outros grupos. No grupo C (cárie intermediária), os valores

foram menores que os encontrados nos grupos A e B e maiores que no grupo D ($p < 0.001$). Não foram observadas diferenças entre os grupos A e B ($p > 0.05$) (Figura 1). Observamos uma correlação negativa forte entre a progressão das lesões de cárie e os valores de MDA salivar (Spearman $r = -0.8519$, $p < 0.0001$). Observamos também uma correlação negativa moderada entre os valores de MDA e proteínas totais salivares (Tabela 1). A tabela 2 apresenta resultados da análise de regressão linear multivariada entre o dano oxidativo (MDA) e a severidade de cárie (ICCMSTM), número de lesões e idade. Foi observado que a severidade apresenta correlação negativa forte com o MDA, enquanto fraca correlação positiva foi observada com relação ao número de lesões. Não houve correlação significativa entre a idade e os valores de MDA (Tabela 2).

Os valores da TAC foram maiores ($p < 0.001$) na saliva de crianças do grupo D quando comparados aos demais grupos. No grupo C, o valor do TAC foi maior que nos grupos A e B ($p < 0.001$). Além disso, não foram observadas diferenças entre os grupos A e B ($p > 0.05$) (Figura 2). Uma correlação positiva forte foi observada entre a severidade e TAC salivar (Spearman $r = 0.8753$, $p < 0.0001$). Além disto, correlação negativa muito forte foi observada entre TAC e MDA salivar (Tabela 1).

Os valores de ácido úrico salivar estavam aumentados ($p < 0.0001$) no grupo D em relação aos demais grupos. No grupo C, os valores de ácido úrico foram maiores que os grupos A e B, ($p < 0.001$), enquanto nos grupos A e B não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) (Figura 2). Notamos uma forte correlação positiva (Spearman $r = 0.8814$, $p < 0.0001$) entre os valores de UA e os grupos. Além disto, houve correlação positiva muito forte entre os valores de UA e TAC salivar, porém correlação negativa forte entre UA e MDA salivar (Tabela 1).

A atividade da SOD foi maior ($p < 0.001$) no grupo D do que nos demais grupos. No grupo C, a atividade da SOD foi maior que os grupos A e B ($p < 0.001$). Diferenças significativas não foram observadas entre os grupos A e B ($p > 0.05$) (Figura 3). Houve correlação positiva muito forte entre severidade de cárie e os valores de atividade da SOD salivar (Spearman $r = 0.8994$, $p < 0.0001$). Também foi observada correlação negativa entre SOD e dano oxidativo salivar (Tabela 1).

5. DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO

Neste estudo, foi comprovada a hipótese de que a severidade da cárie dentária influencia o perfil antioxidante da saliva, uma vez que quanto mais avançada a lesão da cárie (esmalte e dentina), menor o dano oxidativo salivar decorrente da maior atividade de sistema antioxidantes

(não-enzimáticos e enzimáticos) Este estudo que avaliou o perfil de biomarcadores de estresse oxidativo em saliva de crianças de 1 a 3 anos com cárie em diferentes estágios de progressão, sem lesões cavitadas e com lesões cavitadas em esmalte e dentina.

As lesões de cárie em estágio inicial (sem cavitação) não alteram o perfil salivar em crianças, os resultados do presente estudo mostraram que não houve alteração da concentração de proteínas totais ou de biomarcadores de estresse oxidativo na saliva de crianças com lesões de cárie sem cavitação quando comparada à saliva de crianças livres de cárie. Por outro lado, quanto maior a severidade das lesões cavitadas, maior a alteração na concentração de proteínas e de biomarcadores salivares. Os dados mostram a importância do ICCMSTM para uma compreensão mais detalhada dos resultados apresentados, e poderão contribuir para direcionar protocolos de futuros estudos clínicos e bioquímicos na área de cariologia

As concentrações de proteínas quantificadas na saliva de crianças com lesões de cárie em esmalte e dentina (grupos C e D, respectivamente), foram semelhantes às concentrações de proteínas quantificadas previamente na saliva de crianças CPSI, as quais foram agrupadas sem estadiamento da cárie (Silva et al., 2016), e maiores que as encontradas em crianças livres de cáries. Não houve diferenças entre as concentrações de proteínas salivares em crianças livres de cáries (grupo A) e em crianças com cáries não cavitadas (grupo B). Resultados prévios obtidos por Jurczak et al. (2017) demonstraram que a concentração de proteínas salivares em crianças com lesões de cárie em dentina (ICDAS=5-6; 1.86 mg/mL) era maior que a encontrada na saliva de crianças com lesões de cárie não cavitadas (ICDAS= 1-2; 1.79 mg/mL), ambos com valores superiores aos obtidos para crianças livre de cárie (1.65 mg/mL). As concentrações de proteínas salivares quantificadas nos diferentes grupos do estudo de Jurczak et al. (2017) foram quase 2 vezes maiores que as encontradas nos grupos avaliados no presente estudo, possivelmente pela utilização de amostras de saliva estimulada por mastigação, o que está associado a valores de proteínas aumentados em comparação a saliva não estimulada, e pelo uso de método de quantificação de proteínas diferente do método de Lowry. No presente estudo, foi utilizado o método de Lowry (Sözgen et al., 2006) pela padronização, facilidade de execução e comprovada eficácia para quantificação de proteínas em saliva (Silva et al., 2016; Cunha-Correia et al., 2014). Em contraste, no estudo de Tulunoglu et al. (2006), os valores de proteína salivar encontrados em crianças de 7-10 anos (6.5 mg/mL), não foram estatisticamente diferentes dos valores encontrados em crianças de mesma idade livres de cárie (3.5 mg/mL), provavelmente pela grande variabilidade nos resultados dos grupos. É importante observar que os valores de concentração de proteínas na saliva de crianças (7-10 anos) encontrados por estes autores foram muito maiores que os encontrados em nosso estudo, uma vez que a concentração

de proteína salivar aumenta de acordo com o aumento da idade da criança (Tulunoglu et al., 2006).

Nossos resultados sugerem que a progressão da lesão de cárie aumenta a quantidade de proteínas salivares, uma vez que houve correlação positiva moderada entre estas variáveis. Lesões de cárie em dentina estão associadas à degradação mineral e de matriz orgânica por atividade, principalmente, de enzimas colagenolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Foram demonstradas maiores concentrações de MMP-8 na saliva de indivíduos com lesões de cárie em dentina (Hedenbjörk-Lager et al., 2015). Além disso, a análise proteômica da saliva de indivíduos com cárie (CPOD de 5 a 10 e CPOD de 1 a 4) demonstrou maior expressão de proteínas antimicrobianas e complexos proteicos resistentes a degradação como mucina 7, mucina 5B, cistatina S e cistatina SN, proteína rica, salina básica de prolina e histatina 11 (Wang et al., 2018).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) promovem danos ao DNA, lipídeos, proteínas e enzimas, destruindo diferentes tecidos. A reação entre ERO e lipídeos leva a peroxidação lipídica e o MDA é o produto final desta reação. Assim, a quantificação do MDA determina o dano oxidativo (Guentsch et al., 2008) em tecidos ou em fluidos biológicos. Neste estudo, foi demonstrado que as concentrações de MDA salivar foram gradativamente diminuídas em crianças com lesões de cárie cavitadas (em esmalte e dentina) quando comparadas às crianças sem cárie ou apresentando lesões não cavitadas. Estes resultados corroboram os dados obtidos previamente, os quais demonstraram que as concentrações de MDA na saliva de crianças com cárie severa da infância ($0.0019 \mu\text{mol/L/mg}$ proteína) foram menores que os observados em saliva de crianças livres de cárie ($0.0039 \mu\text{mol/L/mg}$ proteína). Porém, estudos recentes (Subramanyam et al., 2018; Ahmadi-Motamayel et al., 2018) mostraram resultados controversos, uma vez que as concentrações salivares de MDA em crianças de 6 anos idade ($0.26 \mu\text{mol/L}$) e em pacientes de 15-19 anos de idade com lesões de cárie (0.71 nmol/mL) estavam aumentadas quando comparados aos respectivos controles livres de cárie. Diferenças metodológicas poderiam levar as discrepâncias observadas em relação aos resultados obtidos em nosso estudo. É importante notar que em ambos os estudos acima citados, os valores de MDA não foram normalizados pela concentração de proteínas salivares. Como a concentração de proteínas salivares é aumentada pela presença e progressão da cárie dentária, é necessário que os valores de concentração de MDA sejam normalizados pela quantidade de proteína salivares encontradas em cada grupo. Forte correlação negativa foi observada entre a progressão das lesões de cárie e os valores de MDA salivar, o que reforça os resultados obtidos. Além disto, a regressão linear multivariada mostrou que a severidade de cárie é a variável que mais

se associa ao dano oxidativo salivar. Estes resultados mostram que a progressão das lesões de cárie reduz o dano oxidativo salivar.

Foram avaliados os mecanismos que poderiam levar a redução do dano oxidativo salivar. A quantificação da TAC fornece informações sobre o equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, de modo que a quantidade inadequada de antioxidantes contribui para o dano oxidativo (Zarban et al., 2016). Observamos que TAC da saliva aumenta com severidade da lesão de cárie (dentina ou em esmalte) e que não há diferença na TAC salivar entre crianças com lesões de cárie iniciais ou livres de cárie. Previamente foi demonstrado que há aumento da TAC na saliva de crianças com cárie severa da infância (Silva et al., 2016) e em crianças (idade média 2.74 anos) com lesões de caries cavitadas (Jurczak et al., 2017), quando comparado as crianças sem cárie ou com caries não cavitadas. No entanto, em pacientes de 14-18 anos com lesões de cárie, foi relatada uma diminuição da TAC salivar quando comparada aos pacientes livres de cárie, apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos (Rahmani et al., 2015). Em jovens de 15-19 anos com lesões de cárie ativa também não foi observada diferença na TAC salivar (0.17 mol/mL) quando comparados aos jovens sem cárie dentária (0.17 mol/mL) (Ahamadi- Montaynel et al., 2018). A idade dos pacientes incluídos nos estudos acima citados pode ter influenciado a quantificação diferencial da TAC salivar em relação ao nosso estudo. Novos estudos seriam necessários para comparações da TAC salivar entre grupos etários distintos.

No presente estudo foi observado que a TAC aumentada na saliva de crianças com lesões de cáries cavitadas (em dentina e esmalte) determina os menores índices de dano oxidativo na saliva destas crianças. Este resultado reforça a sugestão que a TAC salivar seria um marcador para a atividade de cárie dentária em crianças como proposto previamente por Krumar et al. (2015). A TAC é um parâmetro que reflete o efeito combinado de antioxidantes, principalmente não-enzimáticos presentes no plasma e fluídos corporais (Baser et al., 2015). Como a TAC está associada à atividade de sistemas antioxidantes não enzimáticos, avaliou-se a atividade antioxidante do ácido úrico (UA) salivar em função de diferentes estágios das lesões de cárie. O UA é um poderoso antioxidante que elimina ERO ou radicais livres no plasma (Ames et al., 1981). Como foi demonstrada correlação positiva entre a quantidade de UA no plasma e na saliva de pacientes (Goll & Mookerjee 1978; Nunes et al., 2011, Riss et al., 2018), a saliva poderia ser um substituto do teste sanguíneo para avaliação deste biomarcador. Em pacientes adultos saudáveis (idade média de 46 anos), a concentração encontrada de UA na saliva não estimulada foi de 4.80 mg/dL, (Bakhtiari et al., 2017) enquanto que em crianças saudáveis de 6 a 12 anos de idade, a concentração de UA na saliva não estimulada foi 1.40 mg/dL. Apenas

Silva et al. (2016) quantificaram previamente a concentração deste antioxidante na saliva de crianças com cárie, e assim como no presente estudo, observaram aumento do UA (7.05 mg/mL) salivar em relação as crianças livres de cárie (5.02 mg/ mL). Neste estudo, foi verificado que a os maiores valores de UA foram encontrados na saliva de crianças com lesões de cárie em dentina, seguido pelos valores encontrados na saliva de crianças com lesão de cárie em esmalte. Ainda, a progressão das lesões de cárie leva ao aumento do UA salivar reduzindo o dano oxidativo. Estes resultados sugerem que em crianças com lesões de cárie o dano oxidativo salivar é menor devido ao maior efeito antioxidante do UA salivar e corroboram a sugestão que o aumento do UA seria uma resposta adaptativa de proteção contra o excesso de radicais livres (Ames et al., 1981).

Foi avaliado também se atividade antioxidante enzimática poderia contribuir para o menor dano oxidativo observado em saliva de crianças com lesões de cárie. Para isto, foi avaliado especificamente a atividade da SOD que é o sistema antioxidante enzimático considerado como a primeira linha de defesa contra os radicais de oxigênio (Keller et al., 1998). A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Halliwell, 1999). O ânion superóxido diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Saran et al., 1990; McIntyre et al., 1999), o qual é um dos mecanismos naturais inespecíficos de defesa da cavidade bucal contra multiplicação bacteriana. A fonte de NO oral pode estar relacionada à redução enzimática do nitrato/nitrito da dieta e da conversão do aminoácido L-arginina pela NO sintase, uma enzima expressa em glândulas salivares e outros tecidos. Estudos *in vitro* demonstraram que o nitrito salivar sob condição ácida tem efeito inibitório sobre o crescimento e a sobrevivência de bactérias cariogênicas (*apud* Bayindir et al., 2005) e que pacientes com alto CPOD e baixo índice de higiene oral (OHI-S, do termo em inglês *oral hygien index simplified*) apresentaram concentrações de NO significativamente maiores na saliva e na placa bacteriana do que aqueles com baixo CPOD e alto OHI-S (Bayindir et al., 2005), sugerindo que a produção de NO pode ser um mecanismo de defesa do hospedeiro quando a cárie dentária aumenta ou a higiene bucal está prejudicada.

Em crianças de 0-3 anos com CSPI foi observado (Silva et al., 2016) um aumento na atividade de SOD salivar quando comparados a crianças livres de cárie. Este aumento na atividade da SOD salivar também foi observado em pacientes de 25-50 anos com carie ativa quando comparados a pacientes livres de cárie (Hedge et al., 2014). No presente estudo, mostramos que com a progressão das lesões cavitadas há um aumento da atividade da SOD salivar, e que o aumento da atividade da SOD contribuiu para a redução gradual do dano oxidativo salivar em crianças com lesões de cárie em esmalte e dentina. Os resultados

analisados conjuntamente associados, sugerem que o aumento da atividade da SOD na saliva de crianças com lesões de cárie ativa poderia ser considerado como mecanismo de defesa do hospedeiro contra a cárie dentária, uma vez que a atividade aumentada da SOD na saliva aumentaria a biodisponibilidade de NO, favorecendo sua atividade anticariogênica.

Até o momento, não foi possível identificar os mecanismos que levam ao aumento da atividade antioxidante não enzimática e enzimática em saliva de crianças com lesões de cárie, enfatizando a necessidade de novos estudos para identificação destes mecanismos.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, podemos concluir que quanto maior a severidade das lesões de cárie, maior atividade dos sistemas antioxidantes e da TAC salivar e consequentemente redução gradual do dano oxidativo salivar.

6. Agradecimento

Agradecemos ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório pela colaboração na análise de regressão multivariada dos resultados obtidos.

6.1 Fontes de Financiamento

Este estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/22180-9).

7. REFERÊNCIAS

Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Mahdavinezhad A, Jamshidi Z, Darvishi M. Salivary and Serum Antioxidant and Oxidative Stress Markers in Dental Caries. *Caries Res.* 2018 Apr 26;52(6):565-569.

American Academic of Pediatric Dentistry. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. *Reference Manual.* 2016; 40(4):18-19.

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

Baser U, Gamsiz-Isik H, Cifcibasi E, Ademoglu E, Yalcin F. Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. *Saudi Med J*. 2015 Jul;36(7):856-61.

Bayindir YZ, Polat MF, Seven N. Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. *Caries Res*. 2005 Mar;39(2):130-3.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996 Jul;239(1):70-6.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52(C):302-310.

Colak H, Dülgergil CT, Dalli M, Hamidi MM. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med*. 2013 Jan;4(1):29-38.

Cunha-Correia AS, Neto AH, Pereira AF, Aguiar SM, Nakamune AC. Enteral nutrition feeding alters antioxidant activity in unstimulated whole saliva composition of patients with neurological disorders. *Res Dev Disabil*. 2014 Jun;35(6):1209-15.

Dodwad R, Betigeri A. V, Preeti B. P. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent*. 2011 Mar;2(1):17–20.

Goll RD, Mookerjee BK: Correlation of biochemical parameters in serum and saliva in chronic azotemic patients and patients on chronic hemodialysis. *J Dial*. 1978 Jul;2(4): 344-399.

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

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999 Oct;31(4):261-72.

Hedenbjörk-Lager A, Bjørndal L, Gustafsson A, Sorsa T, Tjäderhane L, Åkerman S, Ericson D. Caries correlates strongly to salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res*. 2015;49(1):1-8.

Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical Indicators of Dental Caries in Saliva: An in vivo Study. *Caries Res*. 2014 Feb;48(2):170-3.

Ismail AI, Pitts NB, Tellez M. The International Caries Classification and Management System (ICCMS™) an example of a Caries Management Pathway. . *BMC Oral Health*. 2015;15(1):1-13.

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

Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 1998 Jan 15;18(2):687-97.

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

Liu HJ, Guo YY, Li DJ. Predicting novel salivary biomarkers for the detection of pancreatic cancer using biological feature-based classification. *Pathol Res Pract*. 2017 Apr;213(4):394-399.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal Biological Chemistry*. 1951 May;193(1):265-75.

Maklund S. Pyrogallol auto oxidation. In Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press Boca Rato. 1985;243-247.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):539-45.

Mukaka MM. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012 Sep; 24(3): 69–71.

Nunes LA, Brenzikofer R, Macedo DV: Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. *Clin Biochem*. 2011 Dec;44(17-18):1440-4.

Öztürk L K, Furuncuoglu H, Atala M H, Uluköylü O, Akyüz S, Yarat A. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione: lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological*. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Nov; 41(11):956-959.

Pitts NB, Ismail AI, Martignon S, Ekstrand K, Douglas GVA, Longbottom C. ICCMS™ Guide for Practitioners and Educators. Global Collaboratory for Caries Management. 2014 Dec: 1-28.

Pitts NB, Ekstrand KR; ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013 Feb;41(1):41-52.

Preethi B P, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: an in vivo. *Indian J Clin Biochem*. 2010 Oct; 25(4): 425–428.

Rahmani M, Ghorchi V, Rezaei F, Vaisi-Raygani A. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in High School Students. *Glob J Health Sci*. 2015 Jul 31;8(4):89-94

- Riis JL, Bryce CI, Matin MJ, Stebbins JL, Huisstede OKLV, Granger DA. The validity, stability, and utility of measuring uric acid in saliva. 2018; 12(6):583-596.
- Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun*. 1990;10(4-5):221-6.
- Sarode G, Shelar A, Sarode S, Bagul N. Association between dental caries and lipid peroxidation in saliva. *Int J Oral Maxillofacial Path*. 2012 Jul;3(2):02-04.
- Silva PV, Troiano JA, Nakamune ACMS, Pessan J, Antoniali C. Increased activity of the antioxidants systems modulated the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2016 Oct;70:62-65.
- Sozgen K, Cekic DS, Tutem E, Resat A. Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium. *Talanta*. 2006 Feb 28;68(5):1601-1609.
- Subramanyam D, Gurunathan D, Gaayathri R, Vishnu Priya. Comparative evaluation of salivary malondialdehyde levels as a marker of lipid peroxidation in early childhood caries. *Eur J Dent*. 2018 Mar; 12(1):67-70.
- Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Oct;5(73):1-23.
- Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *Int J Paediatr Dent*. 2006 May;16(3):186-91.
- Volckova M, Linhartova PB, Trefna T, Vlazny J, Musilova K, Kukletova M, Kukla L, Holla LI. Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries. *Caries Res*. 2014 Nov; 48(1):40-47.
- Volgenant CM, Zaura E, Brandt BW, Buijs MJ, Tellez M, Malik G, Ismail AI, Ten Cate JM, van der Veen MH. Red fluorescence of dental plaque in children -A cross-sectional study. *J Dent*. 2017 Mar;58:40-47.
- Wang K, Wang Y, Wang X, Ren Q, Han S, Ding L, Li Z, Zhou X, Li W, Zhang L. Comparative salivary proteomics analysis of children with and without dental caries using the iTRAQ/MRM approach. *J Transl Med*. 2018 Jan;16(1):1-13.
- Xingqun C, Xuedong Z, Xin X. Application of saliva in disease diagnosis. 2016 Dec;36(1):647-653.
- Zarban A, Ebrahimipour S, Sharifzadeh GR, Rashed-Mohassel A, Barkooi M. Comparison of Salivary Antioxidants in Children with Primary Tooth Abscesses before and after Treatment in Comparison with Healthy Subjects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Dec;18(12):3315-18.

8. LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1- Concentração de Proteína Total (mg/mL) e substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, em $\mu\text{mol/mg}$ proteína) na saliva de crianças do grupo A (livres de cáries) e com cárie em diferentes estágios (grupos B- D). Barras representam a média \pm DP. *, # p <0,001 quando comparado aos outros grupos.

Figura 2- Capacidade Antioxidante Total salivar (TAC, $\mu\text{mol/L FeSO}_4$) e concentração de ácido úrico (UA, em mg/mL) na saliva de crianças livres de cárie (grupo 0) e com cárie em diferentes estágios (grupos B-D). Barras representam a média \pm DP. *,# p <0,001 quando comparado aos outros grupos.

Figura 3- Atividade da superóxido Dismutase (SOD) (UE/mL) na saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). Barras representam \pm DP. *,# p <0,001 quando comparado aos outros grupos.

Figura 1

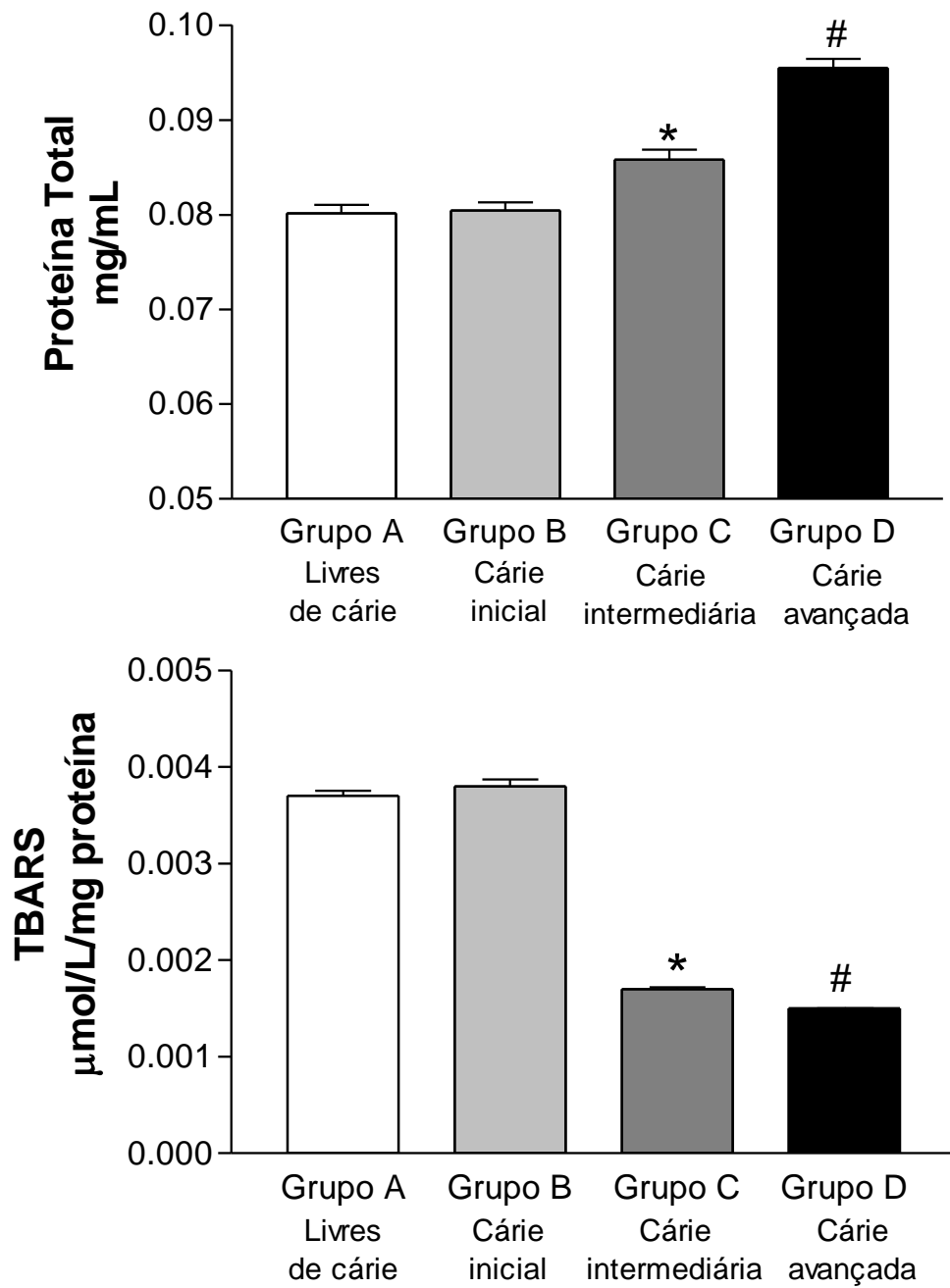


Figura 2

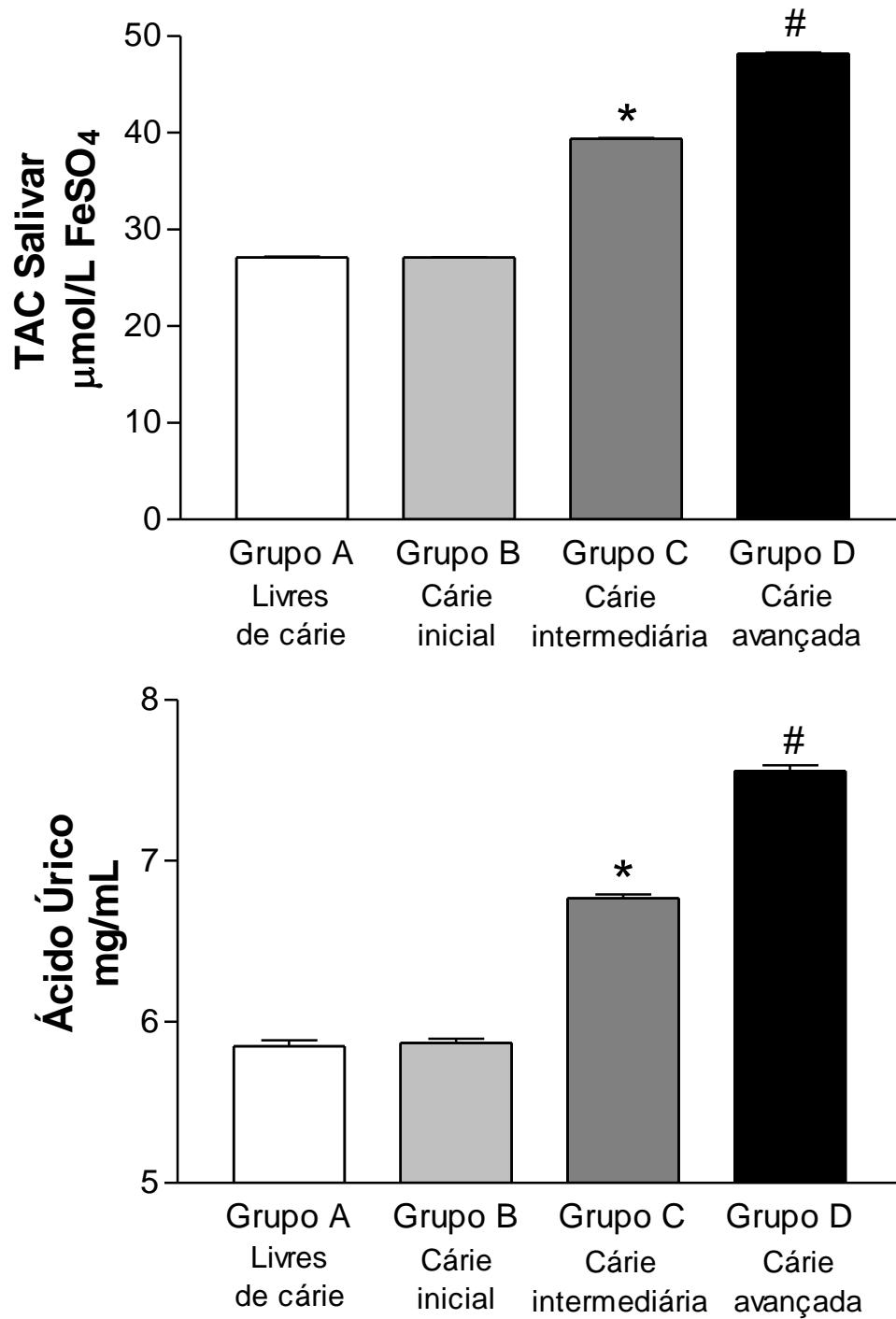


Figura 3

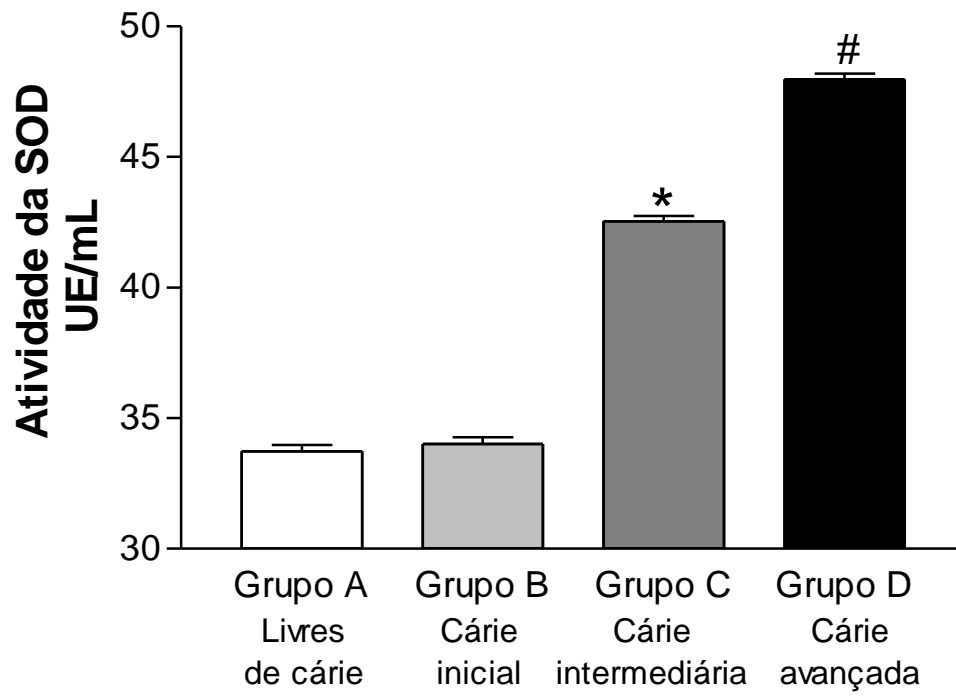


Tabela 1- Correlação de Pearson (valores de r) entre as variáveis dependentes: Proteína, MDA (malonaldeído), TAC (capacidade antioxidante total), UA (ácido úrico) e SOD (superóxido dismutase)

	MDA	TAC	UA	SOD	
Proteína	-0.7452	0.7470	0.7226	0.7258	
MDA		-0.9377	-0.9025	-0.9307	p < 0.0001
TAC			0.9706	0.9729	
UA				0.9546	

Tabela 2- Análise de regressão linear multivariada de fatores associados com o dano oxidativo

	Coefficiente	Desvio padrão	t	P	VIF	R² ajustado
Grupos	-0.000986	0.0000737	-13.39	<0.001	3.808	0.832
Nº de lesões	0.000219	0.000045	4.872	<0.001	1.81	

VIF= Colinearidade; t= Força da equação

MATERIAL SUPLEMENTAR

Valores da média \pm Desvio Padrão das variáveis submetidas ao teste de ANOVA e pós teste de Student Newman-Keuls

Variáveis	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Proteína total (mg/mL)	0.080 \pm 0.005	0.080 \pm 0.005	0.086 \pm 0.006	0.095 \pm 0.005
MDA (μmol/L mg proteína)	0.0037 \pm 0.0003	0.0038 \pm 0.0004	0.0017 \pm 0.0001	0.0015 \pm 0.0001
TAC (μmol/L)	27.12 \pm 0.44	27.11 \pm 0.26	39.04 \pm 0.50	48.18 \pm 0.18
UA (mg/mL)	5.85 \pm 0.20	5.87 \pm 0.14	6.77 \pm 0.12	7.56 \pm 0.18
SOD (UE/mL)	33.73 \pm 1.31	34.00 \pm 1.55	42.54 \pm 1.11	47.99 \pm 1.19

ANEXO I-

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SALIVA E SUA CORRELAÇÃO COM OS ESTÁGIOS DA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA.

Pesquisador: Cristina Antoniali Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71063417.4.0000.5420

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

Patrocinador Principal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.305.254

Apresentação do Projeto:

A cárie dentária é uma doença que ainda atinge grande parcela da população mundial. Os biomarcadores do dano oxidativo podem ser quantificados na saliva de indivíduos com cárie. Recentemente, foi demonstrado que os níveis de estresse oxidativo estão reduzidos em saliva de crianças com cárie precoce da infância, de 0-3 anos, quando comparadas a crianças sem experiência de cárie, devido ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes enzimático (SOD) e não-enzimáticos (FRAP e ácido úrico). No entanto, não foi avaliado se haveria relação direta entre estágios distintos de acometimento da doença cárie e os níveis de biomarcadores do dano oxidativo na saliva destas crianças. O objetivo deste estudo será avaliar se há relação entre a capacidade antioxidante total, a atividade da SOD, FRAP, ácido úrico, GSH, GSSG e atividade da peroxidase na saliva de crianças em função de diferentes estágios de cárie classificados pelo sistema ICDAS. Serão selecionadas 120 crianças de 0-3 anos de idade, de instituições de ensino da cidade de Araçatuba. A coleta salivar será realizada em crianças em jejum de 2 horas, com o uso de

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebentz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.305.254

salivette®. A saliva será centrifugada, o sobrenadante será aliquoteado e armazenado a -80°C , até a realização dos testes bioquímicos. Os dados serão submetidos a ANOVA a 1 critério para cada marcador isoladamente, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Caso os dados não apresentem distribuição normal e homogênea, os dados serão analisados teste de Kruskal Wallis. Os dados também serão submetidos a análise de regressão multivariada. O nível de significância adotado será de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se há relação entre o aumento de biomarcadores de dano/estresse oxidativo na saliva de crianças com cárie em diferentes estágios classificados pelo ICDAS

Objetivo Secundário:

- Avaliar o dano oxidativo lipídico por meio da determinação de MDA na saliva de crianças sem cárie e com cárie dentária em diferentes estágios de evolução;
- Avaliar a atividade da SOD na saliva de crianças sem cárie e com cárie dentária em diferentes estágios de evolução;
- Avaliar a FRAP e ácido úrico na saliva de crianças sem cárie e com cárie dentária em diferentes estágios de evolução;
- Padronizar as técnicas para quantificar a relação da Glutathiona oxidada (GSH) e Glutathiona reduzida (GSSG) na saliva de crianças sem cárie e com cárie dentária em diferentes estágios de evolução;
- Padronizar a técnica para quantificar a atividade de Glutathiona peroxidase na saliva de crianças sem cárie e com cárie dentária em diferentes estágios de evolução;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa apresenta risco mínimo, e durante o procedimento de coleta da saliva, quaisquer problemas e/ou ocorrências resultarão na interrupção do procedimento.

Benefícios:

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
 Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
 UF: SP Município: ARACATUBA
 Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.365.254

Além do benefício científico, as crianças passarão pela avaliação odontológica, realizada pelo cirurgião dentista Heitor Ceolin Araujo e este irá realizar os encaminhamentos, se necessário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante e bem fundamentada, apresenta métodos científicos adequados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Salientamos que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/03/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BÁSICAS DO P ROJETO_948143.pdf	15/09/2017 13:22:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	01/09/2017 12:31:53	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
Outros	termotese.pdf	05/07/2017 19:53:50	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
Outros	FICLINICAHEITOR.pdf	05/07/2017 19:48:37	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHeitor.pdf	05/07/2017 19:45:01	Heitor Ceolin Araujo	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	21/06/2017 12:33:44	Heitor Ceolin Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebarto@fca.unesp.br