

DANIELLE SÁ DOS SANTOS

RAFAEL BRIZOLA VIEIRA

**ANTIOXIDANTES E BIOMARCADORES DA INJÚRIA OXIDATIVA NA
SALIVA DE PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ. Estadual Paulista,
como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-
DENTISTA.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

Co-orientadora: Profa Dra Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2012

AUTORIZAÇÃO

Autorizamos a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 02 de outubro de 2012.

Danielle Sá dos Santos

Rafael Brizola Vieira

E-mails: danni.sa@bol.com.br / fael_briza@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Prof. Tit. Walter Domingos Niccoli Filho

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 2 de Outubro de 2012

DEDICATÓRIA de Danielle

Um dia você acorda e vê uma grande mudança acontecendo, fica assustada e pensa será que vai dar certo? Será que esta é a escolha certa? Será que irá compensar ficar longe das pessoas que mais amo nessa vida? Afinal de contas era um caminho desconhecido, uma faculdade de 6 anos longe de casa. Pois esses seis anos passaram e as lágrimas lá do passado, de saudade dos que deixei, são as lágrimas de alegria de hoje, do término de mais uma grande etapa.

Então só poderia dedicar este trabalho em primeiro lugar a **Deus**, pois sem ele nada seria possível e aos grandes amores da minha vida: **Pai, Mãe, Vó** (in memorian), **Nathalia** e **Felipe**, que me apoiaram, me incentivaram a realizar meu sonho e me fizeram crer que seria possível, sem a força do amor de vocês eu não teria conseguido.

Dedico aos meus amigos da 9ª turma do noturno em especial a **Jussimara** e a **Samara**, pois vivemos momentos inesquecíveis, os melhores anos da minha vida. Dedico a todos os outros amigos que convivi como a **Andressa**, **Professor Walter** e a **Professora Symone**. Vocês provaram que amigos são a família que escolhemos para viver.

E é claro não poderia deixar de dedicar a minha dupla de clínica, minha dupla de TCC **Rafael**, que provou que o milagre chamado amizade existe. Só poderia deixar uma frase: às vezes na vida, você encontra um amigo especial, alguém que faz você rir, que faz você acreditar em coisas boas, que convence você de que existe uma porta destrancada só esperando para que você abra. Esta é a amizade para sempre.

DEDICATÓRIA de Rafael

Aos meus pais, **Noé Joaquim Vieira e Helenice da Silva Brizola Vieira** por todo carinho, amor e educação transmitidos a mim para construção de um homem capaz de buscar seus objetivos. Nenhuma palavra escrita aqui poderia traduzir o quão grato sou.

Aos meus irmãos **Willian Brizola Vieira e Simone Aparecida Brizola Vieira**, bem como meu primo, **Bruno Anderson Dias Santos Ribeiro**, por me ensinarem desde cedo a importância de uma amizade verdadeira.

À Profa. Dra. **Maria Nadir Gasparoto Mancini** (*in memoriam*) por despertar em mim o interesse na área acadêmica, por acreditar no meu potencial e sem a qual, indubitavelmente, esse trabalho não seria possível.

À minha parceira nesse trabalho e grande amiga ao longo de toda a graduação, **Danielle Sá dos Santos**, com a qual dividi sorrisos, experiências e “algumas” brigas, mas com quem sempre pude contar.

A todos os integrantes da minha família, por todo carinho, dedicação, conselhos, apoio e confiança transmitidos ao longo de toda minha vida.

À minha república Arsenal: **Raniere Guimarães, Matheus Alves Biserra e Renato Niyama Ujissato** por transformarem meu ambiente estudantil em algo fraterno, me ensinaram a conviver e respeitar as diferenças.

Às minhas vizinhas de república: **Vivian Narana Ribeiro El Achkar, Bruna Caldas e Mariana de Oliveira França**, amigas presentes em momentos extremos de alegria e angústia, pessoas das quais nunca me esquecerei.

À minha turma de graduação (9ª turma do noturno): **Axel Conti, Carlos Paschoal, Carolina Anne Guimarães, Elisângela Chetelat, Emanuel da Silva**

Rovai, Fagner Felix, Felipe Scucel Prats, Gabriela da Silva Freitas, Júlio Nogueira Luz, Jussimara Akemi Ishikawa, Luis Ricardo Cera, Paula Arantes e Samara Lobo, companheiros de triunfos e fracassos, risadas e preocupações, com eles vivi os melhores anos da minha vida.

Aos amigos feitos ao longo dos 6 anos de graduação, mas que infelizmente não fizeram ou deixaram de fazer parte da minha turma: **Gabriel Arruda, Marcel Corsi, Aline Garbim, Rafaela Sugawara, César Senna e Caio Brandão Neto**; pessoas que proporcionaram-me lembranças extraordinárias.

Ao Prof. Tit. **Walter Domingos Niccoli Filho**, por todo o conhecimento adquirido durante 3 anos de estágio na disciplina de Propedêutica Estomatológica, com ele descobri que ninguém sabe o bastante para ser incapaz de aprender e que ninguém é tão ignorante que não possa ensinar. Um professor totalmente envolvido no desenvolvimento do aluno, um amigo que jamais esquecerei.

À Prof^a Assist. Dra. **Symone Cristina Teixeira**, por ser uma grande amiga ao longo dos 6 anos, mostrando-me a importância do lado social de nossa profissão, uma verdadeira “mãezona”, não a toa, admirada por todos da minha turma.

Aos professores e amigos, tidos e feitos antes da aprovação no vestibular, sem os conhecimentos transmitidos e experiências vividas minha aprovação nunca se concretizaria. Dentre os amigos, cito com especial carinho: **Tayná Caroline Freitas Guimarães, Vanessa Portela Carvalho e Jonathan Costa de Paula**, as duas primeiras por me ensinarem que a verdadeira amizade persiste e o último por me ensinar o real valor de um amigo.

AGRADECIMENTOS

À UNESP – Univ. Estadual Paulista, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara.

A todo o corpo docente da universidade, os principais responsáveis por nos transmitirem os valores, conceitos, conhecimentos e técnicas para exercer com excelência a profissão de Cirurgião-Dentista.

Aos nossos companheiros de turma (9ª turma do noturno) em especial: Carolina Anne Guimarães, Emanuel da Silva Rovai, Júlio Nogueira Luz, Luis Ricardo Cera, Mariana de Oliveira França e Samara Lobo e aos demais colegas, Andressa Rodrigues, Carolina Oliver, Rafael Lodi, Julio Ferraz e Rodnei Rossoni, que participaram desse trabalho como grupo controle e que participaram da nossa vida acadêmica como bons amigos.

À Profa. Maria Nadir Gasparotto Mancini por imaginar, planejar e elaborar grande parte desse trabalho, sem seu esforço e imenso intelecto esse trabalho jamais seria realizado. Infelizmente ela não pôde vê-lo pronto, mas com certeza, de onde estiver, sente orgulho dos resultados alcançados por nós.

À Profa. Luciane Dias de Oliveira por todo apoio e dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo fibra e determinação na hora em que estávamos desamparados, bem como competência e sabedoria frente aos obstáculos encontrados durante nossa jornada.

À doutoranda Michelle Cardoso por nos incentivar e ajudar no decorrer de todo o processo.

À Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira, com a qual aprendemos que ações simples realizadas com dedicação e zelo podem transmitir saúde e bem-estar aos mais necessitados. Uma amiga sempre disposta a ajudar e que nos auxiliou muito na etapa de educação de higiene oral desenvolvida na ASIN.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de nossas bolsas de iniciação científica, bem como pelo Auxílio à Pesquisa que possibilitou a realização desse trabalho.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”.

Benjamin Disraeli

Antioxidantes e biomarcadores da injúria oxidativa na saliva de pacientes com Síndrome de Down

Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in saliva of patients with Down syndrome

RESUMO

Foi objetivo desta pesquisa investigar o sistema antioxidante enzimático, não enzimático salivar e a concentração de biomarcadores de injúria oxidativa na saliva de pacientes com síndrome de Down. Foram coletadas amostras salivares de 30 pacientes com SD e 30 pacientes controle, com idades entre 14 e 24 anos. As amostras foram centrifugadas e submetidas às seguintes análises: a) quantificação dos níveis de SOD; b) quantificação de malondialdeído; c) quantificação de proteínas carboniladas; d) determinação da concentração de ácido úrico; e) quantificação da vitamina C; f) quantificação de proteína total; g) determinação da concentração de peroxidase; h) capacidade antioxidante total. Os resultados demonstraram que os pacientes portadores da síndrome de Down apresentaram aumento significativo na concentração da superóxido dismutase em relação ao controle ($p < 0,05$) e apresentaram níveis significativamente mais altos de malondialdeído em relação ao controle ($p < 0,05$); não houve diferença significativa em relação às proteínas carboniladas ($p > 0,05$) e também não houve diferença significativa em relação aos antioxidantes avaliados (ácido úrico, vitamina C, peroxidase e capacidade antioxidante total) nos pacientes com síndrome de Down em comparação ao controle ($p > 0,05$). Além disso, esses pacientes apresentaram níveis mais altos de proteína total na saliva ($p < 0,05$). Assim, pode-se concluir que os pacientes com SD apresentaram vulnerabilidade ao estresse oxidativo em saliva, com aumento significativo de malondialdeído, e que, apesar de demonstrarem presença de antioxidantes semelhantes ao controle, houve maior concentração e maior atividade da enzima superóxido dismutase na saliva.

UNITERMOS: Síndrome de Down. Estresse oxidativo salivar. Antioxidantes salivar.

ABSTRACT

Vulnerability of patients with Down syndrome (DS) to oxidative stress and damage has been attributed to the overexpression of the superoxide dismutase gene, which is located in the triplicated critical region 21q22.2 of chromosome 21. The objective of this study was to investigate enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems and levels of biomarkers of oxidative damage in saliva of patients with DS. Saliva samples were collected from 30 patients with DS and 30 controls, ranging in age from 14 to 24 years. The following parameters were analyzed: superoxide dismutase activity, concentration of malondialdehyde, carbonylated proteins, uric acid, vitamin C and total protein, peroxidase activity, and total antioxidant capacity. Patients with DS presented significantly higher superoxide dismutase activity and malondialdehyde levels than controls ($p<0.05$). On the other hand, no difference in carbonylated proteins or antioxidants (uric acid, vitamin C, peroxidase, and total antioxidant capacity) was observed between DS patients and controls ($p>0.05$). Patients with DS also presented higher salivary total protein content ($p<0.05$). In conclusion, despite similar antioxidant levels patients with DS are more vulnerable to oxidative stress in saliva as indicated by a significant increase in malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity.

UNITERMS: Down syndrome. Oxidative stress. Salivary antioxidants.

INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é uma condição genética autossômica que causa várias complicações sistêmicas nos indivíduos acometidos. Após o completo sequenciamento genômico do cromossomo 21, as investigações sobre o estresse oxidativo em fluídos biológicos, órgãos de portadores de SD e placenta de gestantes de bebês com SD têm aumentado na tentativa de explicar as causas de várias alterações clínicas comuns nesses indivíduos, com ênfase o envelhecimento precoce, elevada incidência de leucemia, neurodegeneração como doença de Alzheimer e predisposição a doenças infecciosas do sistema respiratório e gastrointestinal (Gardiner & Davisson, 2000; Sun et al., 2011). Assim, está bem documentado que pessoas com SD apresentam aumento na vulnerabilidade ao estresse oxidativo em plasma, eritrócito, tecido cerebral, cardíaco, pulmonar, mucosa gástrica e timo o que sugere que a capacidade antioxidante diminuída contribui para certos aspectos fenotípicos da SD (Garcez et al., 2005; Cenini et al., 2011; Hamed et al., 2011). Neste contexto, alguns estudos têm relacionado a vulnerabilidade ao estresse oxidativo com a hiperexpressão de genes triplicados da superóxido dismutase (SOD), uma enzima antioxidante associada a zinco e cobre que promove a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), localizada na região crítica 21q22.2 do cromossomo 21 (Zitnanová et al., 2006, Sun et al., 2011).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas, principalmente nos sistemas de geração de ATP. Por outro lado, quando sua produção excede os níveis desejados pelo organismo, devido a um aumento na sua produção e/ou a redução na eliminação, ocorre como consequência um desequilíbrio, dessa forma, o organismo passa por um estresse oxidativo (Dalle-Donne et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007). O estresse oxidativo pode gerar efeitos deletérios sobre as células e tecidos do organismo, pois são capazes de causar danos às bases nitrogenadas do DNA,

causar desnaturação de proteínas produzindo proteínas carboniladas e peroxidação de lipídios com formação de vários produtos, entre eles, o malondialdeído (MDA) (Ribeiro et al., 2003; Halliwell, 2007; Canakci et al., 2009; Wei et al., 2010). Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode estar relacionado tanto com os mecanismos fisiopatológicos primários ou secundários de múltiplas doenças agudas e crônicas, dentre as quais podemos destacar doenças cardiovasculares, pulmonares, aterosclerose, diabetes mellitus, câncer, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, e algumas doenças comuns na SD. Há também hipóteses de que o estresse oxidativo tem grande importância nos processos de envelhecimento (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Ribeiro et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007, Cenini et al., 2011), no entanto, não há até o momento evidências consistentes que comprovam o peso do estresse oxidativo sobre o fenômeno do envelhecimento (Ferreira & Matsubara, 1997).

Como forma de proteção contra os danos oxidativos causados pelo acúmulo das EROs, o organismo dispõe de um sistema de defesa de eliminação desses compostos. Com isso, o papel mais importante exercido nesse processo é o dos antioxidantes, também denominados de “Varredores de radicais livres” (Kuss, 2005). Estes agem em sistemas para diminuir ou inibir a oxidação, por meio de reações de oxirredução das EROs, transformando-os em produtos inócuos ou menos tóxicos para o organismo (Halliwell; Cross, 1994).

Tendo em vista que a saliva entra em contato com produtos externos tais como alimentos, bebidas ou substâncias voláteis inaladas é, portanto, essencial para a manutenção da saúde oral e sistêmica graças às múltiplas funções de defesa do hospedeiro. Além disso, é um fluído rico em compostos orgânicos e inorgânicos como proteínas, enzimas, imunoglobulinas e vários íons. Dessa forma, muitos trabalhos têm quantificado e caracterizado esses componentes salivares, avaliando suas funções e seus efeitos sobre a cavidade

bucal (Defabianis & Re, 2003; Greabu et al., 2007). Assim, alguns estudos têm sido realizados a fim de conhecer o perfil antioxidante neste biofluido (Yigla et al., 2007; Aizenbud et al., 2008; Gumus et al., 2009; Livnat et al., 2010).

Sabendo que os indivíduos portadores de SD exibem alterações nos níveis dos componentes antioxidantes em plasma, eritrócito, tecido cerebral, cardíaco, pulmonar, mucosa gástrica e timo, nossa hipótese é que esta vulnerabilidade ao estresse oxidativo também ocorra na saliva. Há escassez de estudos sobre os níveis de substâncias antioxidantes e biomarcadores de injúria oxidativa na saliva dos indivíduos com SD, e os já realizados demonstraram resultados contraditórios sobre o uso da sialoquímica para explicar o papel da saliva na saúde oral e bem estar de indivíduos portadores de SD. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o sistema antioxidante enzimático, não enzimático salivar e o nível de biomarcadores de injúria oxidativa na saliva de pacientes com Síndrome de Down.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP sob o protocolo de nº 01/2009-PH/CEP (Anexo A).

Seleção dos pacientes

Foi selecionado um grupo de 30 pacientes portadores de síndrome de Down (GSD) de ambos os sexos e na faixa etária de 14 a 24 anos, e um grupo controle (GC) constituído de 30 indivíduos saudáveis na mesma faixa etária, sexo e nível sócio-econômico do GSD.

Os pacientes do grupo GSD foram selecionados na Associação para Síndrome de Down (ASIN), Bairro Parque Industrial, São José dos Campos - SP e na Associação de Pais e Amigos do Down (ASPAD), Bairro Campo Grande, Jacareí - SP. Os indivíduos do GC foram selecionados em Escolas estaduais da região. Foram excluídos do estudo os pacientes que faziam uso de terapia antioxidante, portadores de diabetes, nefropatia, doença inflamatória sistêmica e/ou oral, fumantes e que faziam uso de bebidas alcoólicas.

Antes do processo de seleção, os participantes e pacientes, assim como os pais ou responsáveis legais pelos pacientes menores de idade e portadores de SD foram consultados e informados sobre a importância desse estudo e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Coleta da saliva

As amostras de saliva dos indivíduos dos GSD e GC foram coletadas no período da manhã entre 9-11h e no mínimo duas horas após a última refeição e higiene oral para evitar a influência do ritmo circadiano e efeitos da dieta e produtos da higiene na variabilidade da composição salivar. Os voluntários não ingeriram sucos ou alimentos contendo vitamina C nos dias das coletas.

A saliva foi coletada do assoalho da boca por aspiração contínua do fluido acumulado nessa região por meio de uma bomba sugadora de baixa potência Aspira-Max da marca NS (Compact suction device MA 520, NS. São Paulo, Brasil). Durante o tempo de coleta, o frasco coletor foi mantido em uma cuba refrigerada. A coleta prosseguiu até que 2 mL de saliva fossem coletados ou o tempo máximo estabelecido para a coleta (15 minutos) fosse alcançado.



FIGURA 1 - Coleta de saliva do assoalho bucal por aspiração contínua do fluido acumulado.

Após a coleta, as amostras de saliva foram centrifugadas (Hermle Z 300K – Labnet, Germany) sob refrigeração a 4°C e 10000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi distribuído em vários microtubos e congelado a -80°C até o momento das análises. Todas as análises foram realizadas em duplicatas ou triplicatas nos casos de não reprodutibilidade dos resultados.

Análises da saliva

Atividade enzimática da peroxidase

A atividade enzimática específica da peroxidase presente na saliva foi determinada pela alteração da absorbância a 460 nm (Siqueira & Nicolau, 2002; Siqueira et al., 2007), em uma mistura constituída por tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, o-dianisidina 10 mM dissolvida em metanol, peróxido de hidrogênio 2,1 mM e 100 µL da amostra de saliva.

Foi utilizada como curva-padrão uma solução de lactoperoxidase (Sigma – Aldrich - São Paulo, Brasil). Os valores referente à atividade da peroxidase salivar foram expressos em µg/mg de proteína (Siqueira Junior, 2005).

Atividade enzimática da superóxido dismutase

A atividade enzimática específica total das isoenzimas da SOD (CuZnSOD e MnSOD) salivar foi baseada no método da xantina oxidase/XTT descrito por Ukeda et al. (1997). Este método emprega xantina e xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (I.N.T.) para formar o composto vermelho de formazan. A atividade da superóxido dismutase é medida através do grau de inibição desta reação. Para realização do teste foi utilizado o kit RANSOD (Randox.Laboratories Ltd) e os valores da absorbância (505 nm) foram transformados em porcentagem de inibição da reação e em concentração da enzima SOD presente na amostra.

Ácido úrico

A concentração de ácido úrico presente na saliva foi determinada pelo método colorimétrico uricase/4-aminoantipirina. Neste ensaio, o ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogênio, o qual sob influência catalítica da peroxidase reage com

DHBS (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato) e 4-aminoantipirina formando o cromógeno antipirilquinonimina de coloração vermelha que absorve em 520 nm. Foi utilizado o Kit Ácido Úrico Liquiform (Labtest) e a concentração de ácido úrico em cada amostra foi expressa em mg/dL.



FIGURA 2 – Cubetas preparadas para análise da concentração de ácido úrico.

Ácido ascórbico (vitamina C)

A concentração de ácido ascórbico na saliva foi medida pelo método colorimétrico da ferrozina descrito por Butts & Mulvihill (1975). Este método cromogênico consiste na redução do íon férrico a íon ferroso pelo ascorbato, o qual é convertido simultaneamente a ácido dehidroascórbico. O íon ferroso formado reage subsequente com a ferrozina formando um complexo colorido que absorve em 570 nm. Uma curva-padrão de ácido ascórbico foi utilizada para calibrar o ensaio. Os valores da densidade óptica foram convertidos em concentração de ácido ascórbico pelo programa Graph Pad Prism (versão 5.04).

Devido à facilidade de oxidação da vitamina C em pH fisiológico ou alcalino, as amostras de saliva destinadas à análise da vitamina C foram imediatamente acidificadas após sua coleta (Vasconcelos et al., 2007).

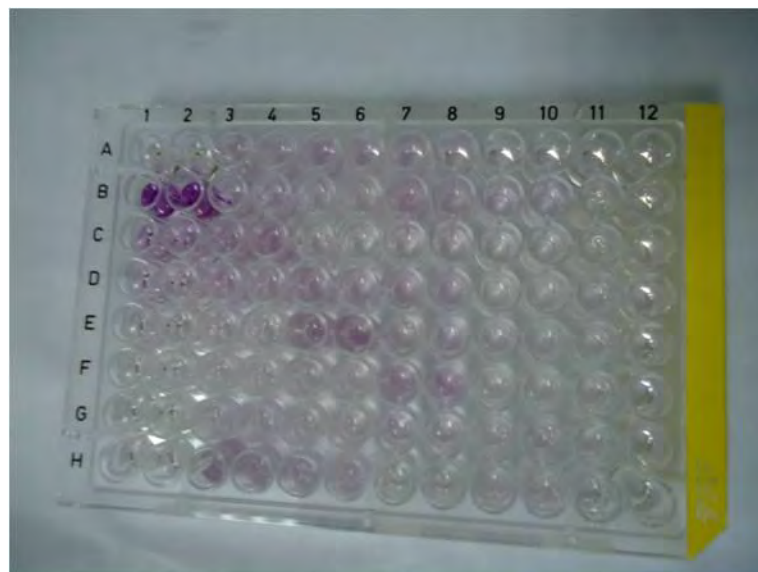


FIGURA 3 – Microplaca após leitura para dosagem de vitamina C.

Capacidade antioxidante total da saliva

A capacidade antioxidante total (TAS) das amostras de saliva foi avaliada pelo ensaio do ABTS (2,2'-azino diethyl-benzothiazoline sulfonic acid). Neste teste, ABTS é incubado com metmioglobina e H_2O_2 para produzir o radical catiônico ABTS, que é relativamente estável e apresenta coloração azul esverdeado que absorve em 600 nm. Na presença de antioxidantes na amostra analisada, a quantidade do radical catiônico ABTS produzido diminui. Assim, a absorção é inibida dependendo da capacidade antioxidante total. Foi utilizado o Kit Total Antioxidante Status (TAS – Randox Laboratories Ltd), de acordo com Nagler et al. (2002) e Aizenbud et al. (2008) e os resultados foram expressos em mmol/L.

Malondialdeído (MDA)

O método baseia-se na reação do MDA, produto final da oxidação de lipídios poliinsaturados pelos EROs, cuja concentração no meio é um biomarcador da extensão da peroxidação lipídica causada pelo

estresse oxidativo. Nesse ensaio, o MDA salivar reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo que é determinado por espectrofotometria. Dessa forma, a peroxidação lipídica nas amostras é avaliada em termos de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS-Thiobarbituric acid reactive substances) segundo o método descrito por Satoh (1978). Foi utilizado o Kit OxiSelect TBARS Assay (STA-330, Cell Biolabs, Inc), com curva-padrão de 0 μ M a 250 μ M de MDA. Os testes foram realizados em duplicata e a absorbância lida em espectrofotômetro de microplacas a 530 nm. Os dados da densidade óptica foram convertidos em concentração de malondialdeído pelo programa Graph Pad Prism (versão 5.04).

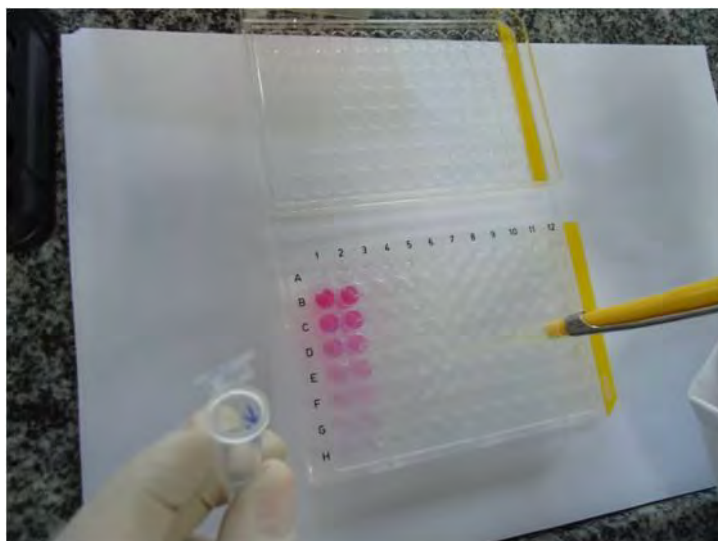


FIGURA 4 – Microplaca sendo preparada para leitura - determinação da concentração de malondialdeído.

Proteínas carboniladas

As proteínas carboniladas são formadas como consequência do ataque dos radicais livres sobre as cadeias laterais dos aminoácidos. O ensaio dos grupos carbonilas pelo método de Levine et al. (1990) utiliza o corante 2,4-dinitrofenilhidrazina, o qual se liga aos

resíduos danificados das proteínas formando um produto que apresenta máxima absorbância em 370 nm (Pádua 2010). O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ e foi expressa por nmol de proteína carbonilada por mg de proteína total presente na saliva (Pádua, 2010).

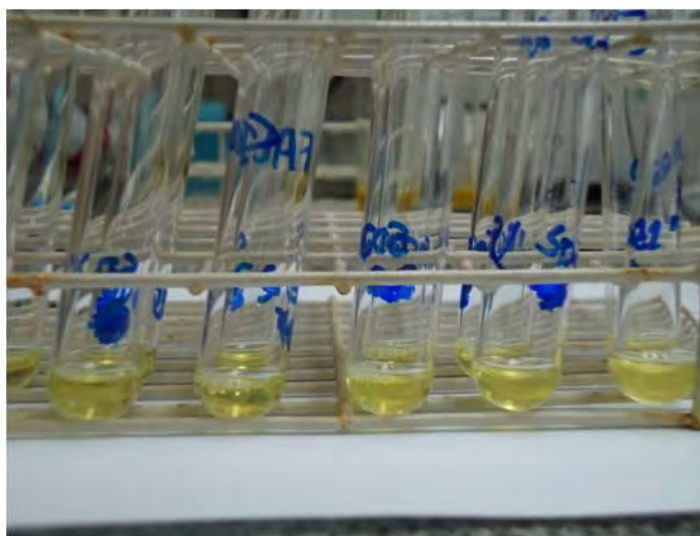


FIGURA 5 – Tubos sendo preparados para análise de proteínas carboniladas.

Proteína total na saliva

O conteúdo proteico da saliva foi avaliado pelo método modificado de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. O princípio desse método baseia-se na redução de uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) pelas proteínas, na presença do catalisador cobre, no qual a concentração do produto final da reação foi medida pelo método espectrofotométrico a 660 nm. Os valores da densidade óptica de cada amostra foram convertidos em concentração de proteína total pelo programa Graph Pad Prism (versão 5.04).

Análise estatística

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados foram expressos na forma de valores médios e desvios-padrão e submetidos ao teste t de *Student* não pareado, para determinar diferenças entre o grupo de pacientes portadores da síndrome de Down e o grupo controle. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores médios e desvios-padrão obtidos pelos grupos GSD e GC em todas as análises estão apresentados na Tabela 1.

O GSD apresentou quantidade significativamente maior de SOD (média $0,984 \pm 0,85$ U/mL), MDA (média $6,72 \pm 4,22$ μ M) e proteína total (média $3,65 \pm 1,28$ nmol/mg de proteína) na saliva em relação ao GC (SOD: $0,190 \pm 0,19$ U/mL, MDA: $3,96 \pm 3,65$ μ M, proteína total: $2,16 \pm 0,69$ nmol/mg de proteína), $p < 0,05$. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos GSD e GC ($p > 0,05$) em relação à concentração de proteínas carboniladas (GSD: $0,059 \pm 0,049$ nmol/mg de proteína; GC: $0,063 \pm 0,038$ nmol/mg de proteína), concentração de ácido úrico (GSD: $5,56 \pm 3,98$ mg/dL; GC: $4,30 \pm 1,91$ mg/dL), vitamina C (GSD: $10,94 \pm 4,47$ μ mol/L, GC: $8,58 \pm 5,02$ μ mol/L), atividade da peroxidase (GSD: $2,01 \pm 0,66$ μ g/mg de proteína, GC: $2,10 \pm 0,62$ μ g/mg de proteína) e capacidade antioxidante total (GSD: $0,600 \pm 0,39$ mmol/L, GC: $0,490 \pm 0,341$ mmol/L).

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão das análises realizadas nesse estudo obtidos pelos GSD e GC.

	GSD	GC
	Média ± Desvio-padrão	Média ± Desvio-padrão
Concentração SOD**	0,984 ± 0,85 U/mL	0,190 ± 0,19 U/mL
MDA **	6,72 ± 4,22 µM	3,96 ± 3,65 µM
Proteína Total**	3,65 ± 1,28 mg/mL	2,16 ± 0,69 mg/mL
Proteínas Carboniladas*	0,059 ± 0,049 nmol/mg de proteína	0,063 ± 0,038 nmol/mg de proteína
Ácido Úrico*	5,56 ± 3,98 mg/dL	4,30 ± 1,91 mg/dL
Vitamina C*	10,94 ± 4,47 µmol/L	8,58 ± 5,02 µmol/L
Peroxidase*	2,01 ± 0,66 µg/mg de proteína	2,10 ± 0,62 µg/mg de proteína
TAS*	0,600 ± 0,399 mmol/L	0,490 ± 0,341 mmol/L

**Diferença estatística significativa (p<0,05) / *Diferença estatística não significativa (p>0,05)

DISCUSSÃO

Estudos têm relatado várias doenças ou condições fisiológicas relacionadas ao estresse oxidativo, como aterosclerose, Síndrome de Bloom, Kwashiorkor, Doença de Keshan, incluindo a síndrome de Down (Vasconcelos et al., 2007). Os portadores de SD apresentam aumento na vulnerabilidade ao estresse oxidativo em plasma, eritrócito, tecido cerebral, cardíaco, pulmonar, mucosa gástrica e timo o que sugere que a capacidade antioxidante diminuída contribui para certos aspectos fenotípicos da SD como o envelhecimento precoce, elevada incidência de leucemia, neurodegeneração como doença de Alzheimer e predisposição às doenças infecciosas do sistema respiratório e gastrointestinal (Garaiová et al., 2004; Garcez et al., 2005).

No presente estudo, pode-se observar que o GSD apresentou quantidade significativamente maior da enzima SOD na saliva em relação ao GC. Estes resultados concordam com alguns estudos que demonstram que o nível dessa enzima é elevada em pacientes com SD em função da superexpressão de genes triplicados da SOD (Groner et al., 1994, de la Torre et al, 1996, Zitnanová et al., 2006). O papel da superóxido dismutase (SOD) é acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido produzido durante o processo oxidativo de energia em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Assim, a elevada atividade da SOD causa aumento na produção de H_2O_2 que é um importante agente oxidante (Velloso et al., 2007), o qual reage lentamente com tióis, sais de ferro e cobre reduzidos, proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas.

Apesar de a SOD ser uma enzima antioxidante, sua presença marcante nos pacientes com SD pode promover um acúmulo de peróxido de hidrogênio, o qual pode ser responsável por alguns danos oxidativos, sendo importante verificar se os outros mecanismos antioxidantes presentes na saliva são suficientes para minimizar possível estresse oxidativo. De acordo com os resultados do presente estudo e dos estudos que também avaliaram a atividade dessa enzima na saliva de pacientes com doença periodontal e portadores de fibrose cística (Kim et al., 2010; Livnat et al., 2010) é possível dizer que este biofluido pode ser utilizado como uma ferramenta de avaliação do perfil antioxidante salivar, contribuindo para a determinação do diagnóstico ou evolução clínica de algumas doenças.

O estresse oxidativo, que ocorre como uma consequência de desequilíbrio entre a formação de radicais livres de oxigênio e a inativação destas espécies pelo sistema de defesa antioxidante, é capaz de causar prejuízos a vários constituintes celulares e extracelulares (Canakci et al., 2009). Quando as espécies reativas de oxigênio interagem com os ácidos graxos poliinsaturados nas membranas ou

lipoproteínas, inicia-se o processo de peroxidação lipídica (Agha-Hosseini et al., 2009). Devido à peroxidação lipídica ser um resultado do estresse oxidativo, inúmeros marcadores têm sido utilizados para monitorar este processo, sendo o MDA um dos principais e mais estudados produtos da peroxidação dos ácidos graxos insaturados que pode indicar o aumento do estresse oxidativo (Agha-Hosseini et al., 2009; Canakci et al., 2009; Wei et al., 2010). No atual estudo, pode-se observar que os pacientes com SD apresentaram valores estatisticamente superiores de MDA na saliva ($6,72 \pm 4,22 \mu\text{M}$) em relação ao GC ($3,96 \pm 3,65 \mu\text{M}$). Estes resultados obtidos na saliva concordam com os estudos que demonstraram aumento na vulnerabilidade ao estresse oxidativo em plasma, eritrócito, tecido cerebral, cardíaco, pulmonar, mucosa gástrica e timo de pacientes portadores da síndrome (Garcez et al., 2005; Casado et al., 2007, Cenini et al., 2011 Hamed et al., 2011; Sun et al., 2011), de modo que a saliva apresentou potencial para indicar um possível estresse oxidativo nos pacientes com SD.

Estudos têm utilizado a saliva para verificar os níveis de MDA em diferentes condições patológicas, como em pacientes com doença periodontal, líquen plano e indivíduos com diabetes tipo 2 (Al-Rawi, 2011; Agha-Hosseini et al. 2009; Canakci et al. 2009). Contudo, assim como a saliva pode ser usada para verificar estresse oxidativo e atividade de diversas doenças, também pode ser empregada para avaliar marcadores de injúria oxidativa em pacientes com SD, uma vez que os resultados da presente pesquisa possibilitaram verificar aumento no nível de biomarcador de peroxidação lipídica na saliva desses pacientes. Assim, a saliva torna-se uma importante ferramenta de estudo para avaliar sistemas antioxidantes e estresse oxidativo, resultando em um método diagnóstico menos invasivo.

Outra forma de avaliar o estresse oxidativo é pela peroxidação de proteínas, pois quando as proteínas entram em contato com as espécies reativas de oxigênio, grupos carbonilas são introduzidos

por uma variedade de rotas oxidativas, como oxidação das cadeias laterais de aminoácidos, principalmente os aromáticos (ex: lisina, argenina, prolina e treonina) obtendo como produto as proteínas carboniladas (Levine et al., 1994; Dalle-Donne et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007). Na presente pesquisa, não foi observada diferença estatisticamente significativa no conteúdo de proteínas carboniladas na saliva do GSD ($0,059 \pm 0,049$ nmol/mg de proteína) e GC ($0,063 \pm 0,039$ nmol/mg de proteína). Não são observados na literatura estudos que avaliam o conteúdo de proteínas carboniladas na saliva de pacientes SD, entretanto, estudos têm avaliado a presença de proteínas carboniladas no plasma sanguíneo e em cérebro como indicador de estresse oxidativo em pacientes com SD (Balcz et al. 2001; Ordonez et al. 2010; Cenini et al., 2011).

Ainda neste contexto, estudos relacionados com estresse oxidativo em indivíduos com outras doenças, como câncer bucal e pacientes fumantes, utilizaram a saliva para verificar a presença de proteínas carboniladas (Bahar et al. 2007; Nagler 2007). Assim, a saliva pode ser utilizada para avaliar estresse oxidativo em proteínas, no entanto, na presente pesquisa não foram observadas diferenças na carbonilação de proteínas entre os grupos como ocorreu na peroxidação lipídica. Com isso, torna-se importante ampliar os estudos nesta área, intensificando as análises salivares em pacientes com SD, utilizando diferentes metodologias para analisar a carbonilação de proteínas. Uma vez que os biomarcadores de danos oxidativos não são exatamente os mesmos em diversas doenças, como câncer, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose e diabetes mellitus (Vasconcelos et al., 2007), o estresse oxidativo na saliva pode estar mais relacionado com peroxidação lipídica em pacientes com SD, como observado na atual pesquisa. No entanto, são necessários mais estudos para obter resultados conclusivos.

Com relação aos antioxidantes não enzimáticos, o GSD apresentou valores médios superiores de ácido úrico ($5,56 \pm 3,98$ mg/dL) e de vitamina C ($10,94 \pm 4,47$ μ mol/L) em relação ao GC (ácido úrico: $4,30 \pm 1,91$ mg/dL, vitamina C: $8,58 \pm 5,02$ μ mol/L), entretanto, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Sabendo-se que o estresse oxidativo se dá por um desequilíbrio entre a formação de radicais livres de oxigênio e a inativação destas espécies pelo sistema de defesa antioxidante, pode-se verificar que o GSD apresentou importantes níveis de ácido úrico na saliva, comparados ao GC, demonstrando que não houve diminuição deste antioxidante na saliva. Inúmeros estudos avaliaram o conteúdo de ácido úrico na saliva como indicador antioxidante em diversas condições patológicas, como em casos de diabetes 1 e 2 e doença periodontal (Bahar et al., 2007; Yigla et al., 2007; Aizenbud et al., 2008; Gumus et al., 2009; Brik et al., 2010; Livnat et al., 2010; Al-Rawi, 2011). Dessa forma, o ácido úrico é um importante antioxidante a ser analisado na saliva em diferentes pacientes submetidos a estresse oxidativo.

A vitamina C também atua como importante antioxidante não enzimático. Neste estudo, o GSD apresentou níveis de vitamina C na saliva estatisticamente semelhantes ao GC, demonstrando que os pacientes SD não possuem deficiências no sistema antioxidante do ascorbato. Outros estudos avaliaram os níveis de vitaminas, dentre elas a vitamina C, no soro e na saliva de pacientes com ulceração aftosa recorrente e pacientes epiléticos, respectivamente. Os resultados demonstraram que foi possível identificar níveis de vitamina C nesses dois biofluidos corporais (Saral et al., 2005; Sobaniec et al., 2007).

Com relação ao sistema antioxidante enzimático, na atual pesquisa não foi observada diferença significativa na atividade da peroxidase salivar no GSD ($2,01 \pm 0,66$ μ g/mg de proteína) em relação ao GC ($2,10 \pm 0,62$ μ g/mg de proteína). Da mesma forma, não foi verificada diferença significativa na quantidade e atividade de mieloperoxidase e

catalase em neutrófilos de pacientes com SD com e sem defeitos cardíacos congênitos em comparação ao controle (Akinci et al., 2010). Estes resultados discordam de outros estudos que verificaram diminuição da atividade da peroxidase salivar, respectivamente, em crianças com SD de 6 a 10 anos de idade e de 1 a 5 anos de idade (Siqueira & Nicolau 2002; Siqueira et al., 2007). Por outro lado, no presente estudo, os pacientes com SD apresentaram níveis estatisticamente superiores de proteína total ($3,65 \pm 1,28$ mg/dL) em relação ao controle ($2,16 \pm 0,69$ mg/dL), concordando com os estudos acima citados, os quais também verificaram significativo aumento no conteúdo total de proteínas na saliva de crianças com SD de 6 a 10 anos e de 1 a 5 anos, respectivamente (Siqueira & Nicolau, 2002; Siqueira et al., 2007). De acordo o exposto torna-se importante ampliar os estudos nesta área, uma vez que os resultados apresentados com relação à atividade da peroxidase salivar são conflitantes.

A avaliação da TAS tem sido bastante utilizada para avaliar estresse oxidativo em diversos pacientes (Bahar et al., 2007; Aizenbud et al., 2008; Brik et al., 2010; Livnat et al., 2010), uma vez que o sistema antioxidante apresenta muitos componentes e que uma deficiência em quaisquer destes componentes pode causar redução no estado antioxidante global de um indivíduo. Assim, a avaliação da TAS possibilita a avaliação do sistema antioxidante integrado que cerca todos os componentes biológicos com atividade antioxidante. Os resultados do atual estudo demonstraram que o GSD apresentou valores de TAS ($0,600 \pm 0,39$ mmol/L) semelhantes ao GC ($0,490 \pm 0,341$ mmol/L), concordando com os resultados de alguns antioxidantes isolados avaliados neste estudo, como ácido úrico, vitamina C e peroxidase. Esses resultados discordam do estudo de Carratelli et al. (2001), que verificou no soro de crianças portadoras da síndrome quantidade significativamente maior de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle e capacidade antioxidante total significativamente menor.

Contudo, o presente estudo concluiu que a saliva é uma ferramenta importante para a avaliação do perfil salivar antioxidante e dos níveis de biomarcadores de injúria oxidativa em pacientes com SD, demonstrando aumento significativo da atividade da SOD, MDA e conteúdo de proteína total. Além disso, foi possível verificar que os pacientes com SD não apresentaram alterações significativas nos antioxidantes salivares avaliados (ácido úrico, vitamina C, peroxidase e TAS) e conteúdo de proteína carbonilada. Entretanto, faz-se necessária a ampliação dos estudos nesta área, que é de grande importância para população mundial, com intuito de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com SD, minimizando os danos do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Agha-Hosseini F, Mirsaii-Dizgah, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *Int J Dent Hygiene* 2009;7:246-50.
2. Aizenbud D, Peri-Front Y, Nagler RM. Salivary analysis and antioxidants in cleft lip and palate children. *Arch Oral Biol* 2008;53:517-22.
3. Akinci O et al. Neutrophil oxidative metabolism in Down syndrome patients with congenital heart defects. *Environ Mol Mutagen* 2010;51(1):57-63.
4. Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diabetic Vasc Dis Res* 2011;8:22-8.
5. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary Analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer*. 2007;109(1):54-9.
6. Butts WC, Mulvihill HJ. Centrifugal analyser determination of ascorbate in serum or urine with Fe^{+2} ferrozine. *Clin Chem*. 1975 Sept;21(10):1493-7.

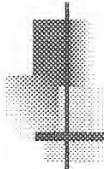
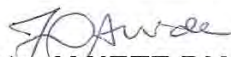
7. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Euro J Dent* 2009;3:100-6.
8. Carratelli et al. Reactive oxygen metabolites and prooxidant status in children with Down's syndrome. *Int J Clin Pharmacol Res* 2001;21(2):79-84.
9. Casado A, Lopez-Fernades ME, Ruiz R. Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(1):59-62.
10. Cenini G, Dowling ALS, Beckett TL, Barone E, Macuso C, et al. Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function.
11. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006;52(4):601-23.
12. Defabianis P, Re F. The role of saliva in maintaining oral health. *Minerva Stomatol*. 2003 June;52(6):301-8.
13. De la Torre R, Casado A, López-Fernández E, Carrascosa D, Ramírez V, Sáez J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy. *Experientia*. 1996 Sept; 52(9):871-3.
14. Greabu M. Could constituent saliva the first line of defense against oxidative stress? *Rom J Intern Med*. 2007;45(2):209-13.
15. Groner Y et al. Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome. *Biomed Pharmacother* 1994;48(5-6):231-40.
16. Gumus P et al. Salivary antioxidants in patients with type 1 or 2 diabetes and inflammatory periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol* 2009;80(9):1440-6.
17. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 Dec;102(Suppl 10):5-12.

18. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50.
19. Hamed RR, Maharem TM, Abdel-Meguid N, Sabry GM, Abdalla A, Guneidy RA. Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: A comparative study. *Research in Developmental Disabilities.* 2011; 32:1470–1482.
20. Kim S, Kim O, Kim O, Kim Y, Chung H. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci* 2010;40:164-171.
21. Kuss F. Agentes oxidantes e antioxidantes [seminário apresentado no primeiro semestre de 2005 no programa de pós-graduação em ciências veterinárias]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
22. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
23. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:346-57.
24. Livnat G, Bentur L, Kuzmisnsky E, Nagler RM. Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Oral Pathol Med* 2010;39:16-21.
25. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75
26. Matés JM, Sánchez-Jiménez S. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience.* 1999 March;4:339-45.
27. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol and Med.* 2002 Feb 1;32(3):268-77.

28. Ribeiro LM, Jacob CMA, Pastorino AC, Kim CAE, Fomin ABF, Castro APBM. Avaliação dos fatores associados a infecções recorrentes e/ou graves em pacientes com síndrome de Down. J pediatr (Rio J). 2003 Mar;79(2):141-8.
29. Saral Y, Coskun BK, Ozturk P, Karatas F, Ayar A. Assessment of salivary and serum antioxidants vitamins and lipid peroxidation in patients with recurrent aphthous ulceration. Tohoku J. Exp. Med. 2005; 206:305-312.
30. Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chem Acta. 1978;90(1):37-43
31. Siqueira Junior WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. Special Cure Dentist; 2002; 22(6):226-2302.
32. Siqueira Junior WL. Estudo de alguns parâmetros salivares em indivíduos com síndrome de Down [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
33. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. Spec Care Dentist. 2007; 27(5): 202-5.
34. Sobaniec H, Sobaniec W, Sendrowski K, Sobaniec S, Pietruska M. Antioxidant activity of blood serum and saliva in patients with periodontal disease treated due to epilepsy. Adv Med Sci. 2007;52 Suppl 1:204-6.
35. Sun C, Yan L, Wang W, Yu S, Wang X, Zhang W. Proteomic analysis of the alteration of protein expression in the placenta of Down syndrome. Chin Med J 2011;124(22):3738-3745.
36. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xantine-xantine oxidase. Anal. Biochem. 1997 Sep;251(2):206-9.
37. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xantine-xantine oxidase. Anal. Biochem. 1997 Sep;251(2):206-9.

38. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova.* 2007;30(5):1323-1338.
39. Velloso JCR, Barbosa VF, Oliveira OMMF. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *REF.* 2007;4(2):119-130.
40. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* 2010;55:70-8.
41. Yigla M, Berkovich Y, Nagler RM. Oxidative stress indices in CPOD-Broncho-alveolar lavage and salivary analysis. *Arch Oral Biol* 2007;52:36-43.
42. Zitnanová I, Korytar P, Sobotova H, Horakova L, Sustrova M, Pueschel S, et al. Markers of oxidative stress in children with Down syndrome. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):306-10.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

	 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São Dimas – CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 -
	
Comitê de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos	
São José dos Campos, 02 de março de 2011	
Ofício nº 03/11-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA
Projeto	Avaliação de antioxidante e biomarcadores de injúria oxidativa na saliva de pacientes portadores de Síndrome de Down
PARECER	
De acordo com solicitação, fica Vossa Senhoria Responsável pelo andamento do projeto acima mencionado, em substituição a Profa Dra . Maria Nadir Gasparoto Manchini,, anteriormente responsável pelo estudo, devido o seu falecimento. Convalidando dessa forma o Protocolo nº 01/2009-PH/CEP de 09/01/2009.	
Atenciosamente,	
 Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA Coordenadora	