



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

A SEVERIDADE DA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA  
AUMENTA ATIVIDADE DA SOD SENSÍVEL AO KCN,  
REDUZ PROTEÍNAS CARBONILADAS E AUMENTA A  
BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO NA SALIVA

Araçatuba - SP

2022

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

A SEVERIDADE DA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA  
AUMENTA ATIVIDADE DA SOD SENSÍVEL AO KCN,  
REDUZ PROTEÍNAS CARBONILADAS E AUMENTA A  
BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO NA SALIVA

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

Orientadora: Profa. Associada Dra. Cristina Antoniali Silva

**Araçatuba - SP**

**2022**

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Lisboa, Ana Carolina Gomes.

L769s      A severidade da cárie na primeira infância aumenta a atividade da SOD sensível ao KCN, reduz proteínas carboniladas e aumenta a disponibilidade do óxido nítrico na saliva / Ana Carolina Gomes Lisboa. – Araçatuba, 2022  
54 f. : il.

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

Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Saliva 2. Cárie dentária 3. Superóxido dismutase  
4. Carbonilação proteica 5. Óxido nítrico I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

*Dedicatória*

A **Deus**, que se fez presente em cada amanhecer, em cada detalhe e me ajudou a ter paciência para entender que nem tudo é no meu tempo, além de me ensinar a enxergar mesmo nas dificuldades o quanto sou forte, que sou a menina dos Seus olhos! É como o Senhor me disse “Nada temas, porque estou contigo, não lances olhares desesperados, pois eu sou teu Deus; eu te fortaleço e venho em teu socorro, eu te amparo com minha destra vitoriosa” Isaías 41, 10. Senhor a Ti toda honra e glória!

A **minha família**, que é minha base e merece todo o reconhecimento por essa conquista que não é somente minha. Pois em vocês encontrei palavras de otimismo quando os momentos difíceis chegaram, ombros para desabafos quando o desânimo e a depressão me encontraram, abraços de força em cada etapa e muito amor todos os dias. Vocês são minha fonte de inspiração, a força que cada um me transmitiu nunca me deixou desistir. Meu amor e eterna gratidão a vocês!

# *Agradecimientos*

## *Agradecimentos*

Aos meus pais **Sheila e José,**

Que são meus dois milagres, que me ensinam diariamente sobre perseverança, fé, coragem e que com Deus eu posso realizar qualquer obra, qualquer sonho que seja plantado em meu coração! **Mamãe,** obrigada por ter lutado tanto e vencido o covid, sua vontade de viver é fonte de inspiração, tenho muito orgulho de ser sua filha, sempre será minha seta! **Papai,** meu guerreiro, que vem enfrentando bravamente o câncer que “chegou” de surpresa e nos fez sofrer muito. Obrigada por não ter desistido mesmo quando o sofrimento foi insuportável; o senhor é meu testemunho vivo de fé, esperança e amor e sua cura está mais próxima que nunca! Sem vocês hoje aqui rainha e rei, nada iria fazer sentido, por isso meu coração está transbordando de gratidão por vocês estarem vivos aqui comigo nesse momento que precisou ser adiado, mas que foi tão esperado! Amo vocês!

A meu irmão **Gabriel,**

Meu braço direito, meu amigo, meu companheiro fiel, esteve comigo em todas as batalhas e em todas as vitórias, me ouvindo, aconselhando, enxugando minhas lágrimas, me dando puxões de orelha, me tirando do fundo do poço ou indo até o fundo do poço comigo só para não me deixar sozinha! E claro me aplaudindo e comemorando comigo em todas as conquistas. Obrigada por ser o melhor irmão que eu poderia ter, tenho muito orgulho do homem que você vem se tornando. Estarei ao seu lado para todo sempre. Eu te amo.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

## *Agradecimentos*

A meu melhor amigo e marido **Jaime**,

Que depois de quatro anos de amizade despertou em meu coração o mais lindo e puro amor. Você reapareceu no momento que eu mais precisava e me amou até mesmo nos momentos que nem eu me amei. Obrigada pela sua paciência, companheirismo, lealdade, por ter tomado conta de tudo por um tempo para que esse dia pudesse acontecer e principalmente por me fazer tão feliz! Você é o homem da minha vida, eu te amo e amo partilhar minha vida com você!

A meu tio **Gilberto**,

Que não mediu esforços para me ajudar em todo mestrado, se preocupando como um pai! Obrigada por todos os conselhos, apoio, amizade e amor! O que posso lhe prometer é fazer por alguém o que o senhor fez por mim, que foi me ajudar realizar um sonho! Minha eterna gratidão!

A meu tio **Carlos**,

Que se tornou uma estrelinha no céu, porém que me acompanhou em toda escola, graduação e mestrado, zelando por todos os meus sonhos! Obrigada por todo cuidado comigo e com minha família, com certeza parte de quem sou hoje devo ao senhor. Te amo e jamais vou deixar de me lembrar de ti!

A minha orientadora **Cristina Antoniali**,

Que me deixou muitos ensinamentos e reflexões que me fizeram crescer na vida pessoal, profissional e acadêmica. Muito obrigada pela ajuda, broncas, ideias e direcionamento, com certeza fizeram com que o nosso trabalho fosse finalizado da melhor maneira possível, pois como eu sempre disse “sozinha eu não iria conseguir”. Muito obrigada!

*Ana Carolina Gomes Lisboa*



## *Agradecimentos*

Ao professor **Antônio**,

Que sempre esteve a disposição para me ajudar e direcionar com os experimentos, referências, banca de qualificação. Obrigada por toda colaboração e paciência ao me ensinar com muita alegria as técnicas utilizadas neste trabalho, fazer perguntas que me fizeram estudar e entender um pouco mais sobre a bioquímica; Sua ajuda foi de primordial importância para que chegássemos com sucesso nos nossos resultados e finalização do trabalho. Gratidão!

Ao meu grande amigo **Heitor**,

Que se tornou muito mais que um amigo de mestrado, se tornou um irmão e fez da sua família a minha, nunca me deixando sentir sozinha e desamparada! Obrigada por cada conselho, brincadeiras, comilanças, festinhas, toda ajuda no texto, slides, aulas, experimento, em tudo eu precisei de você e você sempre esteve ao meu lado! Minha eterna gratidão a você amigo!

Aos meus amigos do **CAOE**,

Que me acolheram não apenas como estagiária e monitora, mas como família! Foram muitos pacientes, casos, ensinamentos, almoços, cafés da tarde, muita carona e muitos momentos que com certeza vão ficar em meu coração para sempre. Agradeço a Deus pela vida de cada um de vocês em minha vida!

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

## *Agradecimentos*

Aos meus **amigos** que o mestrado me deu, Renan, Nathalia, Jéssica, Nayara, Mayra, Isabela, Pedro, Dani, Henrique, Leonado, Rafael, Sabrina, vocês estiveram ao meu lado, cada um com seu jeito ímpar de ser e me ajudaram de formas diferentes, porém muito valiosas em todo esse caminho! Obrigada amigos por estarem sempre por perto me conduzindo e me motivando!

A professora **Karine Takahashi**,

Que me acompanhou desde a graduação, me inspirando a seguir a área de Odontopediatria. Obrigada pelas aulas, trabalhos, congressos, jantinhas e por estar sempre disposta me ajudar. Muito obrigada!

Ao professor **Juliano Pessan**,

Que foi um conselheiro nos dias em que me encontrava triste e desanimada ou até pensando em desistir, me mostrando que para todos os problemas haveria uma solução. Além de ser grande inspiração como professor, pela sua inteligência e facilidade de transmitir todo seu conhecimento. Muito obrigada!

Aos **Professores e alunos do Departamento**,

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.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

## 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.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro, pela concessão da Bolsa de Mestrado, em dois anos de curso.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

*Epígrafe*

*“De todas as lições que a vida está me ensinando, a principal é esta: há decisões que temos que tomar, há mudanças que precisam acontecer, há medos que devemos enfrentar, há solidões que precisamos suportar, há lágrimas que precisamos derramar, há recomeços que precisam florescer de alguma forma dentro de nós. Porque mesmo quando pensamos que não somos capazes de suportar algo, o tempo vai mostrando que somos mais fortes do que pensamos e mais corajosos do que imaginávamos ser.”*

*Keli Talini*

*Resumo*

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

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a progressão da severidade das lesões de cárie alteraria as atividades das isoformas da superóxido dismutase (SOD), sensível ou não ao cianeto de potássio (KCN), a carbonilação de proteínas e a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) salivar. Amostras de saliva, não estimulada, foram coletadas de crianças (1 a 3 anos) em uma creche municipal de Birigui, SP, Brasil. As crianças foram divididas em 4 grupos (n=30/grupo) de acordo com os critérios do ICCMS<sup>TM</sup>, sendo o grupo A (livres de cárie), grupo B (cárie inicial), grupo C (cárie moderada) e grupo D (cárie extensa). A atividade enzimática da SOD sensível ao KCN e da SOD insensível ao KCN (SOD sens KCN e SOD ins KCN, respectivamente) foram determinadas pelo método de oxidação do pirogalol. O método da carbonilação da proteína foi utilizado para determinar o dano oxidativo (DO), baseado no método alcalino de DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina). A biodisponibilidade de NO salivar foi quantificada pelo método de Griess. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA e pós-teste de Student-Newman-Keuls ( $\alpha = 0,05$ ), e pela correlação de Pearson e Spearman. Os resultados demonstraram que a progressão das lesões de cárie aumentou a atividade da SOD sens KCN, mas não alterou a atividade da SOD ins KCN, reduziu a carbonilação de proteína, e aumentou a biodisponibilidade do NO salivar. Em conclusão, os dados deste estudo mostraram que a progressão da cárie aumenta a atividade da SOD sens KCN que, possivelmente, reduz o dano oxidativo e favorece a biodisponibilidade de NO salivar. Embora exista um aumento da defesa antioxidante enzimática e da biodisponibilidade de NO, a progressão da cárie nestas condições se daria quando os fatores extrínsecos estiverem prevalecendo aos fatores de defesa antioxidante da saliva e ação antibacteriana do NO. Com isso, podemos reforçar a importância do acompanhamento odontológico preventivo da cárie desde a primeira infância para que sejam reduzidos os fatores de risco da cárie e prevaleça a defesa antioxidante salivar e ação antibacteriana do NO.

**Palavras-chave:** Saliva. Cárie dentária. Superóxido dismutase. Carbonilação proteica. Óxido nítrico.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

*Abstract*



LISBOA, ACG. **The severity of caries increases the activity of SOD sens KCN, reduces carbonylated proteins and increases the bioavailability of nitric oxide in saliva.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess whether caries progression alters the activity of superoxide dismutase (SOD) isoforms, protein carbonylation (a biomarker of oxidative damage) and the bioavailability of nitric oxide (NO) in children's saliva. Saliva samples, not stimulated, were collected from children (1 to 3 years old) in a municipal day care center in Birigui, SP, Brazil. The children were divided into 4 groups (n=30/group), according to the ICCMS<sup>TM</sup> criteria, being group A (caries free), group B (initial caries), group C (moderate caries) and group D (extensive caries). The enzymatic activity of potassium cyanide (KCN)- sensitive superoxide dismutase (SOD) and KCN-insensitive SOD (SOD sens KCN and SOD ins KCN, respectively) were determined by the pyrogallol oxidation method. The protein carbonylation method based on the alkaline method of DNPH (2,4- Dinitrophenylhydrazine) was used to determine oxidative damage (OD). Salivary nitric oxide (NO) bioavailability was quantified by the Griess method. Data were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls post-test ( $\alpha = 0.05$ ), and by Pearson and Spearman correlation. The results showed that with the progression of caries, there was an increase in SOD sens KCN activity, with no change in SOD ins KCN activity, a reduction in protein carbonylation, and an increase in salivary NO bioavailability. We can conclude that the greater the severity of caries, the greater the activity of SOD sens KCN, which leads to less oxidative damage and greater bioavailability of NO. However, it is possible that in the stages of greater caries severity, the antibacterial action of NO is superimposed by external cariogenic factors, favoring the process of demineralization and enamel and dentin damage. Thereby, we understand that the clinical dental care of children in early childhood is a key factor for controlling cariogenic factors and keeping in balance with the antioxidant defense and antibacterial action of NO in saliva.

**Keywords:** Saliva. Caries. Superoxide dismutase. Protein carbonylation. Nitric oxide.

*Listas*

## LISTA DE FIGURA

**Figura 1** – Concentração de proteínas (mg/dL) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). Os pontos representam os resultados individuais dentro de cada grupo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.0001$ ). A linha tracejada entre os grupos representa a correlação positiva ( $r=0.7084$ ) entre a concentração de proteínas salivares e a severidade da cárie. 47

**Figura 2** – Atividade de superóxido dismutase (SOD) sensível ao cianeto de potássio (KCN) e SOD insensível ao KCN (SOD *sens* KCN e SOD *ins* KCN, respectivamente) (UE/mL/mg total de proteína) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes maiúsculas representam diferenças estatísticas para SOD *sens* KCN ( $p < 0.0001$ ) e letras iguais minúsculas representam similaridade estatística para SOD *ins* KCN ( $p > 0.05$ ). 48

**Figura 3** – Proteína Carbonilada (nmol/mg) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupo B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes minúsculas significam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.001$ ). 49

**Figura 4** – Óxido nítrico (NO) salivar (em  $\mu\text{mol/ml}$  para o gráfico em (a) e em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína total para o gráfico em (b)) nas amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes minúsculas significam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.001$ ). 50

## LISTA DE ABREVIATURA

<b>ECC</b>	“Early Childhood Caries”, Cárie na Primeira Infância
<b>S-ECC</b>	Cárie Severa da Primeira Infância
<b>ICCMS™</b>	“International Caries Classification and Management System”, Sistema Internacional de Classificação e Gerenciamento de Cárie
<b>ICDAS</b>	“International Caries Detection and Assessment System”, Sistema Internacional de Detecção e Avaliação da Cárie
<b>DO</b>	Dano Oxidativo
<b>PC</b>	Proteína Carbonilada
<b>DNPH</b>	2,4-Dinitrofenilhidrazina
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>KCN</b>	Cianeto de Potássio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>TBARS</b>	“Thiobarbituric acid reactive substances”, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>ins</b>	Insensível
<b>sens</b>	Sensível
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro

<b>mg</b>	Miligrama
<b>L</b>	Litro
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mmol/L</b>	Milimol por litro
<b>μmol</b>	Micromol
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido Fosfórico
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>EU</b>	Unidade Enzimática

# *Sumário*

## SUMÁRIO

Introdução	25
Materiais e métodos	28
Resultados e discussão	33
Conclusão	38
Conflito de interesse	39
Agradecimento	40
Referências	41
Figuras	47
Anexo I	51

**A severidade da cárie na primeira infância aumenta atividade da SOD sensível ao KCN, reduz proteínas carboniladas e aumenta a disponibilidade do óxido nítrico na saliva.**

Ana Carolina Gomes Lisboa<sup>1,2</sup>, Andrea Estéffane Soares Cardoso de Oliveira<sup>5</sup>, Heitor Ceolin Araujo<sup>1,2</sup>, Wilson Galhego Garcia<sup>4</sup>, Sandra Helena Penha de Oliveira<sup>3,4</sup>, Ana Cláudia Melo Stevanato Nakamune<sup>3,4</sup>, Antonio Hernandes Chaves-Neto<sup>3,4</sup>, Juliano Pelim Pessan<sup>1,2</sup>, Cristina Antoniali<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup>Universidade Católica Salesiano Auxilium, Araçatuba, São Paulo, Brasil

\*Autor correspondente

Dra Cristina Antoniali

E-mail: cristina.antoniali@unesp.br

Endereço permanente

Professor Associado do Departamento de Ciências Básicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, SP, Brasil.

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça, Araçatuba, SP, CEP: 16015-050.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*



## ***1 INTRODUÇÃO***

A Cárie na Primeira Infância (ECC, do termo em inglês Early Childhood Caries) é definida clinicamente como a presença de superfícies cariadas, perdidas ou restauradas devido à cárie, nos dentes decíduos, em criança com menos de 6 anos (American Academy of Pediatric Dentistry, 2016; Tinanoff *et al.*, 2019). Ela é considerada um grave problema de saúde pública, pois sua progressão é rápida (Kawashita *et al.*, 2011; Çolak *et al.*, 2013; Anil *et al.*, 2017) e suas manifestações incluem dor, dificuldade de mastigação, dificuldade de tomar bebidas quentes ou frias, afeta a qualidade do sono e do rendimento escolar, além da dificuldade de socialização e o comprometimento da autoestima (Martins-Júnior, *et al.*, 2013), ou seja, as essas consequências exercem impacto forte e imediato e em longo prazo na qualidade de vida individual e social da criança (Çolak *et al.*, 2013). Com o melhor entendimento da etiologia e da progressão desta doença, os sinais iniciais da cárie também são considerados, podendo ser prevenida, controlada e revertida. (Paula *et al.*, 2017). O Sistema Internacional de Avaliação e Detecção de Cárie (ICDAS, do termo em inglês International Caries Detection and Assessment System), é um método de avaliação clínica visual da cárie dentária, onde classifica as superfícies dentárias em códigos com o objetivo de padronizar o diagnóstico (Pitts, 2009). Porém com o objetivo de integrar e sintetizar estas informações, surgiu o Sistema Internacional de Classificação e Gestão da Cárie (ICCMS<sup>TM</sup>, do termo em inglês International Caries Classification and Management System) que é desenvolvido por meio de evidências globais e tem o objetivo da padronização da decisão de tratamento da cárie, afim de facilitar a prática clínica dos cirurgiões dentistas. Ambos os sistemas são baseados em evidências clínicas e científicas que visam manter e preservar a estrutura dentária (Pitts *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2015).

A saliva humana pode ser empregada na detecção de doenças sistêmicas e orais, pois contém biomarcadores que podem ser analisados e quantificados (Spielmann *et al.*, 2011; Malamud *et al.*, 2011; Eagappan *et al.*, 2016; Hassaneen *et al.*, 2017). Os biomarcadores ideais para o diagnóstico de doenças relacionadas ao estresse oxidativo devem ser estáveis, ter valor prognóstico, refletir vias de oxidação específicas e correlacionar-se com o processo fisiopatológico da doença (Frijhoff *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2013).

A proteína carbonilada devido sua estabilidade e facilidade de detecção é o biomarcador mais utilizado para avaliação do dano oxidativo de proteínas, além de refletir

o dano celular induzido por múltiplas formas de espécies reativas de oxigênio (ERO). As proteínas carboniladas são formadas como consequência do ataque de radicais livres sobre as cadeias laterais dos aminoácidos (Sculley; Langley-Evans, 2003; Pradeep et al., 2013; Baltacioglu; Sukuroglu, 2019).

Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que o dano oxidativo está reduzido na saliva de crianças com ECC (Silva *et al.*, 2016; Araujo *et al.*, 2020) em consequência do aumento da atividade de sistemas antioxidantes. Em um destes estudos, foi demonstrado uma correlação forte e positiva entre a atividade antioxidante enzimática (SOD) e não enzimática (UA e TAC) e a severidade das lesões de cárie, levando a redução progressiva do dano oxidativo salivar (Araujo *et al.*, 2020).

O óxido nítrico (NO) é considerado um dos mecanismos endógenos, inespecíficos, de defesa da cavidade bucal contra multiplicação bacteriana (*apud* Bayindir *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* demonstraram que o nitrito salivar (NO<sub>2</sub>) sob condição de pH ácido tem efeito inibitório sobre o crescimento e a sobrevivência de bactérias cariogênicas como os *Streptococcus mutans* (*apud* Bayindir *et al.*, 2005), *Lactobacillus casei* e *Candida albicans* (Xia *et al.*, 2006; Ghasempour *et al.*, 2014).

A biodisponibilidade do NO é reduzida na presença de ERO, entre elas o ânion superóxido (Saran *et al.*, 1990; Mcintyre *et al.*, 1999). Entretanto, a enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Halliwell, 1999) aumentando a biodisponibilidade de NO. Porém a SOD é encontrada de formas diferentes em células de mamíferos (Loven *et al.*, 1982), sendo uma isoforma da SOD intracelular, juntamente com a SOD extracelular, onde ambas são sensíveis ao cianeto (KCN), e mais uma isoforma mitocondrial que é quase insensível ao KCN (Romuk *et al.*, 2019; Stewart *et al.*, 2002; Skrzep-Poloczek *et al.*, 2020). Estudos anteriores ao nosso, mostraram que houve um aumento na atividade de SOD na saliva de crianças de 0-3 anos com cárie na primeira infância (ECC), quando comparadas a crianças livres de cárie (Silva *et al.*, 2016). Além disto, foi observada uma correlação forte e direta entre a progressão das lesões de cárie na primeira infância e o aumento gradativo da atividade da SOD (Araújo *et al.*, 2020).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a progressão da severidade das lesões de cárie alteraria as atividades das isoformas da SOD, sensível ou não ao KCN, a carbonilação de proteínas e a biodisponibilidade do NO salivar. Nossa hipótese é que o aumento da atividade da SOD na saliva de crianças com lesões de cárie

poderia ser um mecanismo de defesa por reduzir o dano oxidativo e aumentar a biodisponibilidade de NO, favorecendo assim sua atividade anticariogênica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Seleção dos pacientes**

Todos os procedimentos descritos foram encaminhados previamente para análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia Campus de Araçatuba, UNESP e aprovados (protocolo CAAE 71063417.4.0000.5420).

Esta pesquisa envolveu crianças (1-3 anos de idade), que participavam de programas educacionais e preventivos de saúde bucal na escola de educação municipal (EEM) Prof<sup>a</sup> Dionisia Miragaia Carmine, na cidade de Birigui, São Paulo, Brasil (localizada no sudeste a 21° de latitude 17'19" sul e longitude 50° 20'24 " leste a uma altitude de 450 metros; tem uma temperatura média anual de 22,1° C e índice de desenvolvimento humano de 0,780). Foi realizada uma reunião com os diretores da EEM e os pais ou responsáveis legais das crianças antes do início do estudo, na qual o protocolo foi explicado e as dúvidas foram esclarecidas. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram distribuídos a todos os pais/responsáveis.

Crianças cujos pais/responsáveis não devolveram o TCLE assinado e crianças com lesões de cárie com mais de uma classificação do ICCMS™ foram excluídas do estudo. Alterações na cor e morfologia da gengiva, biofilme visível, restaurações anteriores e erupções dentárias associadas à resposta inflamatória exacerbada que foram observadas durante o exame clínico, além de doenças sistêmicas, crônica ou não, e o uso de medicamentos foram consideradas como critério de exclusão.

Os exames clínicos foram realizados por um odontopediatra calibrado e experiente (HCA) em 563 crianças para a determinação do índice ICCMS™. Após secagem dos dentes com uma gaze, os exames clínicos foram realizados sob luz natural, com o auxílio de uma sonda e espelho seguindo os critérios da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). As crianças foram divididas em quatro grupos (n = 30/grupo) de acordo com os critérios do ICCMS™: Grupo A - livre de cárie; Grupo B - cárie inicial; Grupo C - cárie moderada; e Grupo D - cárie extensa. O tamanho da amostra foi determinado com base no estudo de Silva et al. (2016), no qual foram avaliados marcadores de estresse oxidativo em amostras de saliva de crianças livres de cárie e com ECC.

## **2.2 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 e posteriormente foram centrifugadas a 5500 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram divididos em 2 alíquotas (150 µL/cada) e armazenados a -80 °C até o momento das análises. Os níveis de proteína carbonilada, a concentração de nitrito e a atividade da SOD sensível ao KCN foram determinados através de reações colorimétricas, analisadas em leitora de micro placas Power Wave 340-Biotek, seguindo as diferentes metodologias descritas abaixo.

## **2.3 Ensaios bioquímicos**

### **2.3.1 Proteína total salivar**

As concentrações de proteínas na saliva foram determinadas pelo método de Lowry (1951), como descrito previamente no estudo de Araujo *et al.*, 2020. A concentração e proteína total foi usada para normalização dos resultados obtidos nas análises bioquímicas descritas abaixo.

### **2.3.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) salivar total**

A enzima superóxido dismutase é encontrada de 3 isoformas. SOD 1 que é a SOD contendo cobre e zinco (CuZn-SOD), que é encontrada no espaço intracelular, a SOD 2 que contem manganês (Mn-SOD) é localizada nas mitocôndrias de células aeróbias e a SOD 3 (EC-SOD) que é semelhante a CuZn-SOD, porém é encontrada predominantemente na matriz extracelular da maioria dos tecidos (Loven, *et al.*, 1982;

Romuk *et al.*, 2019; Zelko *et al.*, 2002). Sendo a SOD 1 e SOD 3 sensíveis ao cianeto de potássio (KCN) ou seja o KCN inibe a sua atividade e a SOD 2 insensível ao KCN, KCN não inibe sua atividade (Petersen *et al.*, 2002; Marklund, 1982; Marklund, 1984).

A atividade da SOD total foi determinada na saliva das crianças pelo método de Marklund (1985), com base na inibição da autooxidação do pirogalol, como descrito rapidamente abaixo.

Uma alíquota de 20 µL de saliva foi previamente diluída (1:10, v/v) e em seguida foi adicionado Pirogalol (2,6 mmol/L diluído em HCL 10 mmol/L). A absorbância foi lida a 420 nm. Foram realizadas cinco leituras a cada 1 min. A quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a autooxidação do pirogalol foi considerada uma unidade de atividade enzimática. Os resultados foram expressos em UE/mL e em UE/mL/mg de proteína.

### ***2.3.3 Atividade da superóxido dismutase salivar sensível ao cianeto de potássio (SOD sens KCN)***

A atividade da SOD *sens* KCN foi determinada na saliva segundo o método de Fridovich (1974) e como descrito em Soni (2014).

Em um tubo de ensaio foram adicionados: KCN (20 µL, 150 mmol/L), saliva (20 µL) e 1960 µL de Tampão Tris (Tris 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) em pH 8,5. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado Pirogalol (2,6 mmol/L diluído em HCl 10 mmol/L). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 420 nm. Por ser uma reação cinética, foram feitas 5 leituras (uma leitura/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/mg proteína total.

### ***2.3.4 Atividade da superóxido dismutase salivar insensível ao cianeto de potássio (SOD ins KCN)***

O valor de atividade da SOD *ins* KCN foi calculado pela diferença entre os valores de SOD total (publicada por Araujo *et al.*, 2020) e SOD *sens* KCN, pela seguinte fórmula (Skrzeo-Poloczek *et al.*, 2020; Grover; Samson, 1989; Loven *et al.*, 1982):

$$\text{SOD } ins \text{ KCN} = \text{SOD total} - \text{SOD } sens \text{ KCN}$$

### **2.3.5 Carbonilação da Proteína salivar**

Os níveis de proteína carbonilada na saliva foram determinados pelo método alcalino de DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina) conforme descrito previamente (Mesquita *et al.*, 2014). Para esta determinação foi utilizado 50 µL de saliva, 100 µL de DNPH (10 mmol/L em 0,5 mol/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente foi adicionado 50 µL de NaOH (6 mol/L) e incubado novamente à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi lida a 450 nm e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína total.

### **2.3.6 Óxido nítrico (NO) salivar**

O óxido nítrico (NO) é um radical livre muito reativo com tempo de meia-vida curto. Devido a isso, a quantificação de seus metabólitos nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>) é mais frequentemente utilizada para avaliar a concentração/produção de NO. A reação de Griess é o método mais utilizado para determinar as concentrações de NO<sub>x</sub>, devido a sua simplicidade, rapidez, custo-benefício e por ser um indicador indireto de produção de NO (Diaz *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2019).

Foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico) a 50 µL da saliva. A concentração de nitrito na amostra foi determinada pela curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em concentrações variando de 3,12 - 200 µmol/L e a absorbância foi lida a 570 nm. Os resultados foram expressos em µmol/mL.

## **2.4 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média ± DP (desvio padrão). A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste ANOVA um critério, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, por ter distribuição normal. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

A correlação entre as variáveis dependentes foi realizada pelo teste de correlação de Pearson e a correlação entre grupos (ICCMS<sup>TM</sup>) e variáveis dependentes, foi feita por teste de correlação de Spearman (Graph Pad, versão 6.0, GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, USA). Valores de  $r > 0.30$  foram considerados significativos para correlação baixa, de  $r > 0.50$  foram considerados significativos para correlação moderada e  $r > 0.70$  foram considerados significativos para correlação alta (Mukaka, 2012).



### 3 Resultados e Discussão

Neste estudo foram avaliadas 120 crianças de 1-3 anos. A distribuição de meninos e meninas foi equilibrada nos quatro grupos, sendo 46,6% nos Grupos A e C e 50% nos Grupos B e D. Neste estudo, com a progressão das lesões de cárie houve aumento da atividade da SOD sens KCN, sem alteração da atividade da SOD ins KCN, além do aumento da biodisponibilidade do NO salivar. Portanto a hipótese do estudo foi parcialmente aceita. Como nenhum estudo avaliou a progressão das lesões de cárie relacionado a carbonilação de proteínas em crianças, o presente estudo traz novas informações para o campo.

A concentração total de proteínas na saliva das crianças do grupo B não foi alterada em relação as crianças sem cárie (grupo A), mas aumentou significativamente e progressivamente nos grupos C e D (Figura 1). Uma correlação positiva foi encontrada entre a concentração de proteínas salivares e a severidade da cárie entre os grupos, sugerindo que quanto mais severa é a lesão (esmalte e dentina) maior é a concentração de proteínas salivares.

O material de biópsia de cárie revelou uma proporção significativa de metaloproteinases (MMP) nas lesões, que correspondeu aos níveis aumentados de MMP salivares, embora diluídos com outros perfis de proteases direcionados a determinados peptídeos (Koller et al., 2021). Além disso, no estudo de Koller et al., 2021, a análise de protease realizada demonstrou que a maioria das características diferenciais da saliva entre o status da cárie pode ser alinhada a interações específicas das lesões de cárie.

A atividade aumentada de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em saliva de crianças com cárie, reduziu o dano oxidativo salivar (Silva *et al.*, 2016). A quantificação dos níveis de proteína carbonilada foi avaliada para verificarmos possíveis alterações associadas ao dano oxidativo salivar. Divergente ao estudo anterior (Araujo *et al.*, 2020) no qual o dano oxidativo foi avaliado pela peroxidação lipídica, neste estudo avaliamos a carbonilação de proteínas. A proteína carbonilada é considerada também um biomarcador de oxidação (Gonos *et al.*, 2018), uma vez que encontramos vantagens em comparação com outros biomarcadores devido a sua simplicidade e estabilidade das proteínas carboniladas (Baraibar *et al.*, 2013; Baltacioglu *et al.*, 2019). Os resultados mostraram (Figura 3) que o nível de proteína carbonilada foi menor ( $p < 0.001$ ) no grupo D do que nos outros grupos. No grupo C, os valores obtidos foram inferiores ( $p < 0.001$ )

aos encontrados nos grupos A e B e não houve diferenças entre os grupos A e B ( $p > 0.05$ ). Uma correlação forte ( $r > 0.70$ ) e negativa (Spearman  $r = -0.7458$ ,  $p < 0.0001$ ) foi observada entre os níveis de proteína carbonilada e os diferentes estágios da cárie, mostrando que há uma correlação inversamente proporcional entre os níveis de proteína carbonilada e a severidade da cárie. Estes resultados corroboram os apresentados por Araujo *et al.* (2020) que demonstraram que há uma correlação inversamente proporcional entre os níveis de peroxidação lipídica (MDA) e a severidade da cárie. Juntos os resultados obtidos mostram que quanto maior a severidade da cárie, ou seja, cárie moderada e cárie severa, menor é a peroxidação de lipídeos (Araujo *et al.*, 2020) e menor é a carbonilação de proteínas.

Recentemente mostramos (Araujo *et al.*, 2020) que a atividade total da SOD foi maior em saliva de crianças com lesões de cárie em esmalte e em dentina, quando comparadas as crianças livres de cárie ou com lesões iniciais de cárie (sem cavitação). No presente estudo, a atividade das isoformas da SOD sensível e insensível ao KCN, foi avaliada na saliva dos diferentes grupos. Os resultados (Figura 2) mostraram que a atividade da SOD *ins* ao KCN não foi diferente entre os grupos. Porém, a atividade da SOD *sens* KCN foi maior ( $p < 0.0001$ ) nos grupos C e D, quando comparados aos grupos A e B. Não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos nos grupos C e D ( $p > 0.05$ ) ou entre os grupos A e B ( $p > 0.05$ ). Uma correlação positiva e moderada foi observada entre a progressão das lesões de cárie e a atividade da SOD *sens* KCN (Spearman  $r = 0.6028$ ,  $p < 0.0001$ ), mostrando que com a progressão das lesões de cárie há o aumento da atividade da SOD *sens* KCN.

Considerando que a atividade da SOD total está relacionada a atividade das isoformas avaliadas e que não observamos diferenças dos valores de SOD *ins* KCN entre os grupos (Figura 2), podemos sugerir que o aumento da atividade da SOD total na saliva de crianças com cárie cavitada em esmalte e dentina (Araujo *et al.*, 2020) seria devido a maior atividade da isoforma SOD *sen* KCN.

Uma correlação negativa, fraca (Pearson  $r = -0.3150$ ,  $p = 0.0009$ ), foi observada entre a atividade da SOD *sens* KCN e os níveis de proteína carbonilada salivar dos diferentes grupos, sugerindo que o aumento da atividade da SOD *sens* KCN determinaria menor quantidade de proteína carbonilada nos grupos de crianças com cárie moderada e severa. Nossos achados reforçam a observação que na cárie ou em sua progressão com lesão de esmalte e dentina, a atividade da SOD sensível ao KCN é aumentada e reduz o

dano oxidativo salivar. O menor dano oxidativo salivar associado a lesão de cárie reforça a observação da atividade aumentada da SOD.

A SOD, por reduzir a concentração de EROS no meio, é considerada um antioxidante enzimático que inibe a degradação de NO. O óxido nítrico (NO) é um radical livre, sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina à L-citrulina e óxido nítrico, em processo catalisado pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Wyszyńska *et al.*, 2021). A molécula de NO é altamente reativa, e participa tanto de processos patológicos quanto fisiológicos, respondendo rapidamente a exacerbação da doença (Wyszyńska *et al.*, 2022). Na cavidade oral participa do mecanismo de defesa pelo seu efeito antibacteriano (Duncan *et al.*, 1995; Hegde *et al.*, 2008). Stuehr e Marletta (1985) sugeriram que a síntese de NO em macrófagos seria estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina bacteriana. A ação antibacteriana do NO é dada por inibição do crescimento bacteriano e/ou pelo aumento da citotoxicidade mediada por macrófagos da saliva. Por ser um radical livre, o NO atravessa facilmente as membranas celulares e pode provocar danos aos microrganismos por diferentes mecanismos, alterando a oxidação biológica nas mitocôndrias e promovendo danos ao DNA (Syed *et al.*, 2016).

Os primeiros estudos sobre o papel antimicrobiano o NO, mostrou que o NO é formado na boca e sua concentração está diretamente relacionada à quantidade de nitrito salivar e ingestão de nitrato pela dieta (Silva Mendez *et al.*, 1999). O Nitrato dietético é encontrado em vários tipos de frutas, vegetais e na água potável (Ghasempour *et al.*, 2014), onde uma parte é convertida em nitrito pela ação da nitrato redutase, que são enzimas expressas por microrganismos (Xia *et al.*, 2006). Apesar da divergência entre o efeito da acidificação do meio pelas bactérias cariogênicas sobre a atividade antibacteriana do NO, foi demonstrado que o nitrito tem atividade contra *Helicobacter pylori* (Dykhuizen *et al.*, 1996) e impede a produção de ácido por cepas de *S. Mutans* (Radcliffe *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, foi avaliado se a progressão da cárie estaria associada a possíveis alterações na concentração de NO salivar. Para isto, foram avaliadas as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), metabólitos de NO ( $\text{NO}_x$ ) que, como descrito acima, são derivados e proporcionais as concentrações de NO. A concentração de  $\text{NO}_x$  salivar foi maior no grupo D ( $p < 0.001$ ) quando comparados aos demais grupos (Figura 4A). Os valores encontrados no grupo C foram superiores ( $p < 0.001$ ) aos encontrados nos grupos A e B e não houve diferença entre os grupos A e B ( $p > 0.05$ ).

Quando a concentração de NOx salivar foi normalizada pela concentração de proteína total (Figura 4B), foi observada maior concentração nos grupos C e D ( $p < 0.001$ ) quando comparados aos demais grupos. Não foram observadas diferenças entre os grupos C e D ( $p > 0.05$ ) e entre A e B ( $p > 0.05$ ).

Nossos resultados diferem dos apresentados por Syed *et al.* (2016), que demonstraram que o nível de NO em saliva de crianças livres de cárie é maior quando comparado com crianças com cárie ativa, sugerindo um papel protetor de NO em relação a cárie. Resultados semelhantes foram encontrados por Doel *et al.* (2004) e Hegde *et al.* (2008), que haviam sugerido que crianças com maior porcentagem de redução de nitrato em nitrito tiveram menos cárie, e que pacientes com uma alta concentração de nitrato na saliva e uma flora oral com alta capacidade para reduzir nitrato a nitrito, teriam menos cárie do que aqueles com baixa concentração de nitrato na saliva e uma flora oral com baixa capacidade de reduzir nitrato em nitrito. Por outro lado, nossos resultados estão de acordo com os apresentados por Carossa *et al.* (2001) e Bayindir *et al.* (2005) que sugeriram que a menor incidência de cárie estaria associada a maior quantidade de NO na saliva uma vez que os níveis de NO aumentariam após a deposição de placa bacteriana. Carossa *et al.* (2001) sugerem ainda que a má higienização levaria a deposição de nitrito em níveis de acidez abaixo de pH 7,0 e ativaria a enzima óxido nítrico sintase, ou seja, a má higienização levaria ao aumento da produção de NO.

As análises demonstraram que há uma forte correlação (Spearman  $r = 0.8267$ ,  $p < 0.0001$ ) entre os estágios das lesões de cárie e os níveis aumentados de NOx salivar e que apesar de fraca (Pearson  $r = 0.5717$ ,  $p < 0.0001$ ), há correlação significativa, entre os valores de nitrito salivar e da atividade SOD *sens* KCN. Reforçando estes resultados, foi observado que há uma correlação moderada (Pearson  $r = -0.6100$ ,  $p < 0.0001$ ) e inversamente proporcional entre as concentrações de nitrito salivar e proteína carbonilada. Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de NOx salivar, associado a severidade da cárie, dependente da maior atividade de SOD *sens* KCN. Esta sugestão é reforçada pelos resultados obtidos no grupo B, pois na saliva de crianças com cárie inicial, não foi observada alteração da atividade da SOD *sen* KCN, e conseqüentemente, não foi observada alteração da quantidade de NOx.

A quantidade de bactérias, o pH, o biofilme oral, o processo de desmineralização tem um peso maior que a quantidade de NO, mostrando que o NO é uma defesa em situações onde existir um equilíbrio entre os fatores de risco a cárie. Nesse momento, essa

defesa, ou seja, a produção de NO, talvez seja o que determine o não aparecimento da cárie, pois a quantidade de microrganismos é menor. Porém se a criança tiver uma dieta cariogênica, uma pobre higienização oral, pH mais baixo, biofilme oral com baixa capacidade de reduzir nitrato em nitrito, são fatores muito maiores que contribuiriam e impediriam a ação anticariogênica.

Nosso estudo demonstrou que nos estágios de maior severidade de cárie (grupos C e D, cárie de esmalte e dentina, respectivamente) foram encontrados maiores concentrações de NOx. No entanto, ao avaliarmos a quantidade de NO na saliva de crianças com cárie no estágio inicial (grupo B), verificamos que não é diferente da quantidade detectada em crianças sem cárie. Estes resultados estão diretamente associados a atividade da SOD *sens* KCN aumentada nos estágios de maior severidade de cárie, e sugerem que a maior quantidade de NO salivar depende principalmente da atividade da SOD. Os resultados mostrados neste estudo poderiam levantar dúvidas sobre o papel anticariogênico do NO, uma vez que seria esperado que a cárie não progredisse em local com maior biodisponibilidade de NO.

Interessantemente, a quantificação de NO nos grupos A e B mostra que há produção basal e que possivelmente o NO seria uma defesa importante em situações em que o equilíbrio entre os fatores de risco a cárie dentária não tenham sido alterados significativamente. No entanto, nos estágios associados a maior severidade da cárie, é possível que a ação antibacteriana do NO seja sobreposta por fatores cariogênicos externos como a dieta, o biofilme e a quantidade de bactérias cariogênicas, e o baixo pH salivar, favorecendo o processo de desmineralização e a progressão da cárie.

Os resultados em conjunto sugerem que a severidade da cárie aumenta a atividade da SOD *sens* KCN que leva ao menor dano oxidativo salivar e, conseqüentemente a maior biodisponibilidade de NO.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a progressão da cárie aumenta a atividade da SOD sens KCN que reduz o dano oxidativo e aumenta a biodisponibilidade de NO salivar. Embora exista um aumento da defesa antioxidante enzimática e da biodisponibilidade de NO, a progressão da cárie nestas condições se daria quando os fatores extrínsecos estiverem prevalecendo aos fatores de defesa antioxidante da saliva e ação antibacteriana do NO. Com isso, podemos reforçar a importância do acompanhamento odontológico preventivo da cárie desde a primeira infância para que sejam reduzidos os fatores de risco da cárie e prevaleça a defesa antioxidante salivar e ação antibacteriana do NO.

## **5 CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores do presente estudo declaram não haver conflitos de interesse na publicação dos resultados.

## **6 AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, pelo apoio financeiro, pela concessão da bolsa de mestrado, em 2 anos de curso, tornando possível a produção desta dissertação.

*Ana Carolina Gomes Lisboa*



## 7 REFERÊNCIAS

American Academic of Pediatric Dentistry (2016). Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies, *The Reference Manual of Pediatric Dentistry*, 40, 18-19.

Anil, S., & Anand, P. S. (2017). Early childhood caries: prevalence, risk factors, and prevention. *Front Pediatr*, 5, 157. doi: 10.3389/fped.2017.00157

Araujo, H. C., Nakamune, A. C. M. S., Garcia, W. G., Pessan, J. P., & Antoniali, C. (2020). Carious lesion severity induces higher antioxidant system activity and consequently reduces oxidative damage in children's saliva. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–9. doi: 10.1155/2020/3695683

Baraibar, M. A., Ladouce, R., & Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of Proteomics*, 92, 63–70. doi:10.1016/j.jprot.2013.05.008

Bayindir, Y. Z., Polat, M. F., & Seven, N. (2005). Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. *Caries Res*, 39(2), 130-3. doi: 10.1159/000083158

Carossa, S., Pera, P., Doglio, P., Lombardo, S., Colagrande, P., Brussino, L., Rolla, G., & Bucca, C. (2001). Oral nitric oxide during plaque deposition. *European Journal of Clinical Investigation*, 31(10), 876–879. doi: 10.1046/j.1365-2362.2001.00902.x

Diaz, M., Bocanegra, O., Teixeira, R., Soares, S., & Espindola, F. (2013). Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load. *International Journal of Sports Medicine*, 34, 8–13. doi: 10.1055/s-0032-1316318

Doel, J. J., Hector, M. P., Amirtham, C. V., Al-Anzan, L. A., Benjamin, N., & Allaker, R. P. (2004). Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries. *European Journal of Oral Sciences*, 112(5), 424–428. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00153.x

Duncan, C., Dougall, H., Johnston, P., Green, S., Brogan, R., Leifert, C., Smith, L., Golden, M. & Benjamin, N. (1995). Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nature Medicine*, 1(6), 546–551. doi: 10.1038/nm0695-546

Dykhuisen, R. S., Frazer, R., Duncan, C., Smith, C. C., Golden, M., Benjamin, N., & Leifert, C. (1996). Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6), 1422–1425. doi: 10.1128/aac.40.6.1422

Eagappan, A. R. S., Rao, V. A. P., Sujatha, S., Sathiyajeeva, J., & Rajaraman, G. (2016). Evaluation of salivary nitric oxide level in children with early childhood caries. *Dent Res J*, 13(4), 338-41. doi: 10.4103/1735-3327.187882

Fridovich, I. (2006). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 35–97. doi: 10.1002/9780470122860.ch2

Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., et al. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23, 1144–70. doi: 10.1089/ars.2015.6317

Ghasempour, M., Qujeq, D., Rabiee, M., & Hamzeh, M. (2014). Measurement of nitrite and nitrate in saliva of children with different caries activity. *J Contemp Dent Pract*, 15(5), 623-5. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1590

Gonos, E. S., Kapetanou, M., Sereikaite, J., Bartosz, G., Naparto, K., Grzesik, M., & Sadowska-Bartosz, I. (2018). Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging (Albany NY)*. 10(5), 868-901. doi: 10.18632/aging.101450

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31(4), 261-72. doi: 10.1080/10715769900300841

Han, D. H., Kim, M. J., Jun, E. J., & Kim, J. B. (2013). Nitric oxide modulates levels of salivary lactobacilli. *Acta Odontol Scand*, 71(5), 1156-61. doi: 10.3109/00016357.2012.757356

Hassaneen, M., & Maron, J. L. (2017). Salivary diagnostics in pediatrics: applicability, translatability, and limitations. *Front Public Health*, 5, 83. doi: 10.3389/fpubh.2017.00083

Hegde, A., Neekhra, V., & Shetty, S. (2008). Evaluation of levels of nitric oxide in saliva of children with rampant caries and early childhood caries : a comparative study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 32(4), 283–86. doi: 10.17796/jcpd.32.4.4010k15262687528

Ho, E., Galougahi, K. K., Liu, C.-C., Bhindi, R., & Figtree, G. A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1(1), 483-491. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006

Ismail, A. I., Pitts, N. B., & Tellez, M. (2015). The international caries classification and management system (ICCMS™) an example of a caries management pathway. *BMC Oral Health*, 15 Suppl 1:S9. doi: 10.1186/1472-6831-15-S1-S9

Kawashita, Y., Kitamura, M., & Saito, T. (2011). Early childhood caries. *International Journal of Dentistry*, 1–7. doi: 10.1155/2011/725320

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. doi: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6

Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7634-38. doi:10.1073/pnas.79.24.7634

Marklund, S. L. (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochemical Journal*, 220(1), 269–272. doi:10.1042/bj2200269

Marklund, S. (1985). Pyrogallol auto oxidation. In Greenwald (ed.) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* CRC. Press Boca Raton, 243-247.

Malamud, D. (2011). Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am*, 55(1), 159-78. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.004

Martins-Júnior, P. A., Vieira-Andrade, R. G., Corrêa-Faria, P., Oliveira-Ferreira, F., Marques, L. S., & Ramos-Jorge, M. L. (2013). Impact of Early Childhood Caries on the Oral Health-Related Quality of Life of Preschool Children and Their Parents. *Caries Research*, 47(3), 211–218. doi:10.1159/000345534

McIntyre, M., Bohr, D. F., Dominiczak, A. F. (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, 34(4), 539-545. doi: 10.1161/01.hyp.34.4.539

Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69–71. doi: 10.1016/j.ab.2014.04.034

Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 69-71.

Paula, A. B. P., Fernandes, A. R., Coelho, A. S., Marto, C. M., Ferreira, M. M., Caramelo, F., Vale, F., & Carrilho, E. (2017). Therapies for white spot lesions - a systematic review. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 17(1), 23–38. doi: 10.1016/j.jebdp.2016.10.003

Petersen, S. V., Oury, T. D., Valnickova, Z., Thogersen, I. B., Hojrup, P., Crapo, J. D., & Enghild, J. J. (2003). The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: One sequence and two structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13875–13880. doi: 10.1073/pnas.2436143100

Pitts, N. B. (2009). Introduction. Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries, 1–14. doi:10.1159/000224208

Pitts, N.B., Ismail, A.I., Martignon, S., Ekstrand, K., & Douglas, G. V. A., Longbottom, C. (2014). ICCMS™ guide for practitioners and educators. Global Collaboratory for Caries Management. 1-28.

Radcliffe, C. E., Akram, N. C., Hurrell, F., & Drucker, D. B. (2002). Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*, 30(7-8), 325–31. doi: 10.1016/s0300-5712(02)00046-5

Saran, M., Michel, C., & Bors, W. (1990). Reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun*, 10(4-5), 221-6. doi: 10.3109/10715769009149890

Syed, M., Sachdev, V., & Chopra, R. (2016). Intercomparison of salivary nitric oxide as a biomarker of dental caries risk between caries-active and caries-free children. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 17(4), 239–243. doi: 10.1007/s40368-016-0234-z

Silva Mendez, L. S., Allaker, R. P., Hardie, J. M., & Benjamin, N. (1999). Antimicrobial effect of acidified nitrite on cariogenic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 14(6), 391–392. doi: 10.1034/j.1399-302x.1999.140612.x

Silva, P. V. D., Troiano, J. A., Nakamune, A. C. M. S., Pessan, J. P., & Antoniali, C. (2016). Increased activity of the antioxidants systems modulated the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. *Arch Oral Biol*, 70, 62-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.003

Soni, N. O. (2014). Antioxidant assay in vivo and vitro. *International Journal of Phytopharmacology*, 5(1), 51-58.

Souza, A. V., Giolo, J. S., Teixeira, R. R., Vilela, D. D., Peixoto, L. G., Justino, A. B., et al. (2019). Salivary and plasmatic antioxidant profile following continuous, resistance, and high-intensity interval exercise: preliminary study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–10. doi: 10.1155/2019/5425021

Spielmann, N., & Wong, D. T. (2011). Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*, 17(4), 345-54. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x

Stuehr, D. J., & Marletta, M. A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Medical Sciences*, 82(22), 7738-42. doi: 10.1073/pnas.82.22.7738

Tinanoff, N., Baez, R. J., Guillory, C. D., Donly, K. J., Feldens, C. A., McGrath, C., et al. (2019). Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal

burden, management, education, and policy: Global perspective. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29(3), 238–248. doi: 10.1111/ipd.12484

Wyszyńska M., Czelakowska A., Rafał R., Zajac M., Mielnik M., Kasperski J., & Skucha-Nowak M. (2021). Measurement of the level of nitric oxide in exhaled air in patients using acrylic complete dentures and with oral pathologies. *Coatings*, 11(2), 169. doi: 10.3390/coatings11020169

Wyszyńska, M., Rosak, P., Czelakowska, A., Białożył-Bujak, E., Kasperski, J., Lopaciński, M., et al. (2022). Pilot Study of Use of Nitric Oxide in Monitoring Multiple Dental Foci in Oral Cavity—A Case Report. *Healthcare (Basel)*, 10(2), 195. doi: 10.3390/healthcare10020195

Xia, D. S., Liu, Y., Zhang, C. M., Yang, S. H. & Wang, S. L. (2006) Antimicrobial effect of acidified nitrate and nitrite on six common oral pathogens in vitro. *Chin Med J*, 119(22), 1904-09.

Zandoná, A. F., Santiago, E., Eckert, G., Fontana, M., Ando, M., & Zero, D. T. (2010). Use of ICDAS Combined with Quantitative Light-Induced Fluorescence as a Caries Detection Method. *Caries Research*, 44(3), 317–22. doi: 10.1159/000317294

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337–349. doi:10.1016/s0891-5849(02)00905-x

Çolak, H., Dürgergil, C. T., Dalli, M., Hamidi, M. M. (2013). Early childhood caries update: a review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med*, 4(1), 29–38. doi: 10.4103/0976-9668.107257

## 8 FIGURAS

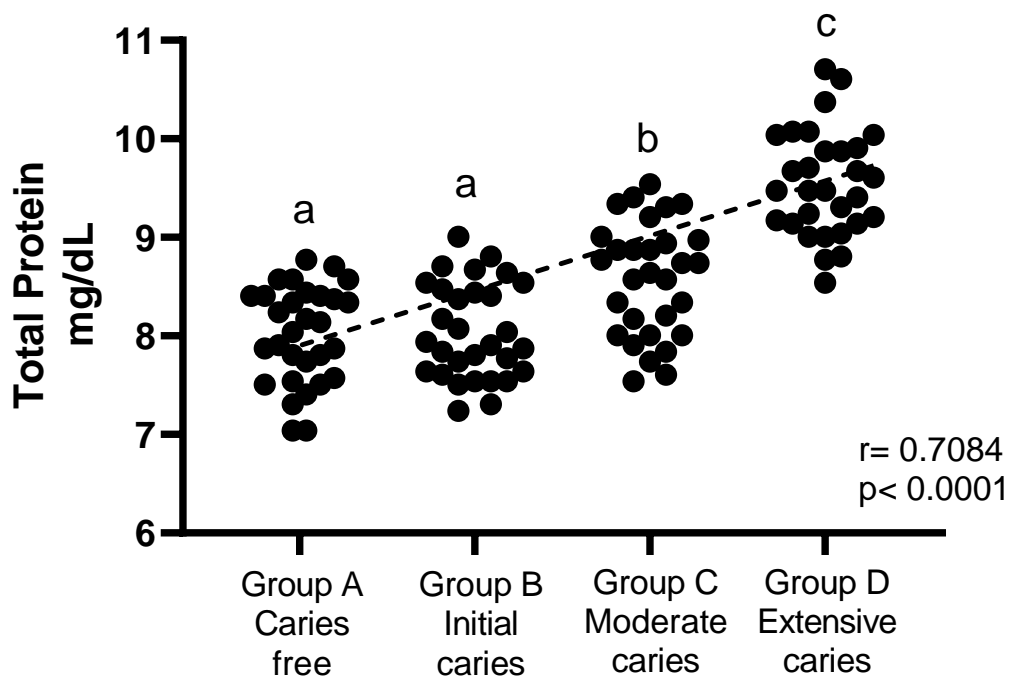


Figura 1 – Concentração de proteínas (mg/dL) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). Os pontos representam os resultados individuais dentro de cada grupo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.0001$ ). A linha tracejada entre os grupos representa a correlação positiva ( $r=0.7084$ ) entre a concentração de proteínas salivares e a severidade da cárie.

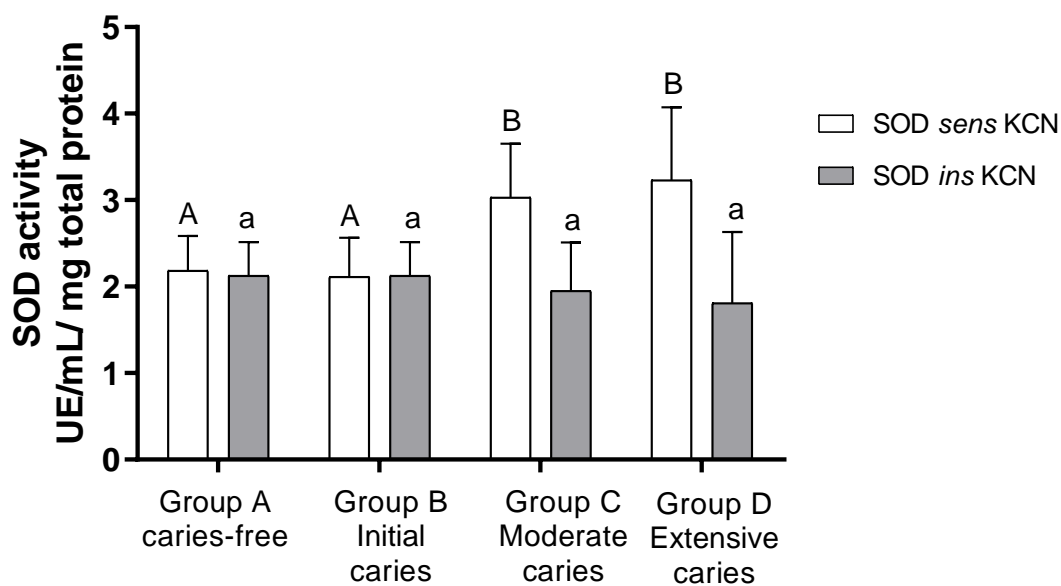
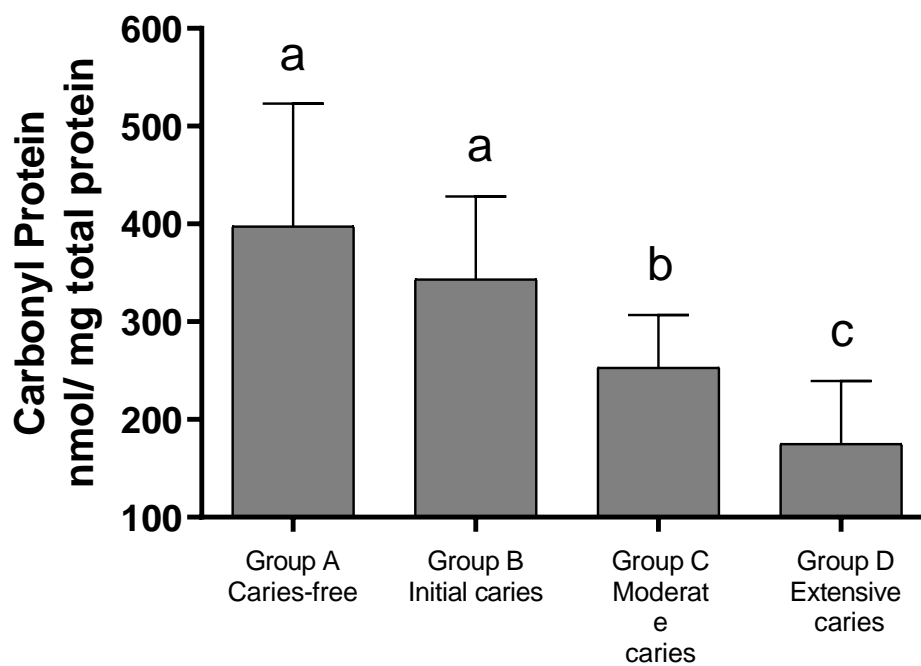


Figura 2 – Atividade de superóxido dismutase (SOD) sensível ao cianeto de potássio (KCN) e SOD insensível ao KCN (SOD *sens* KCN e SOD *ins* KCN, respectivamente) (UE/mL/mg total de proteína) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes maiúsculas representam diferenças estatísticas para SOD *sens* KCN ( $p < 0.0001$ ) e letras iguais minúsculas representam similaridade estatística para SOD *ins* KCN ( $p > 0.05$ ).





**Figura 3 – Proteína Carbonilada (nmol/mg) em amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupo B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes minúsculas significam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.001$ ).**

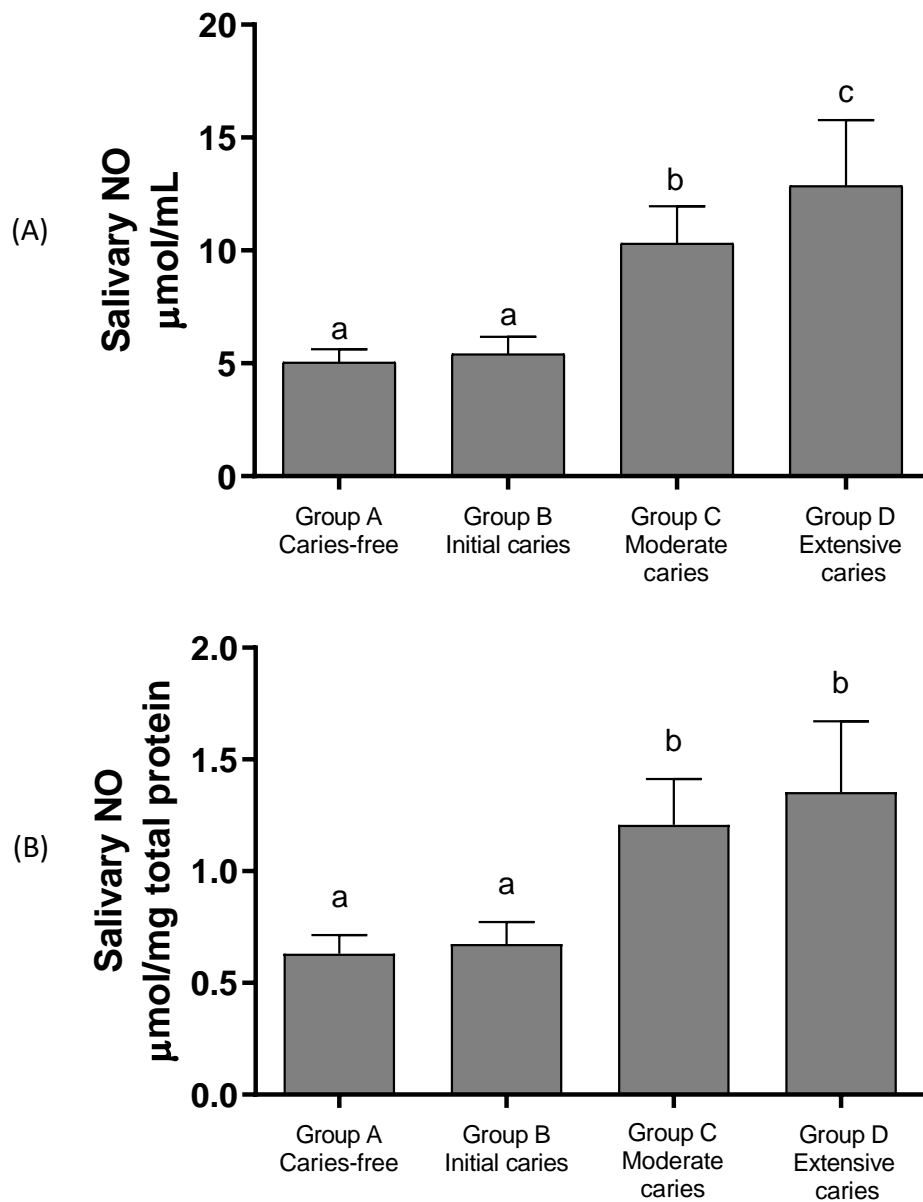
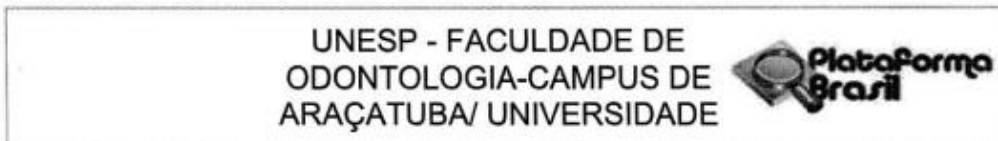


Figura 4– Óxido nítrico (NO) salivar (em  $\mu\text{mol/ml}$  para o gráfico em (A) e em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína total para o gráfico em (B)) nas amostras de saliva de crianças livres de cárie (Grupo A) e com cárie em diferentes estágios (Grupos B-D). As barras representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes minúsculas significam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0.001$ ).

## 9 ANEXO I


**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

<b>Endereço:</b> JOSE BONIFACIO 1193		<b>CEP:</b> 16.015-050
<b>Bairro:</b> VILA MENDONCA		
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> ARACATUBA	
<b>Telefone:</b> (18)3636-3200	<b>Fax:</b> (18)3636-3332	<b>E-mail:</b> andrebertoz@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 Glutathione oxidada (GSH) e Glutathione 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 Glutathione 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

Página 02 de 04

*Ana Carolina Gomes Lisboa*

UNESP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE  
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.305.254

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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_946143.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	foihaderosto.pdf	21/06/2017 12:33:44	Heitor Ceolin Araujo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

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

UNESP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE  
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.305.254

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARACATUBA, 29 de Setembro de 2017

*Aldiéris Alves Pesqueira*

Assinado por:  
Aldiéris Alves Pesqueira  
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@fca.unesp.br

Página 04 de 04

*Ana Carolina Gomes Lisboa*