

ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO

Estudo das Fosfatases Ácidas e Fosfatase
Alcalina na Saliva e no Soro de Crianças

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Araçatuba, para obtenção do título de “Mestre em Odontopediatria”.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

Araçatuba

2005

Folha de Aprovação

Autor: Antonio Hernandes Chaves Neto

Título: Estudos das fosfatases ácidas e fosfatase alcalina na saliva e no soro de crianças

Natureza: Dissertação (Mestrado)

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria

Data de Aprovação: 16/12/2005

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- 1.º EXAMINADOR JOSÉ MAURO GRANJEIRO (Secretário), Professor Adjunto do Departamento de Biologia Celular e Molecular, do Centro de Estudos Gerais do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Fluminense.
- 2.º EXAMINADOR CÉLIO PERCINOTO, Professor Titular do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba/UNESP.
- 3.º EXAMINADOR ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE, (Presidente), Professora Assistente Doutora do Departamento de Ciências Básicas, Disciplina de Bioquímica, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba/UNESP.

II- Membros Suplentes:

- 1.º EXAMINADOR ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM, Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba/UNESP.
- 2.º EXAMINADOR MARÍLIA AFONSO RABELO BUZALAF, Professora Associada do Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Bioquímica, da Faculdade de Odontologia de Bauru/SP.

Dados Curriculares

Nascimento: 13.07.1979 – São Jose do Rio Preto/SP

Filiação: Antonio Hernandes Campo
Nazira Chamas Hernandes

1998/2001: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – UNESP

2004/2005: Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

*A **Deus**, o seu amor e seus ensinamentos preenchem o meu coração e servem de guia para a vida. Obrigado pela minha família, meus amigos e pelos momentos de felicidade.*

*A minha amada família **Antonio, Nazira, Anna Julia e William** pelo eterno apoio, carinho, compreensão e infinito amor. A nossa união, a garra e a motivação são as minhas fontes de forças para a superação de todos os obstáculos da vida. **Pai e Mãe**, vocês são meus maiores exemplos de caráter, honestidade, integridade, humildade e responsabilidade, muito obrigado por integrar todos estes valores a minha educação. Queridos irmãos, Anna Julia e William, a nossa amizade e cumplicidade são os sentimentos mais puros da minha vida, obrigado pela constante preocupação e torcida. Amo todos vocês incondicionalmente.*

*Aos **pais e responsáveis** das crianças por autorizarem a participação das mesmas na pesquisa. Obrigado pela confiança, cooperação, compreensão e paciência.*

*As **crianças** participantes pela sua sinceridade, transparência e cooperação, sem vocês esta pesquisa não seria uma realidade.*

*A família **Hernandes e Chamas** pela contínua torcida em todas as fases da minha vida.*

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora **Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune**, pela extrema paciência, respeito, compreensão e tolerância. Minha eterna gratidão pela confiança depositada e contribuição na minha formação. O seu exemplo me mostrou que a família sempre deve ser nossa prioridade.

Mãe, pesquisadora e professora

Ao **Prof. Dr. Célio Percinoto** por me prover à oportunidade de realizar meu grande sonho de se tornar um pesquisador.

Professor, pesquisador e administrador respeitável

À **Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki** e ao **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, grandes exemplos de dedicação e responsabilidade diante da graduação, pós-graduação e pesquisa. Muito obrigado pela amizade e por compartilharem parte dos seus conhecimentos.

Pesquisadores incansáveis

Aos meus orientadores de graduação **Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia, Profa. Dra. Zuleice Viana da Silveira, Prof. Dr. Glauco, Cláudia Misue Kanno e Célia Tomiko Matida Hamata Saito** por contribuirem na minha formação como cirurgião dentista e por me ensinarem a amar a minha profissão.

Profissionais Exemplares

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do seu Diretor Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Vice-Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto, por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de graduação, pós-graduação e crescimento profissional.

Ao Governo do Estado de São Paulo, na pessoa de seu Governador Geraldo Alkimim por proporcionar a minha formação acadêmica durante a graduação e pós-graduação por meio de ensino gratuito e de indiscutível qualidade.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dr. Alberto, Prof. Dr. Célio, Prof. Dr. Robson, Profa. Dra. Rosângela, Profa. Dra. Sandra, pela orientação, confiança, incentivo, convivência e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, a chefe do departamento Profa. Dra. Rita Cássia e aos demais Profs.: Profa. Dra. Cristina, Profa. Dra. Dóris, Prof. Dr. João Carlos, Prof. Dr. João Cesar Bedran, Profa. Dra. Kikue, Profa. Dra. Sandra, Prof. Dr. Wilson e aos funcionários Lourdes, Mauro, Ângelo, André, Sandra, Janaína e Ariana, pela confiança, amizade e por me acolherem com tanto respeito, sempre dispostos a ajudar e compartilhar suas experiências.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por todos os ensinamentos ministrados e ótima convivência.

A equipe do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, em especial ao Profa. Dra. Marília e aos funcionários Thelma e Ovídio, pela contribuição no meu treinamento e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Ao médico pediatra Joaquim Fernando Rodrigues Gabriel pela atenção e dedicação durante a triagem e encaminhamento dos pacientes para as coletas.

A equipe do Laboratório Exame-Centro de Diagnóstico Médico de Araçatuba, em especial ao farmacêutico Elcio Jesus Manzano e ao técnico Robson Varlei Ranieri pela colaboração, ótima receptividade e auxílio indispensável na obtenção das amostras.

Aos alunos da graduação Glauber, Hugo e em especial a graduanda Thalyta, por juntos formamos uma equipe de trabalho. Graças à assistência mútua, cooperação e esforços dispensados conseguimos superar todas as dificuldades e contratempos inesperados. Obrigado pela amizade e por me compreenderem.

Aos amigos de laboratório Everton, Isabelle, Patrícia, Keila e Rafaela pelos momentos de descontração durante o envolvimento dos experimentos.

Aos alunos do atual Curso de Doutorado em Odontopediatria, Kélio, Ana Elisa, Daniela, Edo, Eduardo, Fátima, Sueli, Fernanda, Mariana, Rebeca, Denise, Juliano e Ana Carolina pela amizade e convívio.

Aos alunos da nova turma do Curso de Mestrado em Odontopediatria Eliana Rodrigues, Eliana Takeshita, Max, Alessandra, Janaína e Thaís, pelos momentos de descontração e cooperação.

Aos alunos da minha turma de mestrado Gracieli, Márcio, Karina, Ana Carolina e Luciana por serem, cada um a sua maneira, pessoas tão maravilhosas e distintas. Agradeço pela amizade, atenção e preocupação e por colaborarem de forma decisiva para o meu crescimento como aluno, pesquisador e odontopediatra. Vocês foram para mim mais do que amigos foram também conselheiros, professores e ótimos ouvintes. Acredito que o ser humano evolui a partir do momento que ele passa a escutar e respeitar os conceitos e a opinião do próximo.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Maria Bertolina, Maria e Mário, pela amizade e boa vontade com que sempre me auxiliaram.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Ana Cláudia, Cláudio, Isabel, Ivone, Izamar, Luzia e Maria Cláudia, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Marina e Valéria, pelo excelente profissionalismo, atenção dispensada e ótimo relacionamento.

A 44ª Turma de Graduandos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, minha querida turma, pela amizade eterna, cumplicidade e apoio.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, em especial a Célia e a Maria Shirley, pela ajuda e atenção que me dispensaram.

Aos meus amigos de república Kélio, Antônio, Ricardo, Carlos e Renan pela convivência divertida, amizade e companheirismo.

As minhas amigas de Araçatuba Ana Laura e Karina pela extrema atenção, boa vontade e infinito apoio.

Aos amigos de Macaubal, Reny, Getúlio, Elizandra, Rogério, Tatiana, Ana Paula, Claudinéia, Lenir, Gláucia, Flávia, Glaura, Luan, Daniele, Gláucia Colebrusco pela alegria, sinceridade e o companheirismo em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação e Cultura, pela concessão de Bolsa de Estudo.

Epígrafes

“O destino não é uma questão de sorte, é uma questão de escolha;
não é algo a se esperar, é algo a se conquistar”.

(William Jennings Bryan)

“Nunca se afaste dos seus sonhos, pois, se eles se forem você
continuará vivendo, porém terá deixado de existir”.

(Charles Chaplin)

Resumo

Chaves Neto AH. Estudos das fosfatases ácidas e da fosfatase alcalina no soro e na saliva de crianças. Araçatuba, 2005. 67p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

A saliva é coletada através de métodos simples e não invasivos, além de ser facilmente armazenada. A coleta não-traumática é atrativa especialmente para crianças e quando repetidas coletas são requeridas. A desvantagem da saliva como uma ferramenta de diagnóstico é a variabilidade, que ocorre em decorrência dos fatores fisiológicos e do modo de coleta. Numa primeira etapa o trabalho teve por objetivo estudar as atividades das enzimas fosfatase alcalina (FAlc), fosfatase ácida total (FAT) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) na saliva total não estimulada de crianças, investigando as influências de fatores como sexo, faixa etária e horário de coleta, bem como a correlação das enzimas com a taxa de fluxo salivar. Nesta etapa, 120 crianças saudáveis de ambos os sexos, nas faixas etárias de 1-5 e 6-12 anos de idade tiveram as amostras de saliva coletada entre 8:00-10:00 horas ou entre 14:00-16:00 horas. A segunda parte do trabalho teve por objetivo avaliar a correlação das atividades enzimáticas da FAT, TRAP, proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) e FAlc na saliva e no soro de crianças, além de analisar a influência do sexo e da faixa etária na atividade das enzimas, no soro e na saliva total. Para tanto 32 crianças de ambos os sexos, nas faixas etárias de 1-5 anos e 6-12 anos de idade tiveram as amostras de saliva e sangue coletadas entre 8:00-10:00 horas. Os resultados da primeira etapa sugerem que as atividades da FAT, TRAP e FAlc são influenciadas, de formas distintas, pelos fatores sexo, faixa etária e horário de coleta e que não existe correlação entre as atividades das enzimas e a taxa de fluxo salivar. Na segunda etapa foi observada uma correlação positiva

significativa apenas entre as atividades da TRAP no soro e na saliva de crianças do sexo masculino na faixa etária de 6-12 anos ($r = +0,76$, $p < 0,05$). A ausência de correlação entre as atividades das outras enzimas na saliva e no soro, não desconsidera a utilização da saliva como ferramenta de diagnóstico, uma vez que estudos deverão ser realizados avaliando os mesmo parâmetros na saliva e no sangue em condições de alterações da saúde local e sistêmica.

Palavras-chave: crianças, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, saliva e soro.

Abstract

Chaves Neto AH. Studies of the acid phosphatases and of the alkaline phosphatase in the serum and saliva of children. Araçatuba, 2005. 67p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Saliva can be collected by simple, non-invasive methods and is easily stored. The non-traumatic collection is specially appealing for children and when repeated collections are required. The main disadvantage of the saliva as a diagnosis tool is the variability that happens due to the physiologic factors and dependence on mode of the collection. In a first stage the work had for objective to study the activities of the enzymes alkaline phosphatase (ALP), total acid phosphatase (TAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the whole unstimulated saliva of children, investigating the influences of factors as sex, age group and time of collection, as well as the correlation of the enzymes with the salivary flow rate. In this stage, 120 healthy children of both sexes, in the age groups of 1-5 and 6-12 years of age had the saliva samples collected between 8:00-10:00 hours or between 14:00-16:00 hours. In a second stage, the work had for objective to evaluate the correlation of the enzymatic activities of TAP, TRAP, low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) and ALP in the saliva and in the children's serum, besides analyzing the influence of the sex and of the age group in the activity of the enzymes, in the serum and in the whole unstimulated saliva. For so much 32 children of both sexes, in the 1-5 year-old age groups and 6-12 years of age had the saliva samples and blood collected between 8:00-10:00 hours. The results of the first stage suggest that the activities of TAP, TRAP and ALP are influenced, in different ways, for the factors sex, age group and time of collection and that correlation

doesn't exist between the activities of the enzymes and the salivary flow rate. In the second stage a significant positive correlation was just observed among the activities of TRAP in the serum and in the male saliva of children in the 6-12 year-old age group ($r = +0.76$, $p < 0.05$). the correlation absence among the activities of the other enzymes in the saliva and in the serum, it doesn't disrespect the use of the saliva as diagnosis tool, once studies should be accomplished evaluating the same parameters in the saliva and in the blood in conditions of alterations of the local and systemic health.

Keywords: children, acid phosphatase, alkaline phosphatase, saliva and serum.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AE	Atividade Específica (UE mg ⁻¹ proteína)
PTP-BMr	proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa
FAlc	fosfatase alcalina
FAT	fosfatase ácida total
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
PTP	proteína tirosina fosfatase
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato
UE	Unidade Enzimática (nmol min ⁻¹)

Sumário

Capítulo 1	19
1.1 Introdução	20
1.2 Materiais e Métodos	22
1.2.1 Triagem dos Pacientes	22
1.2.2 Coleta de Saliva	22
1.2.3 Determinação da Taxa de Fluxo Salivar	23
1.2.4 Determinação de Proteínas	23
1.2.5 Determinação das Atividades Enzimáticas	24
1.2.6 Análise Estatística	25
1.3 Resultados	25
1.4 Discussão	27
1.5 Referências Bibliográficas	31
 Capítulo 2	 41
2.1 Introdução	42
2.2 Materiais e Métodos	44
2.2.1 Triagem dos Pacientes	44
2.2.2 Coleta de Saliva e Sangue	44
2.2.3 Determinação da Taxa de Fluxo Salivar	45
2.2.3 Determinação de Proteínas	46
2.2.4 Determinação das Atividades Enzimáticas	46
2.2.5 Análise Estatística	47
2.3 Resultados	48
2.4 Discussão	49
2.5 Referências Bibliográficas	55
 Anexos	 63

Capítulo 1

Influências do sexo, idade e horário de
coleta da saliva total de crianças nas
atividades das fosfatases alcalina, ácidas
total e resistente ao tartarato

Capítulo 1

Influências do sexo, idade e horário de coleta da saliva total de crianças nas atividades das enzimas fosfatase alcalina, fosfatases ácidas total e resistente ao tartarato

Resumo

Foram avaliadas as influências de variáveis como sexo, faixa etária e horário de coleta, nas atividades da fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e fosfatase alcalina (FAlc), na saliva total não estimulada de crianças e averiguar correlações entre as atividades enzimáticas e a taxa de fluxo salivar. Foram coletadas amostras de saliva total de cento e vinte crianças saudáveis de ambos os sexos, com idades entre 1-5 e 6-12 anos, nos horários entre 8:00-10:00 ou 14:00-16:00 horas. As crianças do sexo feminino (6-12 anos) apresentaram taxa de fluxo salivar reduzida e maior atividade de TRAP e FAlc, comparadas ao sexo masculino na mesma faixa etária. Entre 8:00-10:00 horas as atividades da FAT e da FAlc para o grupo do sexo masculino (1-5 anos) foram mais elevadas em comparação às obtidas entre 14:00-16:00 horas ($p < 0,05$, teste- t). A FAlc nos grupos do sexo feminino (6-12 anos) foi mais elevada no horário das 14:00-16:00 horas ($p < 0,05$, teste- t). A TRAP apresentou aumento significativo da atividade com o aumento da faixa etária em crianças do sexo feminino, em amostras obtidas entre 14:00-16:00 horas ($p < 0,05$, teste- t). Não foi observada correlação entre o fluxo salivar e as atividades das enzimas ($p > 0,05$, teste de Pearson). As atividades das enzimas FAT, TRAP e FAlc são influenciadas de maneiras diversas pelo sexo do indivíduo, idade e horário de coleta da saliva. A influência dos fatores estudados deverá ser levada em consideração em estudos que visem utilizar a saliva como material biológico para diagnóstico laboratorial.

Palavras-chaves: atividade enzimática, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, fosfatase ácida resistente ao tartarato e saliva.

1.1 INTRODUÇÃO

A análise da composição da saliva pode ser utilizada como uma ferramenta para o diagnóstico e o monitoramento do tratamento de pacientes com várias doenças sistêmicas que afetam a função das glândulas salivares e a composição da saliva, tais como a Síndrome de Sjögren, cirrose alcoólica, fibrose cística, sarcoidose, diabetes mellitus e doenças das glândulas adrenais (1,2).

Além de ser facilmente armazenada a saliva é coletada através de métodos simples e não invasivos. A coleta não-traumática é atrativa especialmente para crianças e quando repetidas coletas são requeridas. A principal desvantagem da saliva como uma ferramenta de diagnóstico é a variabilidade, que ocorre em função do modo de coleta (3).

Têm sido publicados estudos sobre as atividades da fosfatase ácida (FA) e da fosfatase alcalina (FAlc) na saliva, correlacionando os níveis de atividade à presença de cálculo dental e contagem de *Lactobacillus* (4) ou à incidência de cárie dental (5,6).

As atividades dessas enzimas foram avaliadas na saliva de indivíduos saudáveis (7,8) e também de crianças com alterações como diabetes (9), leucodistrofia metacromática (10), fibrose cística (11), ou em pacientes adultos com câncer de próstata (12).

As fosfatases alcalinas humanas constituem múltiplas formas moleculares de enzimas que podem ser encontradas no soro e que são produzidas por muitos tecidos como ossos, fígado, intestinos e placenta. A concentração da fosfatase alcalina intestinal no soro aumenta em diversas desordens do trato digestivo e na cirrose (13). A atividade da fosfatase alcalina de origem óssea é maior na fase de crescimento, assim como a da fosfatase alcalina total (13).

A fosfatase alcalina óssea pode ser utilizada como uma ferramenta mais sensível do que a fosfatase alcalina total para acompanhar os processos de mineralização, já que um

pequeno aumento dessa fração é facilmente detectado e sinaliza a existência de possíveis patologias (14).

Não existem na literatura trabalhos que analisem a atividade da fração da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) na saliva total não-estimulada de crianças saudáveis, levando-se em consideração a influência do horário de coleta e faixa etária.

A TRAP, que difere das outras isoformas da fosfatase ácida humana por ser insensível ao tartarato e ao *p*-hidroximercuriobenzoato (*p*-HMB) (15), é expressa de forma mais significativa nos osteoclastos (16), sendo secretada durante a reabsorção óssea, o que torna esta enzima um marcador do processo (17).

É bem sabido que a taxa de fluxo e a composição da saliva variam num período de 24 horas. Um ritmo cicardiano tem sido descrito para a taxa de fluxo da saliva total não estimulada (18). As taxas de fluxo salivar no início da manhã são reduzidas, se comparadas as do final da tarde (19). Verificando-se a variação do fluxo de saliva não estimulada durante o período da manhã observa-se ao final do período, um incremento entre 25-50% (19, 20). Ferguson & Botchway (21) demonstraram que a composição da saliva total estimulada coletada no período da tarde é menos variável do que a de outros períodos.

Determinações da taxa de fluxo salivar são importantes para o diagnóstico de algumas doenças orais e sistêmicas, porém diversos fatores que podem induzir variações devem ser controlados. Dentre estes fatores estão o horário da coleta (22) e o jejum (23).

As concentrações de alguns componentes da saliva total não estimulada variam em função da idade, indicando a necessidade de controles padrões de idade para o uso clínico da saliva (23). A atividade da amilase salivar aumenta com a idade (23, 24), estando o aumento relacionado com o processo de desenvolvimento e maturação das glândulas salivares.

O propósito deste trabalho foi determinar as atividades de FAT, TRAP e FAlc na saliva total não estimulada de crianças com o objetivo de verificar as influências do sexo,

faixa etária e do horário de coleta. Analisar ainda a correlação entre a taxa de fluxo da saliva total não estimulada e as atividades das enzimas.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Triagem dos Pacientes

Cento e vinte crianças dos sexos masculino e feminino, nas faixas etárias de 1 a 5 e 6 a 12 anos foram selecionados, a partir dos pacientes registrados no programa de cuidados odontológicos da Bebê Clínica e da Clínica de Odontopediatria, do Curso de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Araçatuba.

Participaram do estudo crianças que não apresentavam doença infecciosa aguda, doença cardíaca, renal, respiratória ou falência hepática e que não haviam recebido radiação terapêutica na região da cabeça ou pescoço. As crianças que apresentaram problemas periodontais ou processos cariosos generalizado ou rampante foram excluídas do estudo.

Crianças que relutaram em colaborar com a coleta, mostraram-se tensas ou choraram durante o procedimento, foram excluídas do trabalho.

As crianças foram distribuídas em 8 grupos de 15 crianças, levando-se em conta os horários de coleta, o sexo e a idade.

O Protocolo de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Araçatuba (Referência Processo FOA 2003/558).

1.2.2 Coleta de Saliva

A saliva total não estimulada foi coletada entre 8:00 e 10:00 horas ou entre 14:00 e 16:00 horas. No dia da coleta a higiene oral das crianças foi realizada apenas com água, escova e fio dental, sem a utilização de produtos fluoretados. As crianças estavam em jejum de duas horas.

O fluido salivar presente no assoalho bucal foi aspirado através de um cateter de plástico macio evitando-se, através de manobras bem suaves, qualquer tipo de contato e estímulo da secreção salivar. O cateter empregado para a coleta estava conectado a um frasco de vidro estéril e lacrado, que também estava conectado a uma bomba de vácuo.

Os frascos de coleta foram mantidos em gelo durante os 10 minutos do procedimento e também durante o transporte até o Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, onde as amostras foram centrifugadas a $5.500 \times g$ por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (4°C). Os sobrenadantes foram fracionados e armazenados a -20°C , para análises posteriores.

1.2.3 Determinação da Taxa de Fluxo salivar

Considerando o valor de 1,0 para a densidade da saliva total (22), a taxa de fluxo salivar (mL min^{-1}) foi calculada através da diferença entre o peso do frasco antes e após a coleta (correspondente ao volume total de saliva não centrifugada), dividido pelo tempo de coleta que foi no máximo de 10 minutos.

1.2.4 Determinação de Proteínas

As concentrações de proteína total na saliva foram determinadas pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (25). As leituras das absorbâncias foram realizadas através de um espectrofotômetro Hitachi U-1100, no comprimento de onda 660 nm. Albumina de soro foi utilizada como padrão, nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,8; 1 e 2 mg mL^{-1} .

1.2.5 Determinação das Atividades Enzimáticas

A atividade específica (AE) da FAT foi determinada como descrito por Granjeiro et al. (26). Para um volume final de 1500 μL a reação foi iniciada pela adição de 100 μL da saliva a um volume de 900 μL do meio de reação, contendo 100 mmol L^{-1} de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5 mmol L^{-1} do substrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP). Utilizando-se o meio de reação acrescido dos inibidores *p*-hidroximercuriobenzoato (*p*-HMB) na concentração de 1 mmol L^{-1} e tartarato de sódio, 10 mmol L^{-1} , foi realizada a determinação da TRAP. A reação foi paralisada pela adição de 500 μL de NaOH 1,0 mol L^{-1} após incubação a 37°C por 60 minutos. Foram feitos tubos controle para todas as amostras, a fim de eliminar possíveis interferências causadas por outros componentes da saliva nos valores de absorbância. As absorbâncias foram determinadas em 405 nm, utilizando um espectrofotômetro Hitachi U-1100. Como coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol foi utilizado o valor de 18000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

A FAlc foi determinada utilizando o kit comercial da Labtest[®], com metodologia baseada nos trabalhos de Roy (27). O substrato utilizado foi a timolftaleína monofosfato na concentração de 22 mmol L^{-1} , no pH 10,1. O volume de saliva utilizado foi de 100 μL . A incubação foi realizada na temperatura de 37°C por um período de 10 minutos. A medida da absorção foi realizada a 580 nm. Foram feitos tubos controle para todas as amostras.

Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol L^{-1} de produto de reação em 1 minuto. A atividade enzimática (AE) foi expressa como Unidade de Atividade Enzimática (UE) por 1 mg de proteína.

1.2.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos apresentaram uma distribuição Gausiana quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). O teste-*t de Student* não-pareado foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os sexos com relação às médias das taxas de fluxo salivar e dos valores das AE da FAT, TRAP, e FAlc para cada faixa etária. As correlações entre as atividades enzimáticas e o fluxo salivar foram analisadas através do teste de Pearson. Significância estatística foi assumida quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism Versão 3.00.

1.3 RESULTADOS

A tabela 1 demonstra as taxas de fluxo (mL min^{-1}) da saliva total não-estimulada de crianças saudáveis, em função das faixas etárias (de 1-5 anos e de 6-12 anos), sexo (M – masculino, F - feminino) e horário da coleta (8:00-10:00 horas e 14:00-16:00 horas). Comparando-se as taxas de fluxo salivar obtidas em diferentes horários, de crianças do mesmo sexo e na mesma faixa etária, constatou-se não haver diferença estatisticamente significativas entre os grupos (teste-*t*). Também não foram observadas diferenças significativas quando comparadas às taxas de fluxo salivares obtidas num mesmo horário, de crianças do mesmo sexo, porém em faixas etárias diferentes.

As diferenças nas médias das taxa de fluxo da saliva total não estimulada baseadas no sexo das crianças são apresentadas na Figura 1. A média da taxa de fluxo da saliva total não estimulada coleta entre 14:00 e 16:00 horas foi significativamente menor nas crianças do sexo feminino ($p < 0,05$) em relação às crianças do sexo masculino, na idade de 6-12 anos.

As atividades enzimáticas específicas (AEs) das enzimas FAT, TRAP e FAlc foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média, tendo sido utilizado o teste-t para avaliar as diferenças.

A atividade da FAT foi significativamente maior nas salivas obtidas entre 8:00 e 10:00 horas, na faixa etária de 1-5 anos, independente do sexo. Quando comparadas as AE da FAT em crianças do mesmo sexo, porém de faixas etárias diferentes, não foram observadas diferenças significativas nos diferentes horários de coleta (Tab. 2). Não houve diferenças significativas entre as AEs da FAT quando comparados os sexos masculino e feminino, dentro de cada faixa etária, no mesmo horário de coleta (Figura 2).

Quando comparadas as AEs da TRAP entre os grupos de uma mesma faixa etária, do mesmo sexo, porém em diferentes horários de coleta, não houve diferença significativa (Tab 3). Os valores de TRAP foram significativamente diferentes entre as faixas etárias de 1-5 e 6-12 anos apenas para as amostras obtidas de meninas, entre 14:00 e 16:00 horas, sendo a TRAP do grupo 6-12 a de valor mais elevado, se comparada aos outros grupos (Tab. 3). A média da AE da TRAP entre 14:00 e 16:00 horas foi significativamente maior nas crianças do sexo feminino ($p < 0,05$) em relação às crianças do sexo masculino, na idade de 6-12 anos (Fig. 3).

Com relação a FAlc foram verificadas diferenças estatisticamente significativas apenas quando comparadas as atividades enzimáticas dos dois períodos de coleta, em crianças do sexo masculino, nas duas faixas etárias, tendo sido verificados valores inferiores entre 14:00 e 16:00 horas (Tab. 4). A atividade da FAlc foi mais elevada na saliva de crianças do sexo feminino com relação ao sexo masculino (Fig. 4), no horário entre 14:00 e 16:00 horas, na faixa etária de 6-12 anos ($p < 0,05$).

Não foram observadas correlações entre as taxas de fluxo salivar e as atividades específicas das enzimas FAT, TRAP e FAlc ($p>0,05$), quando aplicado o teste de Pearson (Tab. 5).

1.4 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos fatores sexo, faixa etária e horário da coleta, nas atividades das enzimas FAT, TRAP, e FAlc na saliva total não estimulada de crianças saudáveis.

A realização da higiene bucal sem o uso de dentifrício fluoretado foi exigida, para evitar a inibição da fração osteoclástica da TRAP pelo fluoreto (28) e possíveis interferências de fosfatases provenientes da placa bacteriana, leucócitos e células epiteliais (7). Para coibir a interferência da escovação na concentração de proteínas salivares, relatada por Hoek et al. (29), as amostras foram obtidas no mínimo duas horas após a higiene oral das crianças. Para minimizar variações no fluxo salivar em função do estado alimentar, as coletas foram realizadas em crianças em jejum de 2 horas.

Para minimizar um possível estímulo na secreção salivar induzido pela presença do cateter na cavidade oral, as condições de coleta foram padronizadas.

Bretz et al. (30) verificaram em crianças com dentição mista taxa mais elevada de fluxo salivar, podendo a variação refletir alterações provenientes do crescimento e maturação das glândulas salivares. O presente trabalho avaliou as taxas de fluxo salivar em crianças na faixa etária de 1-5 anos (dentição decídua) e na faixa etária de 6-12 anos (dentição mista), não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Os valores na taxa de secreção da saliva total não estimulada das crianças em nosso estudo diferiram dos descritos na literatura. Andersson et al. (31) encontraram para crianças

de ambos os sexos, com 10 e 13 anos, taxas de fluxo de $0,39 \pm 0,21 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,39 \pm 0,22 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente. Watanabe et al. (32) relataram valores de $0,24 \pm 0,13 \text{ mL min}^{-1}$ para crianças de 5 anos, enquanto Negoro et al. (33) encontraram valores de $0,68 \text{ mL min}^{-1}$. Rotteveel et al. (34) avaliando a taxa de fluxo da saliva total não estimulada em crianças com idade entre 6 e 11 anos, obtiveram valores entre $0,55$ e $0,78 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente, não havendo diferenças significativas relacionadas às idades.

Os valores da taxa de fluxo salivar obtidos neste trabalho variaram entre $0,36$ a $0,42 \text{ mL min}^{-1}$ para a faixa etária de 1-5 anos e entre $0,40$ a $0,44 \text{ mL min}^{-1}$ para a faixa de 6 a 12 anos, não havendo diferenças estatísticas significativas quando comparadas as diferentes faixas etárias e os horários de coleta. Embora estes valores estejam diferindo dos descritos na literatura, sabe-se que vários fatores induzem a diferenças nas taxas de fluxo salivar, desde variações sazonais (30), metodologia utilizada para a coleta da saliva (35), horário da coleta (19), estado alimentar (36) e atividade física (37).

Não está bem estabelecida a existência de influências do sexo do indivíduo na taxa de fluxo da saliva não estimulada. Enquanto alguns autores relatam a ausência de efeitos (38), outros têm relatado taxas inferiores no sexo feminino (34, 39, 40). No presente estudo, foi observada uma menor taxa de fluxo da saliva total não estimulada em crianças do sexo feminino, na faixa etária de 6-12 anos e horário de coleta entre 14:00 e 16:00 horas ($p < 0,05$).

Alguns autores têm demonstrado variações no fluxo salivar ao longo do dia. Nederfors & Dahlof (19) verificaram em seus estudos, que a taxa de fluxo da saliva total não estimulada é menor no início da manhã, mostrando-se mais elevada no final da tarde, e ainda que no decorrer da manhã, podem ser observadas elevações entre 25 a 50% na taxa de fluxo. Comparando-se as taxas de fluxo salivar em crianças do mesmo sexo, na mesma faixa etária, não foram verificadas diferenças entre os horários de coleta, no presente trabalho.

Os efeitos das variações do fluxo salivar na concentração de componentes salivares, dentre os quais proteínas, foram eliminados através da expressão das atividades das enzimas como atividade específica (AE), que representa unidade enzimática (UE) por miligrama de proteína na saliva.

Benedek-Spat (7) demonstrou haver elevada atividade de fosfatase ácida total na saliva coletada entre 8:00 e 9:00 horas, de indivíduos de ambos os sexos, com idade variando entre 19 e 23 anos. Entretanto, quando examinada a saliva das glândulas parótidas, nas mesmas condições, foram encontrados valores reduzidos. Estas discrepâncias podem ser explicadas pela liberação de fosfatases pelas bactérias, leucócitos e células epiteliais presentes na cavidade bucal. Neste trabalho para reduzir os fatores de interferência, além da escovação obrigatória 2 horas antes da coleta, foi realizada a centrifugação da saliva a 5.500 g, durante 20 minutos em centrífuga refrigerada.

Nagler et al. (41) determinaram alta atividade da FAlc na saliva total em comparação com a saliva da submandibular/sublingual, mas não conseguiram detectar a atividade da enzima na saliva da parótida. Cornish & Posen (8) verificaram aumentos nas atividades da FAlc na saliva total e nas salivas das glândulas parótidas e submandibulares após a realização de diálise. Este fato tem sido associado à presença de altas concentrações de fosfato inorgânico, um inibidor da FAlc, na saliva (42).

A influência do horário de coleta na atividade das enzimas foi investigada neste estudo. Em meninos e meninas, com idade entre 1 e 5 anos, a atividade da FAT foi significativamente maior no período da manhã. Variação semelhante foi verificada para a atividade da FAlc, nas duas faixas etárias, porém apenas no sexo masculino.

Na literatura não existem trabalhos comparando as atividades das fosfatases ácida e alcalina com o horário de coleta. Ferguson e Fort (43), analisando as variações circadianas de alguns componentes da saliva da submandibular em condições de repouso, concluíram que

devido ao alto grau de variação no decorrer do dia, que o horário de coleta da amostra não deve ser ignorado. Entre 8:00 e 10:00 horas tem-se observado a variação máxima da maioria dos constituintes da saliva. Sendo assim as coletas devem ser realizadas entre 14:00 e 16:00 horas, em função das menores variações (43).

Também não estão disponíveis na literatura estudos verificando possíveis variações nas atividades das enzimas FAT, TRAP e FAlc na saliva de crianças, em função da idade. Sabe-se que componentes como sódio, proteína total, IgA e amilase na saliva total não estimulada, apresentam correlação linear ascendente com a idade (24). Estas mudanças indicam geralmente um processo de crescimento e desenvolvimento das glândulas salivares, como parte do desenvolvimento dos sistemas corporais (24). No presente trabalho apenas nas crianças do sexo feminino foi verificado um aumento significativo na atividade da TRAP, em função da idade.

Os dados obtidos de atividade enzimática da FAT, TRAP e FAlc na saliva total não estimulada de crianças foram correlacionados com a taxa de fluxo salivar, porém não se observou nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a taxa de fluxo salivar e a atividade da FAT. Shannon & Feller (44) correlacionaram as taxas de fluxo às médias das concentrações da FAT de 50 indivíduos, dos quais foram coletadas amostras de saliva de parótidas antes e após estímulo. Uma correlação significativa negativa foi encontrada entre a taxa de fluxo da saliva estimulada da parótida e a concentração da fosfatase ácida total.

Dawes (37) discutindo o diagnóstico laboratorial baseado na saliva relatou a necessidade de se fazer a distinção entre diagnóstico de uma doença, existência de suscetibilidade à doença, a identificação de componentes salivares normais em uma concentração anormal e a identificação de componentes anormais. A composição da saliva é influenciada por um amplo número de variáveis fisiológicas normais, o que justifica o estudo das enzimas estudadas com relação à faixa etária, sexo e horário de coleta.

A análise dos componentes salivares pode ser utilizada como ferramenta para o reconhecimento de sinais orais de doenças sistêmicas e locais, exposição a fatores de risco e monitoramento de tratamento. Para o uso eficiente e seguro da saliva como material para avaliações clínicas e laboratoriais, é necessário um amplo entendimento da composição salivar em condições fisiológicas e patológicas.

As atividades das enzimas FAT, TRAP e FAlc são influenciadas de maneiras diversas pelo sexo do indivíduo, idade e horário de coleta da saliva, porém não há correlação com a taxa de fluxo salivar. A influência destes fatores deverá ser levada em consideração em estudos que visem utilizar a saliva como material biológico para diagnóstico laboratorial.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:197-212.
- 2- Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. J Can Dent Assoc 2002 ;68:170-4.
- 3- Ben-Aryeh H, Lapid S, Szargel R, Benderly A, Gutman D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. Arch Oral Biol 1984;29:357-62.
- 4- Helman Ez, Mitchell Df. Lactobacilli and dental caries in the hamster. J Dent Res 1953;32:596-600.
- 5- Saito S, Kizu K. Phosphatase activity in whole and parotid saliva and its relationship to dental caries. J Dent Res 1959 ;38:500-5.
- 6- Pandey RK, Tripathi A, Chandra S, Pandey A. Relation of salivary phosphorus and alkaline phosphatase to the incidence of dental caries in children. J Pedod 1990;14:144-6.

- 7- Benedek-Spat E. The composition of unstimulated human parotid saliva. Arch Oral Biol 1973; 18:39-47.
- 8- Cornish CJ, Posen S. Human salivary alkaline phosphatase. Clin Chim Acta 1968; 20:387-91.
- 9- Lopez ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. Braz Dent J 2003;14:26-31.
- 10- Den Tandt WR, Jaeken J. Determination of lysosomal enzymes in saliva. Confirmation of the diagnosis of metachromatic leukodystrophy and fucosidosis by enzyme analysis. Clin Chim Acta 1979;97:19-25.
- 11- Oglesbee LH, Seale TW, Mayes JS, Flux M, Young SK, Renner OM. Plasma and submandibular saliva lysosomal enzymes in cystic fibrosis. Clin Chim Acta 1984;143:135-45.
- 12- Shannon IL, Feller RP, Beach PD. Parotid saliva acid phosphatase in health and disease. Aust Dent J 1976;21:138-42.
- 13- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. Clin Chem 1982 ;28:2007-16.
- 14- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. Acta Orthop Scand Suppl 1995;266:176-82.
- 15- Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FS, Baylink DJ. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. Clin Chem 1987; 33:458-62.
- 16- Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. Am J Anat 1991;191:228-36.

- 17- Chambers TJ, Fuller K, Darby JA. Hormonal regulation of acid phosphatase release by osteoclasts disaggregated from neonatal rat bone. *J Cell Physiol* 1987;132:90-6.
- 18- Dawes C, Ong BY. Circadian rhythms in the concentrations of protein and the main electrolytes in human unstimulated parotid saliva. *Arch Oral Biol* 1973 ;18:1233-42.
- 19- Nederfors T, Dahlof C. Effects of the beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 1992;37:579-84.
- 20- Rantonen PJ, Meurman JH. Viscosity of whole saliva. *Acta Odontol Scand* 1998;56:210-4.
- 21- Ferguson DB, Botchway CA. A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Arch Oral Biol* 1980;25:559-68.
- 22- Flink H, Tegelberg A, Lagerlof F. Influence of the time of measurement of unstimulated human whole saliva on the diagnosis of hyposalivation. *Arch Oral Biol* 2005;50:553-9.
- 23- Nederfors T, Holmstrom G, Paulsson G, Sahlberg D. The relation between xerostomia and hyposalivation in subjects with rheumatoid arthritis or fibromyalgia. *Swed Dent J* 2002;26:1-7.
- 24- Ben-Aryeh H, Fisher M, Szargel R, Laufer D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Arch Oral Biol* 1990;35:929-31.
- 25- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422-7.
- 26- Granjeiro JM, Ferreira CV, Juca MB, Taga EM, Aoyama H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. *Biochem Mol Biol Int* 1997;41:1201-8.

- 27- Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. Clin Chem 1970;16:431-6.
- 28- Hayman AR, Cox TM. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. J Biol Chem 1994;269:1294-300.
- 29- Hoek GH, Brand HS, Veerman EC, Amerongen AV. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. Eur J Oral Sci 2002;110:480-1.
- 30- Bretz WA, do Valle EV, Jacobson JJ, Marchi F, Mendes S, Nor JE, Cancado MF, Schneider LG. Unstimulated salivary flow rates of young children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:541-5.
- 31- Andersson R, Arvidsson E, Crossner CG, Holm AK, Mansson B. The flow rate, pH and buffer effect of mixed saliva in children. J Int Assoc Dent Child 1974;5:5-12.
- 32- Watanabe S, Kawano E, Saito E, Ueda M, Nishihira M, Igarashi S. The study on salivary clearance in children. 3. The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. Shoni Shikagaku Zasshi 1990;28:391-6.
- 33- Negoro M, Nakagaki H, Tsuboi S, Adachi K, Hanaki M, Tanaka D, Takami Y, Nakano T, Kuwahara M, Thuy TT. Oral glucose retention, saliva viscosity and flow rate in 5-year-old children. Arch Oral Biol 2000 ;45:1005-11.
- 34- Rotteveel LJ, Jongerius PH, van Limbeek J, van den Hoogen FJ. Salivation in healthy schoolchildren. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2004;68:767-74.
- 35- Wolff A, Begleiter A, Moskona D. A novel system of human submandibular/sublingual saliva collection. J Dent Res 1997 Nov;76:1782-6.
- 36- Mandel ID. Salivary diagnosis: promises, promises. Ann N Y Acad Sci 1993 20;694:1-10.

- 37- Dawes C. Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993 20;694:265-9.
- 38- Heft MW, Baum BJ. Unstimulated and stimulated parotid salivary flow rate in individuals of different ages. *J Dent Res* 1984;63:1182-5.
- 39- Heintze U, Birkhed D, Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983;7:227-38.
- 40- Crossner CG. Salivary flow rate in children and adolescents. *Swed Dent J* 1984;8:271-6.
- 41- Nagler RM, HersHKovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med* 2002;50:214-25.
- 42- Posen S, Clubb Js, Neale Fc, Hotchkis D. The measurement of plasma volume by enzyme dilution. *J Lab Clin Med* 1965;65:530-8.
- 43- Ferguson DB, Fort A. Circadian variations in human resting submandibular saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 1974 ;19:47-55.
- 44- Shannon IL, Feller RP, Beach PD. Parotid saliva acid phosphatase in health and disease. *Aust Dent J* 1976;21:138-42.

Tabela 1. Taxa de fluxo da saliva total não estimulada de crianças saudáveis, em diferentes faixas etárias e horários de coleta

Faixas etárias (idade em anos)	Sexo Masculino		p	Sexo Feminino		p (teste- <i>t</i>)
	(n)		(teste- <i>t</i>)	(n)		
	8:00-10:00 h	14:00-16:00 h		8:00-10:00 h	14:00-16:00 h	
1-5	0,40 ± 0,052 (15)	0,42 ± 0,046 (15)	0,806	0,37 ± 0,037 (15)	0,36 ± 0,037 (15)	0,812
6-12	0,44 ± 0,050 (15)	0,44 ± 0,041 (15)	0,956	0,32 ± 0,035 (15)	0,30 ± 0,032 (15)	0,711
p (teste- <i>t</i>)	0,613	0,704		0,292	0,228	

Fluxo salivar mL min⁻¹.

Valores expressos em Média ± EPM (teste-t, p<0,05).

Tabela 2. Atividade enzimática específica (AE) da FAT na saliva total não estimulada de crianças saudáveis, em diferentes faixas etárias e horários de coleta

Faixas etárias (idade em anos)	Sexo Masculino		p	Sexo Feminino		p
	(n)		(teste-t)	(n)		(teste-t)
	8:00-10:00 h	14:00-16:00 h		8:00-10:00 h	14:00-16:00 h	
1-5	18,96 ± 2,191 (15)	12,23 ± 2,237 (15)	0,045*	17,57 ± 1,25 (15)	12,69 ± 1,95 (15)	0,038*
6-12	14,77 ± 1,54 (15)	12,49 ± 1,05 (15)	0,221	16,56 ± 2,41 (15)	14,16 ± 1,077 (15)	0,362
p (teste-t)	0,119	0,911		0,706	0,495	

AE = UE mg⁻¹ proteína. UE = nmol min⁻¹.

Valores expressos em Média ± EPM (teste-t, p<0,05).

Tabela 3. Atividade enzimática específica (AE) da TRAP na saliva total não estimulada de crianças saudáveis, em diferentes faixas etárias e horários de coleta

Faixas etárias (idade em anos)	Sexo Masculino		p	Sexo Feminino		p (teste-t)
	(n)		(teste-t)	(n)		
	8:00-10:00 h	14:00-16:00 h		8:00-10:00 h	14:00-16:00 h	
1-5	1,50 ± 0,321 (15)	1,32 ± 0,212 (15)	0,642	1,73 ± 0,245 (15)	1,32 ± 0,150 (15)	0,182
6-12	1,61 ± 0,208 (15)	1,42 ± 0,144 (15)	0,448	1,77 ± 0,268 (15)	1,97 ± 0,213 (15)	0,557
p (teste-t)	0,763	0,687		0,929	0,024*	

AE = UE mg⁻¹ proteína. UE = nmol min⁻¹.

Valores expressos em Média ± EPM. (teste-t, p<0,05).

Tabela 4. Atividade enzimática específica (AE) da FAlc na saliva total não estimulada de crianças saudáveis, em diferentes faixas etárias e horários de coleta

Faixas etárias (idade em anos)	Sexo Masculino		p	Sexo Feminino		p (teste-t)
	(n)		(teste-t)	(n)		
	8:00-11:00 h	14:00-16:00 h		8:00-10:00 h	14:00-16:00 h	
1-5	5,30 ± 0,531 (15)	3,61 ± 0,431 (15)	0,019*	6,20 ± 0,971 (15)	3,77 ± 0,671 (15)	0,058
6-12	4,78 ± 0,660 (15)	3,22 ± 0,357 (15)	0,039*	4,80 ± 0,557 (15)	5,27 ± 0,753 (15)	0,620
p (teste-t)	0,556	0,478		0,226	0,156	

AE = UE mg⁻¹ proteína. UE = nmol min⁻¹.

Valores expressos em Média ± EPM. (teste-t, p<0,05).

Tabela 5. Correlações entre a taxa de fluxo da saliva total não estimulada e as atividades enzimáticas específicas das enzimas FAT, TRAP e FAlc

	Grupos	n	Fluxo Salivar (mL min ⁻¹)	Enzimas		
				FAT	TRAP	FAlc
8:00-10:00 h	M 1-5	15	0,40 ± 0,05	r = -0,211 (NS)	r = +0,050 (NS)	r = -0,188 (NS)
	M 6-12	15	0,44 ± 0,05	r = -0,106 (NS)	r = -0,268 (NS)	r = -0,117 (NS)
	F 1-5	15	0,37 ± 0,04	r = -0,281 (NS)	r = -0,471 (NS)	r = +0,257 (NS)
	F 6-12	15	0,32 ± 0,04	r = +0,331 (NS)	r = +0,276 (NS)	r = -0,013 (NS)
14:00-16:00 h	M 1-5	15	0,42 ± 0,04	r = +0,081 (NS)	r = -0,263 (NS)	r = +0,061 (NS)
	M 6-12	15	0,44 ± 0,04	r = -0,147 (NS)	r = -0,004 (NS)	r = -0,088 (NS)
	F 1-5	15	0,36 ± 0,04	r = -0,108 (NS)	r = -0,322 (NS)	r = -0,072 (NS)
	F 6-12	15	0,30 ± 0,03	r = +0,045 (NS)	r = -0,194 (NS)	r = -0,048 (NS)

Valores expressos em média ± EPM. Teste de correlação de Pearson (p>0,05- NS).

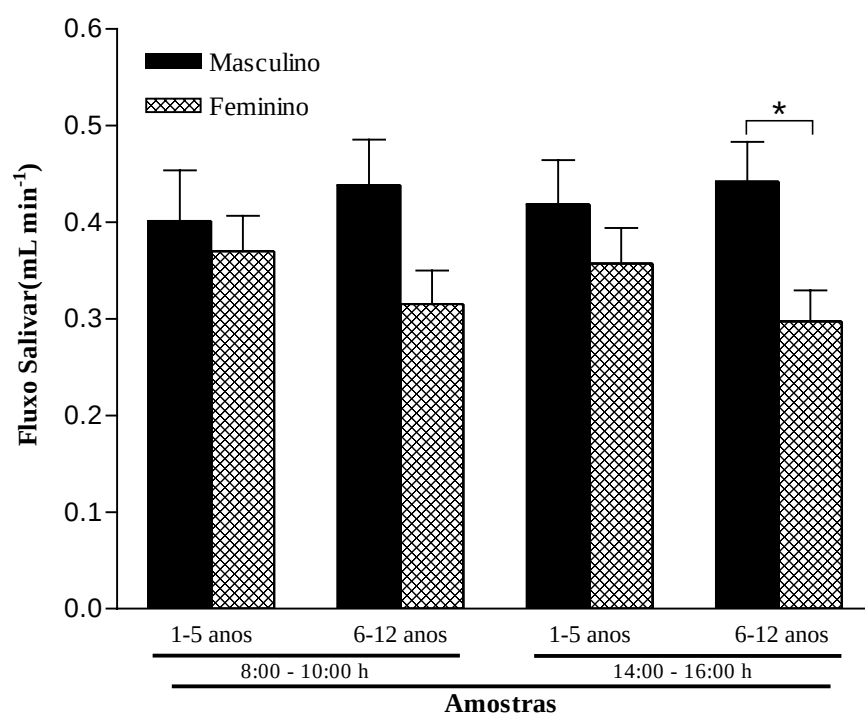


Figura 1. Taxa de fluxo da saliva total não estimulada de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias e horários de coleta, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

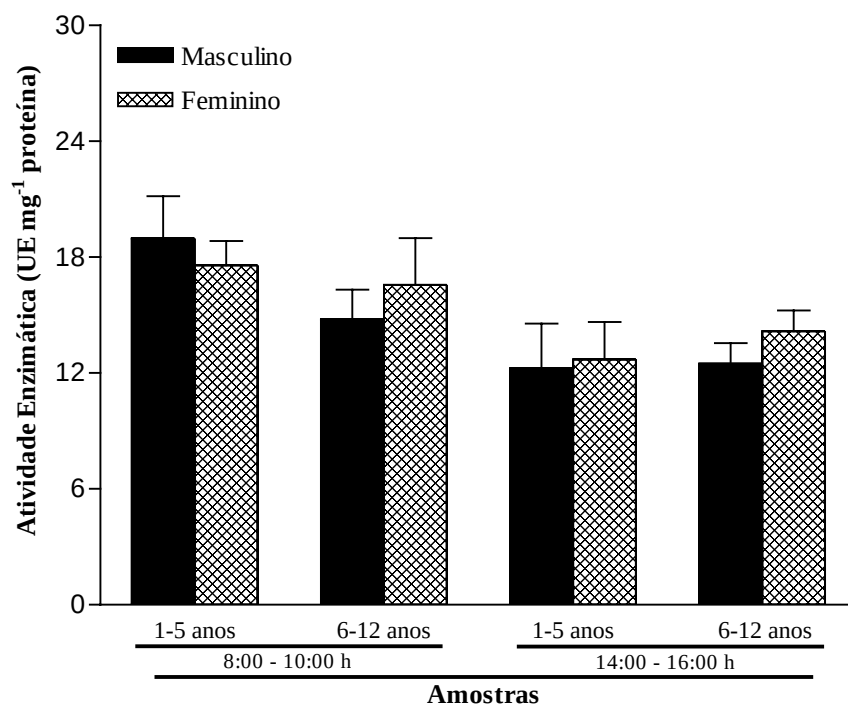


Figura 2. Atividade enzimática específica da FAT na saliva total não estimulada de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias e horários de coleta, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

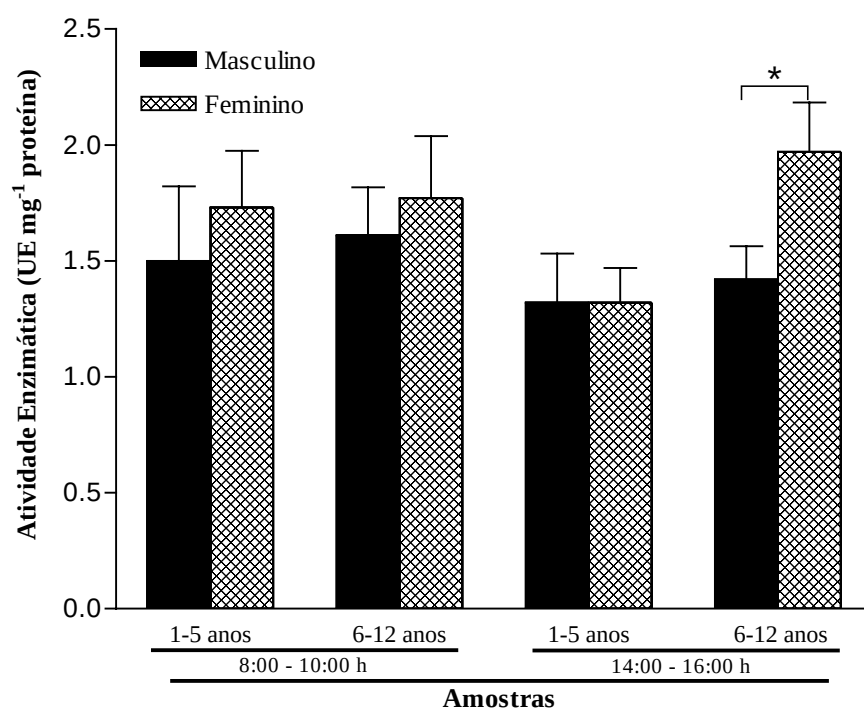


Figura 3. Atividade enzimática específica da TRAP na saliva total não estimulada de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias e horários de coleta, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

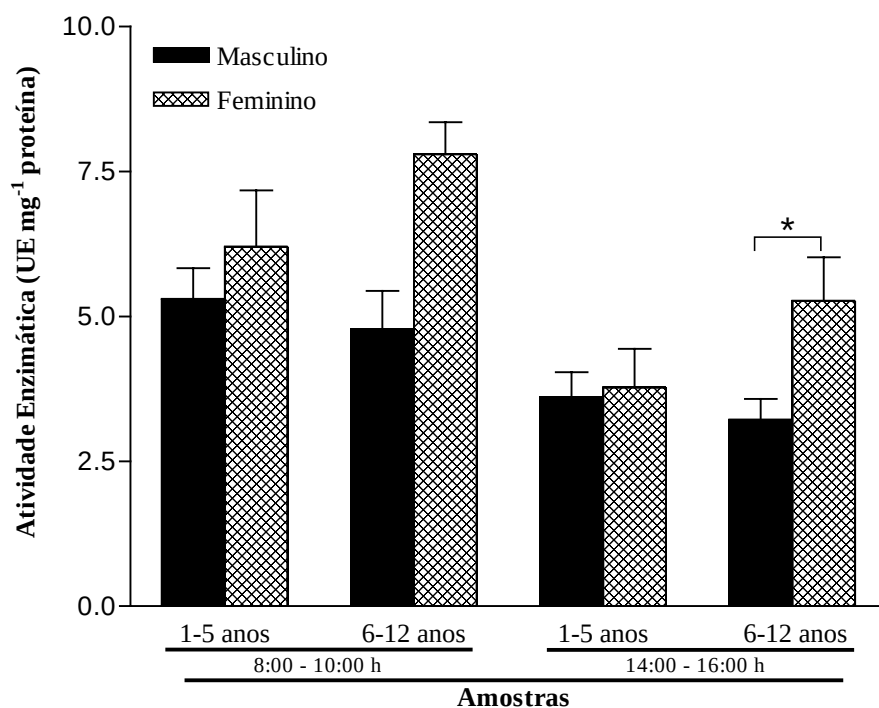


Figura 4. Atividade enzimática específica da FALc na saliva total não estimulada de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias e horários de coleta através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

Capítulo 2

Fosfatase alcalina e isoenzimas da
fosfatase ácida: influências do sexo, idade
e estudo de correlação entre saliva e
sangue

Capítulo 2

Fosfatase alcalina e isoenzimas da fosfatase ácida: influências do sexo, idade e estudo de correlação entre saliva e sangue

Resumo

O propósito deste estudo foi investigar a correlação entre as atividades enzimáticas da fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) e fosfatase alcalina (FAlc) na saliva total não estimulada e no soro de crianças. Analisar também a influência do sexo e da faixa etária nas atividades das enzimas citadas. Foram coletadas amostras de saliva e soro de 32 crianças (16 de cada sexo) nas faixas etárias de 1-5 e 6-12 anos de idade tiveram amostras de saliva e sangue coletadas, entre 8:00-10:00 horas. Todas as crianças eram saudáveis e possuíam boas condições de saúde bucal. As atividades de todas as enzimas foram maiores na saliva do que no soro. Correlação significativa positiva foi observada para a atividade da TRAP, entre as amostras de soro e saliva apenas no grupo do sexo masculino, com idade entre 6-12 anos ($r = +0,76$, $p < 0,05$). O aumento da idade promoveu uma redução na atividade da PTP-BMr no soro de crianças do sexo feminino. Concluímos que em condições normais de saúde sistêmica e local as atividades das enzimas na saliva não foram influenciadas pelo sexo e que não existe correlação significativa entre as atividades das enzimas na saliva e no sangue, utilizando-se este protocolo experimental. A utilização da saliva como ferramenta de diagnóstico não deve ser desconsiderada, uma vez que estudos deverão ser avaliados os mesmo parâmetros na saliva e no sangue em condições de alterações da saúde local e sistêmica.

Palavras-chaves: fosfatase ácida, fosfatase alcalina, fosfatase ácida resistente ao tartarato, proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa e saliva.

2.1 INTRODUÇÃO

A análise da composição salivar pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para a localização e avaliação de várias patologias bucais e/ou sistêmicas, baseada no amplo conhecimento das concentrações específicas e origem de seus vários componentes bioquímicos e imunológicos (1). A determinação dos componentes salivares mais relevantes para o diagnóstico de condições médicas gerais deve ser considerada quando a correlação entre as concentrações salivares e sanguíneas for elevada (2).

Além de ser facilmente armazenada, a saliva é coletada através de métodos simples e não invasivos. A coleta não-traumática é atrativa especialmente para crianças e quando repetidas coletas são requeridas. A principal desvantagem da saliva como uma ferramenta de diagnóstico é a variabilidade, que ocorre em decorrência dos fatores fisiológicos e do modo de coleta (3).

Têm sido publicados estudos sobre as atividades da fosfatase ácida (FA) e da fosfatase alcalina (FAlc) na saliva, correlacionando os níveis de atividade à presença de cálculo dental e à contagem de *Lactobacillus* (4) ou à incidência de cárie dental (5, 6). As atividades dessas enzimas também foram avaliadas na saliva de crianças com alterações como diabetes (7), leucodistrofia metacromática (8), fibrose cística (9), ou em pacientes adultos com câncer de próstata (10).

Foram determinadas também as atividades dessas enzimas na saliva de indivíduos saudáveis (11, 12), porém poucos autores têm comparado as atividades enzimáticas do sangue e da saliva (2, 9).

A literatura carece de trabalhos analisando a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr), que são isoenzimas da FAT, na saliva total não-estimulada de crianças.

Essas isoenzimas são normalmente expressas em baixas concentrações, mas o aumento ou a redução significativa na expressão das mesmas pode ocorrer como parte de processos patofisiológicos, fazendo com que possam ser utilizadas como marcadores sorológicos e histológicos de doenças (13).

A TRAP, que difere das outras isoformas da fosfatase ácida humana por ser insensível ao tartarato e ao *p*-hidroximercuriobenzoato (*p*-HMB) (14), é expressa de forma mais significativa nos osteoclastos (15), sendo secretada durante a reabsorção óssea, o que torna esta enzima um marcador do processo (16).

As proteínas tirosinas fosfatases são enzimas de sinalização envolvidas na regulação de numerosas funções celulares, incluindo crescimento, mitogênese, motilidade, interações célula-célula, transcrição de genes e resposta imune (17,18). As proteínas tirosinas fosfatases de baixa massa molecular relativa (PTP-BMrs), também conhecidas como fosfatases ácidas 1 (ACP1), estão envolvidas no tamanho corporal (19) e na angiogênese (20).

As fosfatases alcalinas humanas constituem múltiplas formas moleculares de enzimas, que são produzidas por muitos tecidos como ossos, fígado, intestinos e placenta e que podem ser encontradas no soro. A concentração da fosfatase alcalina intestinal no soro aumenta em diversas desordens do trato digestivo e na cirrose. A atividade da fosfatase alcalina de origem óssea é maior na fase de crescimento, assim como a da fosfatase alcalina total (21).

A fosfatase alcalina óssea é uma ferramenta mais sensível do que a fosfatase alcalina total para acompanhar os processos de mineralização, já que um pequeno aumento dessa fração é facilmente detectado e sinaliza a existência de possíveis patologias (22).

O propósito deste trabalho foi verificar se existe correlação entre as atividades das enzimas FAT, TRAP, PTP-BMr e FAlc no soro e na saliva total não estimulada de crianças, como também possíveis influências do sexo e da faixa etária.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Triagem dos Pacientes

Trinta e duas crianças saudáveis foram examinadas neste estudo, para a determinação e comparação das atividades enzimáticas nas amostras de soro e saliva total não-estimulada. As crianças foram divididas em 4 grupos de 8 crianças de acordo com o sexo e as faixas etárias de 1-5 e 6-12 anos.

Todas as crianças foram submetidas a exame clínico, realizado por um médico pediatra da Unidade Básica de Saúde Francisco da Silva Vilella, na cidade de Araçatuba, Estado de São Paulo. A anamnese foi realizada a partir do relato dos pais e a partir dos arquivos de saúde das crianças. Somente crianças saudáveis, não medicadas e com boa saúde bucal foram incluídas no estudo.

Crianças que relutaram em colaborar com a coleta, mostraram-se tensas ou choraram durante o procedimento, foram excluídas do trabalho.

O Protocolo de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Araçatuba (Referência Processo FOA 2003/558).

2.2.2 Coletas de Saliva e Sangue

Para minimizar possíveis variações referentes ao ritmo circadiano, a saliva total não estimulada e o sangue foram coletados entre 8:00 e 10:00 horas, com as crianças em jejum de

2 horas. No dia da coleta a higiene oral das crianças foi realizada apenas com água, escova e fio dental, sem a utilização de produtos fluoretados.

Antes da coleta da saliva foram realizados o exame de dentes permanentes e decíduos cariados, perdidos e obturados através dos índices de CPO-D o ceo-d, respectivamente, como também um exame geral dos tecidos moles da cavidade bucal, para descartar a existência de processos inflamatórios no periodonto e na mucosa bucal.

A saliva foi obtida por sucção suave do assoalho da boca através de um cateter de plástico macio, posicionado de maneira a evitar o contato com o epitélio. O cateter empregado para a coleta estava conectado a um frasco de vidro estéril e lacrado, que também estava conectado a uma bomba de vácuo.

Os frascos de coleta foram mantidos em gelo durante os 10 minutos do procedimento e durante o transporte até o Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, onde as amostras de saliva foram centrifugadas a $5.500 \times g$ por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C . Os sobrenadantes foram fracionados e armazenados a -20°C , para análises posteriores.

A coleta de sangue foi realizada imediatamente após a coleta de saliva, através da punção da veia braquial. O soro foi obtido através de centrifugação ($1.500 \times g$) durante 15 minutos, após 15 minutos de repouso em temperatura ambiente.

As amostras de soro foram mantidas no gelo e transportadas ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, onde foram fracionadas e armazenadas a -20°C . Amostras apresentando hemólise foram descartadas.

2.2.3 Determinação da Taxa de Fluxo salivar

Considerando o valor de 1,0 para a densidade da saliva total (23), a taxa de fluxo salivar (mL min^{-1}) foi calculada através da diferença entre o peso do frasco antes e após a

coleta (correspondente ao volume total de saliva não centrifugada), dividido pelo tempo de coleta que foi no máximo de 10 minutos.

2.2.4 Determinação de Proteínas

As concentrações de proteína total na saliva foram determinadas pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (24). As leituras das absorbâncias foram realizadas através de um espectrofotômetro Hitachi U-1100, no comprimento de onda de 660 nm. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão, nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,8; 1 e 2 mg mL⁻¹.

2.2.5 Determinação das Atividades Enzimáticas

A atividade enzimática específica (AE) da FAT foi determinada como descrito por Granjeiro et al. (25). Para um volume final de 1500 µL a reação foi iniciada pela adição de 100 µL de saliva ou 50 µL de soro a um volume de 900 ou 950 µL do meio de reação respectivamente, contendo 100 mmol L⁻¹ de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5 mmol L⁻¹ do substrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP). Utilizando-se o meio de reação acrescido dos inibidores *p*-hidroximercuribenzoato (*p*-HMB) na concentração de 1 mmol L⁻¹ e tartarato de sódio, 10 mmol L⁻¹, foi realizada a determinação da TRAP. Para a verificação da PTP-BMr no soro e na saliva adicionou-se ao meio apenas *p*-HMB, responsável pela completa inibição desta enzima (25).

A paralisação da reação ocorreu pela adição de 500 µL de NaOH 1,0 mol L⁻¹, após incubação a 37°C, por períodos de 60 e 40 minutos para a saliva e o soro, respectivamente. As absorbâncias foram determinadas em 405 nm, no espectrofotômetro Hitachi U-1100. Foram feitos tubos controle para todas as amostras, a fim de eliminar possíveis interferências

causadas por outros componentes das mesmas nos valores de absorbância. O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol utilizado foi de $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A FAlc foi determinada através de kit comercial, marca Labtest[®], com metodologia baseada nos trabalhos de Roy (26). O substrato utilizado foi a timolftaleína monofosfato na concentração de 22 mmol L^{-1} , no pH 10,1. Os volumes de soro e saliva utilizados foram de 50 μL e 100 μL , respectivamente. A incubação foi mantida na temperatura de 37°C por um período de 10 minutos. As determinações das absorbâncias foram realizadas em 580 nm. Foram feitos tubos controle para todas as amostras.

Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol L^{-1} de produto de reação em 1 minuto. A atividade enzimática (AE) foi expressa como Unidade de Atividade Enzimática (UE) por 1 mg de proteína.

2.2.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos apresentaram uma distribuição Gausiana quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). O teste-*t de Student* não-pareado foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os sexos com relação às médias das taxas de fluxo da saliva total não estimulada e os valores das atividades enzimáticas específicas da FAT, TRAP, PTP-BMr e FAlc para cada faixa etária. As correlações entre as atividades enzimáticas na saliva total e no soro foram analisadas através do teste de Pearson. Significância estatística foi assumida quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism Versão 3.00.

2.3 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta as médias e os desvios padrões dos índices de CPO-D e ceo-d da população estudada de acordo com a faixa etária e o sexo, como também a porcentagem de crianças livres de cáries. Todos os grupos apresentaram porcentagem igual ou superior a 50% de crianças livres de cárie. O grupo do sexo masculino na faixa etária de 1-5 anos apresentou o índice ceo-d mais elevado (1,38).

As AEs de todas as enzimas estudadas foram maiores na saliva do que no sangue (Figuras 1, 2, 3 e 4).

As AEs da FAT (Figura 1) nas salivas foram 185,87; 224,98; 158,23 e 213,63 vezes mais altas do que no soro, nos grupos M1-5 (sexo masculino, faixa etária de 1 a 5 anos), M 6-12 (sexo masculino, faixa etária de 6 a 12 anos), F 1-5 (sexo feminino, faixa etária de 1 a 5 anos) e F 6-12 (sexo feminino, faixa etária de 6 a 12 anos), respectivamente.

As atividades da TRAP na saliva foram 41,83 (M 1-5), 43,71 (M 6-12), 41,29 (F 1-5) e 39,76 (F 6-12) vezes maiores, em relação ao soro (Fig. 2) e enquanto os valores de atividade da PTP-BMr (Fig. 3) foram 389,90 (M 1-5), 603, 56 (M 6-12), 245,14 (F 1-5) e 522,49 (F 6-12) vezes mais elevados na saliva.

A FAlc foi entre as enzimas estudadas a que apresentou a menor diferença entre as AEs nas amostras de saliva e soro, sendo apenas 3,13 (M1-5), 2,43 (M 6-12), 3,13 (F 1-5) e 2,71 (F 6-12) vezes mais elevada na saliva.

Nenhuma diferença significativa na AE da FAlc entre os sexos foi observada nos grupos estudados.

Apenas para a TRAP de crianças do grupo M 1-5 foi verificada correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a saliva total não estimulada e o soro (Tabela 2).

A correlação entre o soro e a saliva foi negativa para as enzimas FAT no grupo M 6-12, TRAP nos grupos F 1-5 e F 6-12 e para a PTP-BMr nos grupos M 1-5 e F 6-12. Também foi verificada correlação negativa para a FAlc nos grupos M 1-5 e F 6-12.

A influência da faixa etária só foi observada quando comparadas as atividades da PTP-BMr em amostras de soro de crianças de sexo feminino. Neste caso foi observada uma redução da atividade enzimática de $0,032 \pm 0,005$ para $0,017 \pm 0,002$ UE mg^{-1} proteína, com o aumento da faixa etária.

2.4 DISCUSSÃO

Os estudos que avaliam a composição química e a velocidade de secreção da saliva são, geralmente, dificultados pelas evidentes influências exercidas por variações das condições fisiológicas. Dentre os fatores que influenciam a composição da saliva podem ser citados o tipo de dieta, tempo após a ingestão de alimentos, outros fatores relativos ao dia da avaliação e a idade (11).

Este estudo teve como prioridade avaliar a influência de fatores como sexo e faixa etária, nas atividades das enzimas FAT, TRAP, PTP-BMr e FAlc na saliva total não estimulada de crianças saudáveis e a possível correlação entre as atividades na saliva e no soro.

Embora Dentay & Rae (27) tenham demonstrado ausência de correlação entre a atividade da fosfatase ácida salivar e a incidência de cárie, para este trabalho foram selecionadas crianças com condições bucais saudáveis e semelhantes. A avaliação da saúde bucal das crianças pelos índices CPO-D e ceo-d, demonstrou uma baixa prevalência ou ausência de cárie nas crianças de todos os grupos. O índice mais elevado foi o ceo-d de 1,38

encontrado no grupo do sexo masculino de 1-5 anos, que é considerado pela OMS como indicativo de baixa prevalência de cárie.

A realização da higiene bucal sem o uso de dentifrício fluoretado foi exigida, para evitar a inibição da fração osteoclástica da TRAP pelo fluoreto (28) e possíveis interferências de fosfatases provenientes da placa bacteriana, leucócitos e células epiteliais (11). Para evitar a interferência da escovação na concentração de proteína salivares, relatada por Hoek et al. (29), as amostras foram coletadas no mínimo duas horas após a higiene oral das crianças. Para minimizar variações no fluxo salivar em função do estado alimentar as coletas foram realizadas em crianças em jejum de 2 horas.

Neste estudo, comparando-se os valores das atividades das enzimas nos dois fluidos biológicos, observou-se que para as fosfatases ácidas foram obtidos valores maiores na saliva. Enquanto a AE ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) da FAT foi em média 195,68 vezes maior na saliva, as AEs da TRAP e da PTP-BMr foram em média 41,65 e 440,27 vezes mais elevadas. Nagler et al. (2) haviam descrito valores 9,135 mais elevados de atividade de FAT na saliva em relação ao soro, porém expressando a atividade da enzima em unidades enzimáticas por litro (U L^{-1}), sem levar em consideração os valores de proteína nas amostras, que foram obtidas de voluntários de ambos os sexos, com idades variando entre 18 e 54 anos.

Para minimizar os efeitos das variações do fluxo salivar nas concentrações de componentes da saliva, dentre os quais proteínas, as atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica (AE) que representa unidade enzimática (UE) por miligrama de proteína.

A inexistência de correlação entre a FAT da saliva e do soro verificada no presente trabalho também foi demonstrada por Nagler et al. (2). Estudos têm relatado que a saliva total exibe uma atividade mais elevada da FAT se comparada às atividades nas salivas de parótidas, submandibulares e sublinguais (2). Este fato associado à ausência de correlação

com a atividade da enzima no sangue tem sugerido que, estruturas como a gengiva e a mucosa oral podem servir como portas de entrada a partir do sangue para o interior da cavidade oral e não como locais de produção das enzimas (2).

A existência de correlação entre componentes específicos na saliva total e do sangue é o ponto de origem para validar a sua utilização como material biológico para análises clínicas laboratoriais, porém a ausência de uma completa correlação entre as concentrações de um componente da saliva e do sangue não necessariamente nega a sua origem sangüínea (2). Quando a correlação existe, pode-se concluir que a fonte do componente específico da saliva seja o sangue (30, 31).

Quando comparados os valores de atividade da TRAP no soro e na saliva foi observada a existência de correlação no grupo do sexo masculino, na faixa etária de 6-12 anos, sugerindo que aumentos na atividade da enzima no soro podem ser acompanhados de elevações na saliva total.

Chen et al. (32) demonstraram que as atividades das enzimas FAT e TRAP no soro são dependentes da idade, sendo maiores na infância e declinando lentamente através dos anos. Por volta dos 14 anos já podem ser observados valores semelhantes aos de adultos.

Durante a infância e adolescência a FAT e a TRAP no soro mudam paralelamente (33). Alguns trabalhos relatam que a alta atividade da FAT no soro de crianças não está relacionada ao sexo (32), porém a partir da maturação sexual as influências nas atividades destas enzimas relacionadas ao sexo, tornam-se claras. Como descrito por Schiele et al. (33) crianças do sexo feminino têm uma redução nas atividades da FAT e da TRAP após a menarca.

As médias de idades em cada faixa etária da população estudada neste trabalho ($3,9 \pm 1,57$ M 1-5 anos, $9,17 \pm 0,85$ M 6-12 anos, $3,25 \pm 1,60$ F 1-5 e $9,42 \pm 2,03$ F 6-12 anos) estão

fora dos períodos de declínio acentuado da FAT e TRAP, sugerindo o motivo de não terem sido visualizadas diferenças estatísticas.

A partir dos dados obtidos foi possível avaliar as proporções entre as atividades da fosfatase ácida total e das frações TRAP e observou-se que a isoenzima TRAP representa aproximadamente 66, 73, 55 e 70% da atividade da FAT no soro das crianças dos grupos M 1-5, M 6-12, F 1-5 e F 6-12, respectivamente, porém esta proporção diminuiu na saliva para os seguintes valores 15, 14, 15 e 13%, de acordo com a seqüência anterior. Na saliva total não estimulada de adultos (média de idade de 34 anos, variando de 28-45), coletada entre 8:00 e 10:00 horas a atividade da TRAP representou 16,87% da atividade da FAT (34).

Já a PTP-BMr compreende 30, 24, 38 e 26% da atividade da FAT no soro, e 63, 63, 57 e 64% da FAT da saliva para os mesmos grupos.

Utilizando como substrato α -naftil fosfato, Shiele et al. (33) determinaram que a TRAP representa aproximadamente 75% da atividade da FAT em meninas com idade acima de 14 anos e meninos acima de 19 anos, enquanto que para os adultos o valor é de 64%, quando são utilizadas amostras de soro. Utilizando como substrato *p*-nitrofenil fosfato no presente estudo foram verificadas as seguintes relações: 73% no grupo M 6-12 e 70% no grupo F 6-12.

A diferença discrepante nas proporções entre a FAT e suas isoenzimas na saliva total e no soro observadas neste trabalho, podem sugerir a existências de possíveis limitações na passagem ou excreção das mesmas para a cavidade bucal. Deve ainda ser considerada a possibilidade da presença de componentes salivares com ação inibitória seletiva sobre frações da fosfatase ácida.

Estudando as atividades de FAlc total no soro e na saliva de indivíduos dos sexos masculino e feminino, com idade variando entre 18 e 54 anos Nagler et al. (2) verificaram

ausência de correlação, o que também foi verificado em nosso estudo, nas faixas etárias de 1-5 e 6-12 anos.

Foi descrita anteriormente uma menor atividade (U L^{-1}) de FAlc na saliva em relação ao soro (2), porém no presente estudo a atividade da FAlc na saliva foi um pouco maior (2,85 vezes) do que a do soro. Esta divergência de resultados pode estar relacionada à diferença na faixa etária dos indivíduos estudados e também ao fato de terem sido levadas em consideração as concentrações de proteína nas amostras de saliva e de soro, para os cálculos das atividades enzimáticas.

Sabe-se que a fosfatase alcalina total no soro aumenta marcadamente em função do aumento da fração de origem óssea, entre 5-14 anos em crianças do sexo masculino e entre 5-12 anos para o sexo feminino (35), atingindo picos nas idades de 11-12 anos (sexo feminino) e 13-14 anos para o sexo masculino (36). As médias das idades em cada faixa etária da população estudada neste trabalho estão fora dos períodos onde são observados os picos de atividade de FAlc, o que poderia justificar o fato de não terem sido observadas diferenças significativas na FAlc no soro, em relação à idade.

Semelhante ao que ocorre com a FAT e a TRAP a maturação sexual influencia na atividade da FAlc no soro, com uma clara redução em meninas com idade entre 10-15 anos, após a menarca (37). Neste trabalho não foram observadas diferenças na FAlc no soro ou na saliva, em função da idade ou do sexo.

Com base nos resultados deste estudo pode-se concluir que a idade e o sexo não têm influência nas atividades das enzimas FAT, TRAP e FAlc nas amostras de soro e saliva total, nas faixas etárias estudadas. Com relação à PTP-BMr há uma redução significativa na atividade da enzima no soro de crianças do sexo feminino, com o aumento da idade.

As análises dos coeficientes de correlação das diferentes enzimas em um mesmo grupo demonstraram uma ampla discrepância de valores, sugerindo que diferentes enzimas ou

isoenzimas possam exibir tendências distintas, assumindo correlações diretamente ou inversamente proporcionais com as variáveis avaliadas (sexo e idade).

Pode-se concluir que em condições normais de saúde sistêmica e local as atividades das enzimas FAT, TRAP, PTP-BMr e FAlc na saliva não foram influenciadas pelo sexo e que não existe correlação significativa entre as atividades das enzimas na saliva e no sangue, utilizando-se este protocolo experimental. Diante destes resultados a utilização da saliva como ferramenta de diagnóstico não deve ser desconsiderada, uma vez que estudos deverão ser realizados avaliando os mesmo parâmetros na saliva e no sangue em condições de alterações da saúde local e sistêmica.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002 1;32:268-77.
- 2- Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med* 2002;50:214-25.
- 3- Ben-Aryeh H, Lapid S, Szargel R, Benderly A, Gutman D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. *Arch Oral Biol* 1984;29:357-62.
- 4- Helman Ez, Mitchell Df. Lactobacilli and dental caries in the hamster. *J Dent Res* 1953;32:596-600.
- 5- Saito S, Kizu K. Phosphatase activity in whole and parotid saliva and its relationship to dental caries. *J Dent Res* 1959 ;38:500-5.
- 6- Pandey RK, Tripathi A, Chandra S, Pandey A. Relation of salivary phosphorus and alkaline phosphatase to the incidence of dental caries in children. *J Pedod* 1990;14:144-6.
- 7- Lopez ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* 2003;14:26-31.
- 8- Den Tandt WR, Jaeken J. Determination of lysosomal enzymes in saliva. Confirmation of the diagnosis of metachromatic leukodystrophy and fucosidosis by enzyme analysis. *Clin Chim Acta* 1979;97:19-25.
- 9- Oglesbee LH, Seale TW, Mayes JS, Flux M, Young SK, Renner OM. Plasma and submandibular saliva lysosomal enzymes in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 1984;143:135-45.

- 10- Shannon IL, Feller RP, Beach PD. Parotid saliva acid phosphatase in health and disease. *Aust Dent J* 1976;21:138-42.
- 11- Benedek-Spat E. The composition of unstimulated human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 1973;18:39-47.
- 12- Cornish CJ, Posen S. Human salivary alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta* 1968;20:387-91.
- 13- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol* 2002;55:65-72.
- 14- Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FS, Baylink DJ. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potentia use to assess bone resorption. *Clin Chem* 1987; 33:458-62.
- 15- Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. *Am J Anat* 1991;191:228-36.
- 16- Chambers TJ, Fuller K, Darby JA. Hormonal regulation of acid phosphatase release by osteoclasts disaggregated from neonatal rat bone. *J Cell Physiol* 1987;132:90-6.
- 17- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995 ;80:225-36.
- 18- Hiroshi A, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CM. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim. Nova* 2003;26:896-900.
- 19- Greene LS, Bottini N, Borgiani P, Gloria-Bottini F. Acid phosphatase locus 1 (ACP1): Possible relationship of allelic variation to body size and human population adaptation to thermal stress-A theoretical perspective. *Am J Hum Biol* 2000;12:688-701.

- 20- Huang JF. Different protein tyrosine phosphatase superfamilies resulting from different gene reading frames. *Mol Biol Evol* 2003;20:815-20.
- 21- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982 ;28:2007-16.
- 22- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995;266:176-82.
- 23- Flink H, Tegelberg A, Lagerlof F. Influence of the time of measurement of unstimulated human whole saliva on the diagnosis of hyposalivation. *Arch Oral Biol* 2005;50:553-9.
- 24- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422-7.
- 25- Granjeiro JM, Ferreira CV, Juca MB, Taga EM, Aoyama H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. *Biochem Mol Biol Int* 1997;41:1201-8.
- 26- Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem* 1970;16:431-6.
- 27- Dentay JT, Rae JJ. Phosphatase in saliva. *J D Res* 1949; 28:68-71.
- 28- Hayman AR, Cox TM. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem* 1994;269:1294-300.
- 29- Hoek GH, Brand HS, Veerman EC, Amerongen AV. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. *Eur J Oral Sci* 2002;110:480-1.
- 30- Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002 ;32:268-77.

- 31- Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 1989;119:298-304.
- 32- Chen J, Yam LT, Janckila AJ, Li CY, Lam WK. Significance of "high" acid phosphatase activity in the serum of normal children. *Clin Chem* 1979;25:719-22.
- 33- Schiele F, Artur Y, Floc'h AY, Siest G. Total, tartrate-resistant, and tartrate-inhibited acid phosphatases in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 1988;34:685-90.
- 34- Marcinkiewicz M, Dabrowska A, Czyzewska E, Grabowska SZ, Kreczko S. Influence of secretin and caerulein on acid phosphatase activity in human saliva. *J Oral Sci* 1999;41:29-34.
- 35- Cherian AG, Hill JG. Age dependence of serum enzymatic activities (alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, and creatine kinase) in healthy children and adolescents. *Am J Clin Pathol* 1978;70:783-9.
- 36- Fleisher GA, Eickelberg ES, Elveback LR. Alkaline phosphatase activity in the plasma of children and adolescents. *Clin Chem* 1977;23:469-72.
- 37- Schiele F, Henny J, Hitz J, Petitclerc C, Gueguen R, Siest G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 1983;29:634-41.

Tabela 1. Índices de CPO-D e ceo-d das crianças

Grupos	CPO-D (Média ± DP)	ceo-d (Média ± DP)	Livres de cáries (%)
M 1-5	0,00	1,13 ± 1,64	65%
M 6-12	0,00	1,38 ± 2,50	65%
F 1-5	0,00	0,00	100%
F 6-12	0,25 ± 0,71	1,00 ± 1,77	50%

Valores expressos em média ± DP.

Tabela 2. Atividades enzimáticas específicas (AE) no soro e na saliva total não estimulada de crianças

Sexo Masculino 1-5 anos					
Enzimas	Soro		Saliva	Correlação	Significância
	n	Média ± EPM	Média ± EPM		
FAT	8	0,074 ± 0,006	13,75 ± 3,28	r = +0,59	0,121 (NS)
TRAP	8	0,049 ± 0,004	2,03 ± 0,47	r = +0,57	0,140 (NS)
PTP-BMr	8	0,022 ± 0,003	8,58 ± 2,10	r = -0,10	0,813 (NS)
FAlc	8	1,386 ± 0,072	4,35 ± 0,77	r = -0,26	0,529 (NS)
Sexo Masculino 6-12 anos					
Enzimas	Soro		Saliva	Correlação	Significância
	n	Média ± EPM	Média ± EPM		
FAT	8	0,059 ± 0,004	13,22 ± 2,21	r = -0,34	0,412 (NS)
TRAP	8	0,043 ± 0,005	1,89 ± 0,41	r = +0,76	0,028 *
PTP-BMr	8	0,014 ± 0,003	8,31 ± 1,29	r = +0,41	0,315 (NS)
FAlc	8	1,654 ± 0,163	4,03 ± 0,62	r = +0,46	0,250 (NS)
Sexo Feminino 1-5 anos					
Enzimas	Soro		Saliva	Correlação	Significância
	n	Média ± EPM	Média ± EPM		
FAT	8	0,085 ± 0,007	13,51 ± 2,00	r = +0,55	0,155 (NS)
TRAP	8	0,047 ± 0,005	1,96 ± 0,36	r = -0,08	0,850 (NS)
PTP-BMr	8	0,032 ± 0,005	7,72 ± 1,16	r = +0,09	0,840 (NS)
FAlc	8	1,432 ± 0,074	4,48 ± 0,67	r = +0,26	0,542 (NS)
Sexo Feminino 6-12 anos					
Enzimas	Soro		Saliva	Correlação	Significância
	n	Média ± EPM	Média ± EPM		
FAT	8	0,066 ± 0,005	14,01 ± 3,23	r = +0,37	0,361 (NS)
TRAP	8	0,046 ± 0,004	1,82 ± 0,36	r = -0,31	0,457 (NS)
PTP-BMr	8	0,017 ± 0,002	8,97 ± 2,04	r = -0,04	0,919 (NS)
FAlc	8	1,527 ± 0,139	4,15 ± 0,65	r = -0,20	0,639 (NS)

AE = UE mg⁻¹ proteína. UE = nmol min⁻¹.

Valores expressos em média ± EPM. Teste de correlação de Pearson, * p<0,05.

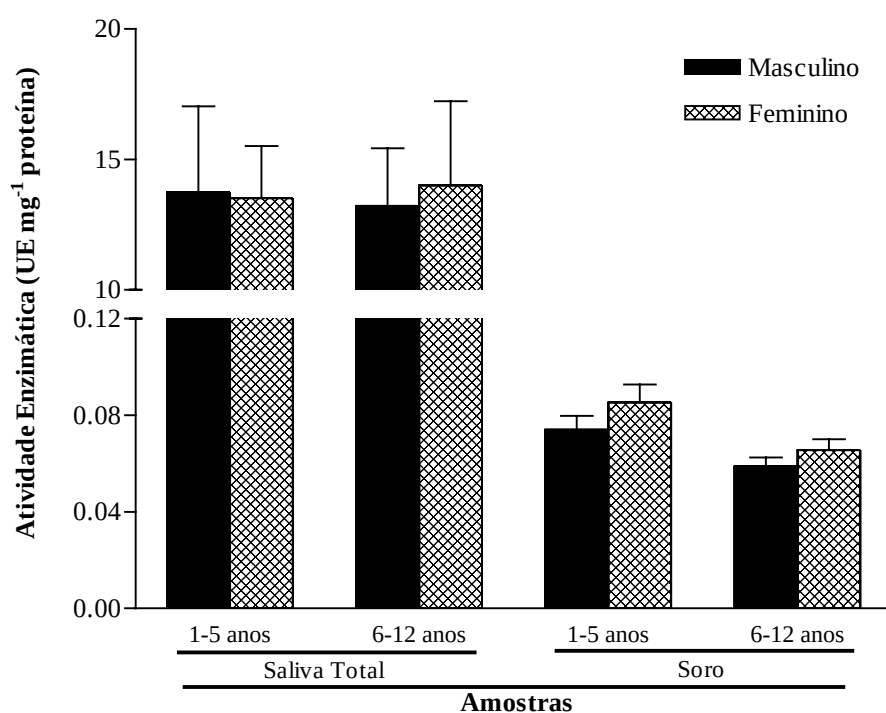


Figura 1. Atividade enzimática específica da FAT na saliva total e no soro de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

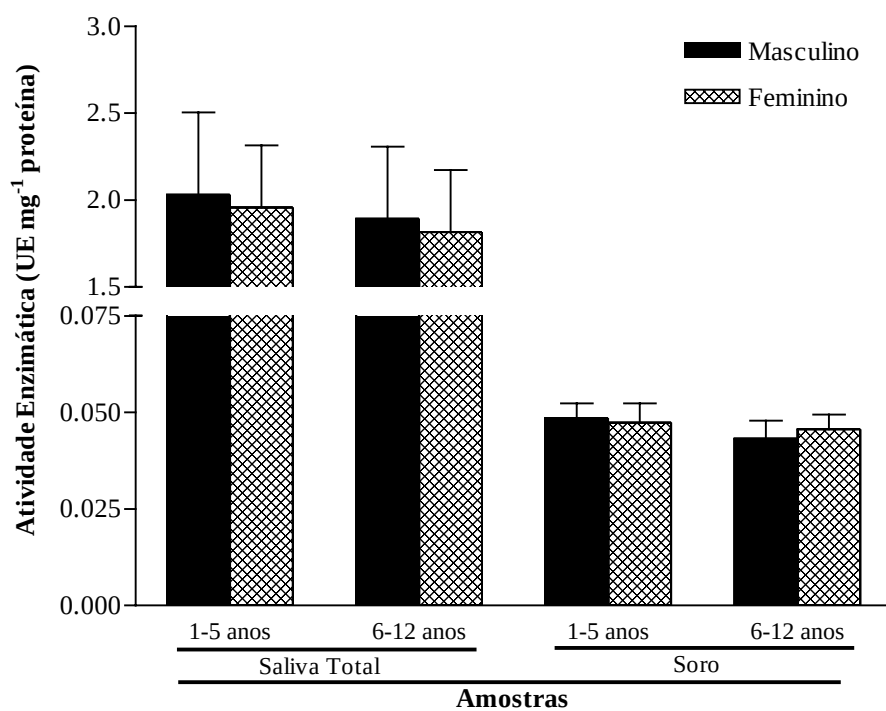


Figura 2. Atividade enzimática específica da TRAP na saliva total e no soro de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

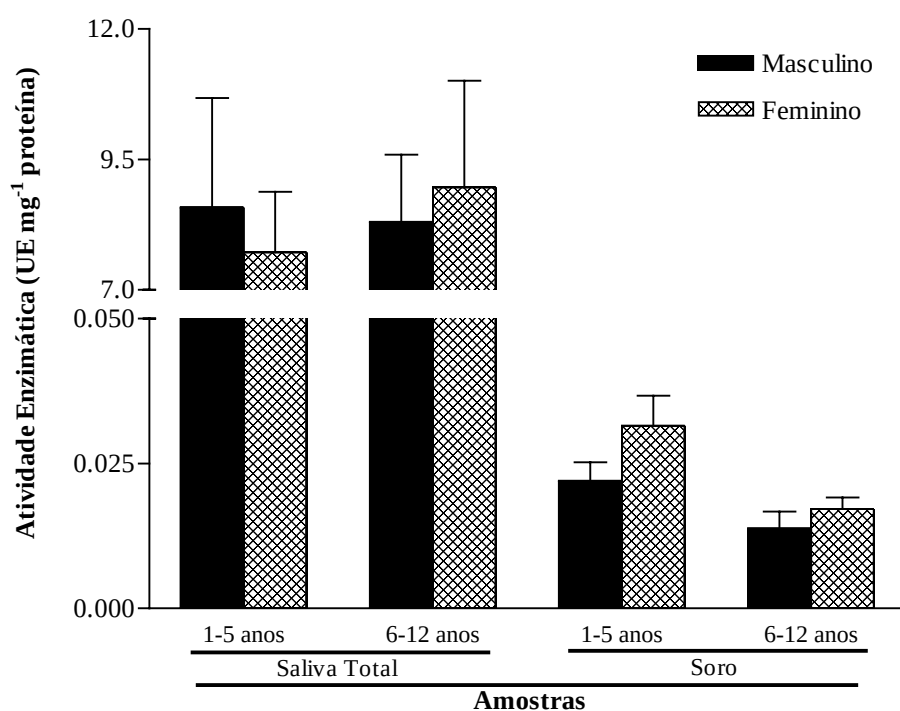


Figura 3. Atividade enzimática específica da PTP-BMr na saliva total e no soro de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

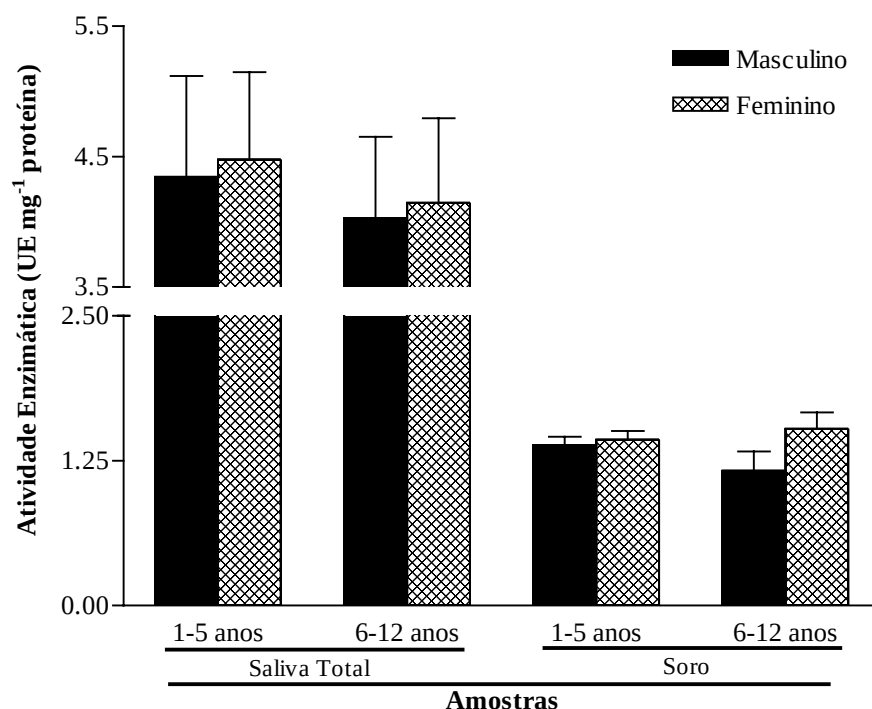


Figura 4. Atividade enzimática específica da FAlc na saliva total e no soro de crianças. Comparação entre os sexos masculino e feminino em duas faixas etárias, através do teste-*t* ($p < 0,05$). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

Anexos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Termo de Consentimento Esclarecido



OF. 038/03
CEP
ACBD/mbc

Araçatuba, 18 de março de 2003

Referência Processo FOA 2003/558

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **"Pesquisa de Fosfatase Ácida Total em Saliva de Crianças"**, expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado Relatório até o dia 18/03/2004.



Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delben
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhora
Profa. Dra. Ana Cláudia de M.S. Nakamune
Câmpus de Araçatuba
UNESP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

(Resolução nº 01 de 13/06/98 – CNS)

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:	Cidade:	U.F.	
Telefone:	CEP:		

1. Responsável Legal:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:	Cidade:	U.F.	
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):			

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: Análise comparativa dos níveis de fosfatases ácidas e fosfatase alcalina na saliva total e soro de crianças: variações de acordo com o sexo e idade		
2. Pesquisador responsável: Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune		
Cargo/função: Prof. Ass. Doutora	Inscr.Cons.Regional: CRF-8 12.000	Unidade ou Departamento do Solicitante: Dept. Ciências Básicas
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo). ☐ SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR		
4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar): Determinar a atividade da fosfatase ácida total, fosfatase ácida resistente ao tartarato, fosfatase ácida de baixo peso molecular e fosfatase alcalina na saliva total de crianças, visando estabelecer os valores de normalidade, nas faixas etárias de 1-5 anos e 6-12 anos de idade e correlacionar estes valores com os níveis da atividade destas mesmas enzimas no soro destas crianças. Os estabelecimentos dos valores de normalidade da enzima na saliva, é o passo inicial para a utilização da mesma em testes de triagem e diagnóstico de patologias locais ou sistêmicas, que sabidamente alteram a atividade da enzima em outros materiais biológicos, que são obtidos através de técnicas invasivas.		

5. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar) Coleta de saliva total do assoalho da boca, por aspiração, utilizando um escalpe ao qual será acoplada uma ponta descartável. A saliva será coletada em um frasco, ao qual estará conectado também um segundo escalpe ligado a uma bomba sugadora. Tempo de coleta: 10 minutos, ou tempo inferior diante da obtenção do volume de saliva necessário.
6. Desconfortos e riscos esperados: (explicitar) A coleta será realizada em ambiente adequado a criança, para evitar o estresse, devendo a mesma permanecer sentada por 10 minutos.
7. Benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar) Utilização da saliva como fluido biológico para testes laboratoriais de triagem e diagnóstico de doenças correlacionadas com a alteração da atividade da fosfatase ácida total, fosfatase ácida resistente ao tartarato, fosfatase ácida de baixo peso molecular e fosfatase alcalina.
8. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar) O paciente que tem a necessidade de realizar um hemograma, contudo não possui condições financeiras para obtenção do mesmo, terá acesso a este exame gratuitamente, sendo este realizado por um laboratório de qualidade. Garantindo assim um atendimento básico de saúde completo.
9. Duração da pesquisa: 3 anos
10. Aprovação do Protocolo de pesquisa pelo comitê de ética para análise de projetos de pesquisa em / /

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Recebi esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.
2. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.
3. Recebi esclarecimento sobre compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade.
4. Recebi esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar minha vontade em continuar participando da pesquisa.
5. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.
Observações complementares.

IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 6 do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Assinatura

Local, / / .

Testemunha

Nome:

Endereço.:

Telefone .:

R.G.:

Testemunha

Nome:

Endereço.:

Telefone .:

R.G.: