



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



Thamiris Orrico Rodrigues

Capacidade antioxidante da saliva em indivíduos com Síndrome de Down em presença de doença periodontal

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara
2014



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



Thamiris Orrico Rodrigues

Capacidade antioxidante da saliva de indivíduos com Síndrome de Down em presença de doença periodontal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara
2014

THAMIRIS ORRICO RODRIGUES

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA SALIVA EM INDIVÍDUOS COM
SÍNDROME DE DOWN EM PRESENÇA DE DOENÇA PERIODONTAL

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof^a Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof Dr Alex Tadeu Martins

3º Examinador: Prof Dr Cyneu Aguiar Pansani

Araraquara, 26 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

Thamiris Orrico Rodrigues

Nascimento 04/04/1988, Araraquara, SP

Filiação Marcos Antônio Lui Rodrigues
Sandra Rita Perez Orrico Rodrigues

Formação Acadêmica

2007-2010 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - UNICAMP

2012-2014 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP

Associações

Sociedade Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD

Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia – SBPqO

Associação Brasileira de Odontopediatria – ABO Odontopediatria

“Não é preciso muita coisa para mudar a vida, basta só um cromossomo, no entanto, não se pode deixar o cromossomo mudar o amor que devemos sentir pelo próximo”.

Karl Marx Valentim Santos

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar presente em todos os dias de minha vida, guiando meus passos e iluminando meu caminho, e que me deu força e coragem para chegar ao final dessa jornada.

A vocês, meus pais, Sandra e Marcos, por estarem comigo durante toda minha caminhada, sempre demonstrando um apoio incondicional e me incentivando. Sem vocês nada disso seria possível. Mãe, obrigada por suas orações. Dedico mais essa conquista profissional a vocês. Admiro e amo muito vocês!

À Profª Drª Elisa Maria Aparecida Giro, minha orientadora, por ter me recebido como estagiária no atendimento a pacientes especiais e ter acreditado em mim ao me dar este trabalho de pesquisa. Obrigada por ser um exemplo de profissional e ser humano. Por toda compreensão e paciência, durante esses dois anos, que foram de grande importância para meu desenvolvimento humano e profissional, pela confiança em mim depositada e por ter se tornado além de um exemplo a ser seguido, uma grande amiga!

Ao meu tio Marcelo, minha inspiração e exemplo de vida, obrigada pelo seu jeito carinhoso para com todos nós.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu irmão, Thiago, por todo carinho e pelo companheirismo demonstrados todos os dias da minha vida.

Ao meu namorado Du, por estar sempre ao meu lado, me apoiando em cada passo e mostrando sempre o lado bom da vida. Por todo o carinho, amor e respeito que tem por mim. Por entender desde o começo a minha distância e por ter paciência em meus momentos de nervosismo. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Eu Amo Você!

À Márcia Tanaka, um exemplo de pessoa e companheira de todos os momentos dessa conquista. A você devo tudo, e, se hoje estou aqui é porque um dia acreditou em mim e me confiou este trabalho. Hoje posso dizer que grande parte de meu crescimento profissional devo a você, que sempre teve muita paciência e dedicação ao me ensinar. Obrigada sempre!!!

Ao meu avô Matheus que, com certeza, é mais um anjo me guiando lá do céu.

A todos meus familiares por nunca deixarem que a distância nos afaste e por toda torcida, carinho, compreensão e incentivo. Em especial à minha prima Mê, exemplo de perseverança, pelo maravilhoso presente que nos deu esse final de ano: a chegada de mais um membro à família. E ao meu primo Guel, companheiro inseparável, muito obrigada por tudo que tem feito por mim.

As minhas tias, Sil e Su por serem sempre meus exemplos na vida profissional.

Ao Tio Cyneu, por sempre me ajudar, por todos os conselhos, por todas as repreensões, por todas as risadas; enfim, por ter me acolhido como sua sobrinha e me tratado como filha, serei eternamente grata!!! E à Taisa, muito obrigada por ter me acolhido em sua casa e compartilhado sua amizade.

Aos meus amigos Su, Manu, Ju, Ma, Ian, Shigueo, Gui, Nay, Josi, Malvezi, Luisinho, Cris, Guito, Larissa, Rena, por estarem comigo sempre e deixarem a volta pra casa mais gostosa a cada reencontro. A eterna família ZOACSA.

À minha amiga Susy, a irmã que escolhi, que nunca deixou a distância nos afastar e sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando.

À Ana e Rê, por entenderem minha ausência e sempre me darem força com as ligações inesperadas.

À Thalita e Davi, por encherem de alegria meus dias, por tornarem esta jornada mais leve.

À Renatinha, Gi e Marcel muito obrigada por tudo o que vocês fizeram por mim. Pela amizade, por todas as conversas no final do dia, pelos desabafos, pelas risadas, pelos conselhos. Sentirei falta das nossas jantas e acreditem da Nina!!! Obrigada por fazerem parte de uma etapa tão importante em minha vida!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio Cezar Durigan e Vice-Reitor Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgaviolli Massucato.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Vice-Chefe Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior e Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

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

Ao Laboratório de Genética, do Departamento de Morfologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, obrigada por sempre estar tão disposta a ajudar.

Ao Laboratório de Biologia Oral, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de São Paulo – USP, coordenado pelos professores Prof. Dr. José Nicolau e Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, obrigada por terem nos recebido de forma tão generosa e ter disponibilizado o laboratório. Em especial ao Técnico do Laboratório Douglas e à Pós-graduanda Flávia por todo tempo despendido em ajudar-me, por toda paciência em ensinar-me as técnicas; enfim, por serem sempre tão atenciosos mesmo com muitos afazeres.

Ao Prof. Dr. José Nicolau e Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira por terem nos recebido de forma tão generosa e nos disponibilizado o laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior por ter lido o projeto deste trabalho e colaborado com valiosas sugestões.

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

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Dulce, Soninha, Odete, Tânia, Izabel, Cristina, Márcia, Totó, Diego, Pedrinho e Regina.

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

A todos colegas do Laboratório de Genética do Departamento de Morfologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, por toda ajuda recebida e pelo convívio durante o ano; em especial à Li Finotti por todas as horas de desabafo permanecendo ao meu lado me incentivando e ensinando.

Aos meus queridos colegas de Pós-graduação: Ana Carol, Ana Paula, Camila, Diego, Fabiano, Juliana, Liege, Luana, Luciana, Manuel, Márcia, Natália, Renata, Thalita, Vinicius, obrigada pela convivência, por todas as risadas e bons momentos compartilhados, por serem a minha família em Araraquara.

A todos os pacientes que colaboraram comigo nesta pesquisa, meu muito obrigado pela compreensão e dedicação.

RESUMO

Rodrigues TO. Capacidade antioxidante da saliva de indivíduos com Síndrome de Down em presença de doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Problemas periodontais afetam cerca de 100% dos indivíduos com Síndrome de Down (SD) aos 30 anos. A hipótese de que a redução da regulação negativa do metabolismo oxidativo de pacientes com SD possa agravar a resposta inflamatória causando maior severidade da doença periodontal (DP), estimulou o desenvolvimento deste trabalho com o objetivo de quantificar a atividade de antioxidantes, o nível de um biomarcador do estresse oxidativo e analisar os parâmetros clínicos relacionados com a DP. Para isso, foram selecionados 28 indivíduos com DP; sendo 18 com SD e 10 não-sindrômicos (controle), os quais passaram por um exame periodontal e tiveram a saliva coletada, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico. A saliva total não estimulada foi coletada de manhã, após jejum de 2 horas, usando um sugador portátil a vácuo. No primeiro estudo, avaliou-se a atividade dos antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Para os dois primeiros foram utilizados kits colorimétricos, e, para a catalase (CAT) a análise foi realizada por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados foram obtidos por espectrofotometria, em comprimento de onda de 550 nm, 340 nm e 240 nm, respectivamente. No segundo estudo, avaliou-se o dano causado pelo estresse oxidativo, por meio do seu principal produto, o malondialdeído (MDA), bem como, a capacidade antioxidante total (TAOC) na saliva. A avaliação da TAOC foi feita por colorimetria a 660 nm, e o nível de MDA foi baseado na reação dos ácidos

tricloroacético (TCA), butilhidroxitoluol (BHT) e ácido tiobarbitúrico (TBAR), cujo produto é detectado a 535 nm. Os dados, dependendo da normalidade ou não, foram avaliados pelos testes ANOVA/Mann-Whitney, complementados por testes de Tukey/Wilcoxon ($\alpha=0,05$). Houve uma melhora nos parâmetros clínicos após o tratamento periodontal ($p<0,005$) e não houve diferença entre os grupos. Apenas o fluxo salivar foi significativamente menor para os indivíduos SD ($p<0,001$). Com relação aos antioxidantes, a GPx e a CAT não apresentaram diferença significativa entre os grupos, enquanto a SOD apresentou menores valores médios estatisticamente significantes no grupo SD ($p<0,007$). O tratamento não promoveu alteração significativa nos valores iniciais tanto da SOD como da GPx e CAT. Com relação ao MDA não houve diferença entre os grupos e períodos. Para TAOC houve efeito significativo apenas do grupo, com menores valores para o grupo SD ($p=0,028$). Não houve nenhuma evidência de correlação significativa entre antioxidantes/oxidantes e parâmetros clínicos. Pode-se concluir, que (1) o tratamento periodontal não cirúrgico, embora tenha promovido uma melhora nos parâmetros clínicos, não exerceu influência significativa sobre as condições do sistema de defesa antioxidante e produtos do estresse oxidativo em indivíduos com SD e não sindrômicos e, (2) não foi comprovado a relação deste sistema com a maior incidência de doença periodontal em indivíduos SD.

Palavras-chave: Periodontite; Síndrome de Down; Saliva.

ABSTRACT

Rodrigues TO. Antioxidant capacity of saliva from individuals with Down Syndrome in the presence of periodontal disease [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Periodontal problems affect about 100% of individuals with Down syndrome (DS) at 30 years of age. The hypothesis that the reduction of negative regulation of oxidative metabolism in patients with DS may exacerbate the inflammatory response causing increased severity of periodontal disease (PD) stimulated the development of this study. It aimed of quantifying the antioxidant activity, the level of a biomarker of oxidative stress and analyzing clinical parameters relating to PD. For this, 28 individuals with PD were selected, including 18 with DS and 10 non-syndromic (control), which underwent a periodontal examination and had saliva collected before and 45 days after the non-surgical periodontal therapy. Total saliva was collected in the morning after fasting for 2 hours, using a portable vacuum sucking, and stored in a freezer at -80 °C until the time of analysis. In the first study, we evaluated the activity of antioxidants: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT). For SOD and GPx colorimetric kits were used and CAT was determined by decomposition of hydrogen peroxide. The results were obtained by spectrophotometry at wavelengths of 550 nm, 340 nm and 240 nm, respectively. In the second study, we assessed the damage caused by oxidative stress through its main product, malondialdehyde (MDA) and by total antioxidant capacity (TAOC) in saliva. The level of MDA was based on the reaction of trichloroacetic acid (TCA), butilhidroxitoluol (BHT) and thiobarbituric acid (TBAR). Analysis of TAOC was made by colorimetry. The results were obtained by

spectrophotometry in the lengths of 535 nm and 660 nm, for TAOC and MDA respectively. Data, depending on the normality or not, were evaluated by ANOVA / Mann-Whitney, complemented by Tukey / Wilcoxon tests ($\alpha = 0.05$). There was an improvement in the clinical conditions after periodontal therapy ($p < 0.005$) and there was no difference between groups. Only salivary flow was significantly lower for DS individuals ($p < 0.001$). Regarding to antioxidants, GPx and CAT showed no significant difference between the groups, while SOD showed statistically significant lower mean values in DS group ($p < 0.007$). Periodontal non-surgical therapy did not cause significant changes in SOD, GPx and CAT activity. In relation to MDA, there was no difference between groups and periods. For TAOC, there was a significant effect only for group, with lower values for DS group ($p = 0.028$). There was no evidence of a significant correlation between antioxidants or oxidants and clinical parameters. Based on the results of this study, it can be concluded that (1) non-surgical periodontal therapy, despite having promoted an improvement in clinical parameters did not exert significant influence on the antioxidant defense system or on the products of oxidative stress in individuals with Down syndrome and in non-syndromic, and (2) it was not proven the relationship of the antioxidant system with the highest incidence of periodontal disease in individuals with DS.

Keywords: Periodontitis; Down syndrome; Saliva; Oxidative Stress.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
PROPOSIÇÃO.....	30
CAPÍTULO I.....	32
CAPÍTULO II.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXO.....	102

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em 1866, o médico John Langdon Haydon Down considerando que diferentes tipos de alterações poderiam ser classificadas de acordo com características étnico-raciais, denominou de Mongolismo, a síndrome que hoje em sua homenagem, é conhecida como Síndrome de Down (SD) (Down¹³, 1866).

Entretanto, sua etiologia foi descoberta simultaneamente apenas em 1959, por Jerome Lejeune em Paris, e por Patricia Jacobs na Escócia (Jacobs et al.²⁰, 1959; Lejeune et al.²⁵, 1959). Determinada pela presença de um cromossomo 21 extra, a SD pode apresentar-se de três maneiras: trissomia simples, translocação Robertsoniana e Mosaico.

A trissomia simples é o mecanismo genético mais frequente (95% dos casos). Ocorre devido a não disjunção cromossômica durante a primeira ou a segunda divisão meiótica e, em 80% dos casos, a origem do material cromossômico adicional é materna, por conta da idade avançada (Polani³², 1964).

A SD por Translocação Robertsoniana, ocorre por um rearranjo geralmente entre os cromossomos acrocêntricos 21 e 14 ou 15, e representa 3% dos casos. O indivíduo possui 46 cromossomos, porém um cromossomo 14/15 normal e outro estruturalmente anormal, tendo em seu braço curto o acréscimo do braço longo do cromossomo 21 translocado através de quebras na região centromérica (Polani³², 1964).

Já, na forma de Mosaico, acomete 2% dos indivíduos portadores da síndrome, e estes apresentam algumas células normais e outras com Trissomia do cromossomo 21. Ocorre devido a uma divisão celular anormal após a fertilização e determina menores anomalias físicas e menor comprometimento da capacidade intelectual (Polani³², 1964).

O cromossomo 21 é o menor dos autossomos contendo 225 genes, menos de 1% do genoma humano, o que explica o fato desta trissomia ser compatível com a vida (Hattori et al.¹⁹, 2000). A superexpressão de alguns dos genes localizados neste cromossomo determina as características fenotípicas destes indivíduos (Korenberg et al.²⁴, 1990). Entre as características clínicas, destacam-se a baixa estatura, mãos e pés pequenos e largos, prega única palmar (linha simiesca 40%) e quinto dedo encurvado (clinodactilia) (Desai¹¹, 1997; Korenberg et al.²³, 1994). Na face apresentam fissura palpebral oblíqua, prega epicântica larga, nariz curto e com ponte nasal ampla e achatada, pescoço largo (Desai¹¹, 1997). Na cavidade bucal pode-se observar a maxila menor quando comparada com a mandíbula, atraso na irrupção da dentição decídua e permanente, agenesias, palato ogival, língua fissurada e macroglossia, baixa incidência de cárie e alta prevalência da doença periodontal (Desai¹¹, 1997; Reuland-Bosma, van Dijk³⁴, 1986).

A baixa incidência de cárie em indivíduos com SD pode estar relacionada com o pH salivar elevado e reduzida quantidade de *Streptococcus mutans* na cavidade oral (Stabholz et al.⁴⁰, 1991). Problemas periodontais, como gengivite e periodontite severas afetam, na faixa dos 30 anos, 100% dos indivíduos síndrômicos (Reuland-Bosma, van Dijk³⁴, 1986). Embora a doença periodontal tenha como fator etiológico local a placa bacteriana e, indivíduos com SD, frequentemente apresentam higiene oral precária devido ao seu comprometimento intelectual, a maior severidade da doença periodontal (DP) nestes indivíduos, segundo Saxén et al.³⁶ (1977) não está associada apenas a este fator. Comparando indivíduos SD com indivíduos não síndrômicos, que apresentavam deficiência mental, com idade e higiene bucal semelhantes, observaram maior prevalência e severidade da DP nos indivíduos com SD. Assim, concluíram que a resposta imune deficiente nesses

indivíduos contribui de forma significativa para a maior severidade da doença periodontal.

Segundo Amano et al.³ (2000), a cavidade oral de indivíduos com SD é precocemente colonizada por vários periodontopatógenos, sendo nove de dez espécies detectadas em placa subgengival de crianças síndrômicas entre 2 e 4 anos de idade. Aos dois anos, já estavam presentes bactérias importantes na periodontite do adulto, como: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. A ocorrência de todas as espécies bacterianas aumentou gradualmente com a idade (até 13 anos), e sempre manteve uma prevalência significativamente maior no grupo SD comparado com crianças não síndrômicas.

Algumas alterações no sistema imune de indivíduos SD como: neutrófilos e monócitos apresentando suas funções de quimiotaxia e fagocitose diminuídas (Sreedevi, Munshi³⁹, 1998) podem contribuir para a progressão desta condição periodontal, quando comparados com indivíduos normais ou com deficiência mental semelhante (Barr-Agholme et al.⁵, 1998).

Sabe-se que indivíduos com SD apresentam também alterações no sistema de defesa antioxidante e esta condição apresenta relação com algumas patologias conhecidas nesta síndrome: catarata, mal de Alzheimer, diabetes e envelhecimento precoce (Liu et al.²⁶, 2003). E, mais recentemente, tem sido relacionada com a doença periodontal (Camera et al.⁷, 2007; Chapple, Matthews⁹, 2007; Waddington et al.⁴⁴, 2000).

A presença de bactérias no tecido gengival estimula o sistema imune a liberar mediadores inflamatórios que vão atrair os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Diab-Ladki et al.¹², 2003; Forrester, Merz¹⁵, 2002). A interação hospedeiro e micro-organismos patogênicos desencadeia processos bioquímicos e fisiológicos,

que induzem os PMNs a aumentarem o consumo de oxigênio, o que leva a um aumento na produção de radicais livres (superóxido, peróxido de hidrogênio e íons hidroxila) (Canakci et al.⁸, 2009).

Em condições fisiológicas estes radicais livres causam um dano oxidativo na estrutura da membrana celular das bactérias, levando-as à morte (Battino et al.⁶ 1999). Para que mantenha-se uma homeostase, entra em ação o sistema de defesa antioxidante, constituído por uma parte enzimática representada pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Michiels et al.²⁷, 1994), e uma não enzimática: ácido úrico, ácido ascórbico e glutathione (GSH) (Nogueira et al.²⁹, 2005; Waddington et al.⁴⁴, 2000).

A SOD é a principal enzima capaz de metabolizar espécies reativas de oxigênio (EROs) e responsável pela conversão do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é altamente citotóxico (Garcez et al.¹⁶, 2005). Esta apresenta-se em três isoformas: Cu/ZnSOD (no citoplasma - SOD-1), MnSOD (na mitocôndria - SOD-2) e EC-SOD (no líquido extracelular - SOD-3), sendo a última de pouca relevância biológica por apresentar atividade extremamente baixa (Halliwell, Gutteridge¹⁸, 1990; Waddington et al.⁴⁴, 2000).

O gene da SOD-1 localiza-se na região distal do braço longo do cromossomo 21, na banda cromossômica 21q22 (lê-se: braço longo do cromossomo 21 região 2, banda 2) (Hattori et al.¹⁹, 2000), então indivíduos com SD apresentam um aumento de 50% a 150% dessa enzima (Jovanovic et al.²¹, 1998; Pinto et al.³¹, 2002; Skaleric et al.³⁸, 2000).

O sistema GPx é constituído por 4 isoformas selênio dependentes: a GPx 1 encontrada no citosol de todas as células do corpo, a GPx 2 específica do trato gastrointestinal, a GPx 3 encontrada no plasma em mamíferos e a GPx 4 que atua

sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas; e uma isoforma selênio não dependente: glutathione reduzida (GSH) (Ursini et al.⁴³, 1995).

A GPx utiliza a GSH como co-fator para atuar sobre os peróxidos em geral. A GSH é o tiol redutor mais abundante do meio intracelular. Para esta enzima se manter na forma reduzida e agir como co-fator, é necessária a ação da glutathione redutase e de enzimas que mantêm os níveis de NADPH (nicotinamida adenina fosfato-oxidase) no citosol e nas mitocôndrias (Remacle et al.³³, 1992).

A catalase (CAT) é um tetrâmero de cadeias polipeptídicas, cada uma com mais de 500 aminoácidos (Chelikani et al.¹⁰, 2004). Está presente no peroxissoma, principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela degradação dos ácidos graxos de cadeia longa (Fahimi¹⁴, 1969). Sua função é reduzir o risco de formação do radical hidroxila, pois o peróxido de hidrogênio não eliminado tende a reagir com metais de transição formando tal radical que é mais reativo e lesivo (Nordberg, Arnér³⁰, 2001).

O peróxido de hidrogênio é neutralizado em oxigênio (O_2) e água (H_2O) pela glutathione peroxidase (GPx) e pela catalase (CAT) (Garcez et al.¹⁶, 2005). Porém, em indivíduos com SD, como a razão de SOD-1 para CAT e GPx é maior, o peróxido de hidrogênio pode se acumular. Consequentemente, ocorre um aumento de radicais livres, acarretando uma agressão endógena constante, que leva a danos celulares (Canakci et al.⁸, 2009; Diab-Ladki¹², 2003; Garcez et al.¹⁶, 2005; Jovanovic et al.²¹, 1998; Yasui, Baba⁴⁶, 2006).

Em indivíduos não-sindrômicos existe uma maior atividade de SOD na saliva e gengiva quando a periodontite está presente (Akalin et al.², 2005), sugerindo que seu aumento está relacionado positivamente com a inflamação (Akalin et al.²,

2005). O aumento da SOD desencadeia um estresse oxidativo, e como uma de suas consequências tem-se a peroxidação lipídica, na qual as EROs interagem com os ácidos graxos poliinsaturados ou lipoproteínas presentes nas membranas celulares, induzindo a formação de produtos como o malondialdeído (MDA) (Tsai et al.⁴², 2005; Yamaguti et al.⁴⁵, 2013).

O MDA reage com proteínas de reparo do DNA, reduzindo a capacidade de reparação (Akalin et al.², 2005; Canakci et al.⁸, 2009). Os níveis de MDA na saliva, no plasma sanguíneo e no fluido crevicular gengival (GCF) são significativamente maiores em indivíduos com periodontite crônica do que naqueles que não apresentam a doença (Akalin et al.¹, 2007; Kim et al.²², 2010; Nagler et al.²⁸, 2002). Então o MDA é um importante indicador de danos oxidativos (Akalin et al.¹, 2007), entretanto até o momento não foram encontradas pesquisas comparando os níveis de MDA em indivíduos SD e não-sindrômicos com periodontite.

Como a saliva tem em sua composição as substâncias constituintes do sistema antioxidativo e sua coleta é de fácil execução e não invasiva, torna-se interessante fazer a avaliação da atividade da SOD, da GPx, da CAT, da capacidade antioxidante total (TAOC) e do nível de MDA na saliva de indivíduos SD, pois a detecção de uma redução na regulação endógena do metabolismo oxidativo pode ser utilizada no diagnóstico precoce e monitoramento da doença periodontal e de outras condições de natureza inflamatória associadas à SD, bem como, no desenvolvimento futuro de estratégias terapêuticas baseadas na modulação do metabolismo oxidativo em pacientes com a síndrome.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO GERAL

Quantificar a atividade de componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático e o nível de um biomarcador do estresse oxidativo em indivíduos com Síndrome de Down (SD) e correlacioná-los com os parâmetros clínicos relacionados com a doença periodontal (DP).

Proposição Específica

1- Quantificar a atividade da superóxido dismutase (SOD), da glutathione peroxidase (GPx) e da catalase (CAT) na saliva de indivíduos com SD com DP, correlacionar esses dados com os parâmetros clínicos e fazer a comparação destes com indivíduos não síndrômicos com DP, antes e 45 dias após o tratamento periodontal.

2- Determinar a capacidade antioxidante total (TAOC) e o nível de malondialdeído (MDA) na saliva de indivíduos SD e não síndrômicos com DP, antes e depois do tratamento, e fazer a correlação desses dados com os parâmetros clínicos.

CAPÍTULO 1

Avaliação de componentes do sistema de defesa
antioxidante enzimático em pacientes com
Síndrome de Down. Influência do tratamento
periodontal não cirúrgico*

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

Resumo

Introdução: A alta prevalência da doença periodontal (DP) nos indivíduos com Síndrome de Down (SD) pode estar relacionada com um desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante. **Objetivo:** quantificar a atividade de componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático: superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase (GPx) e catalase (CAT), na saliva de indivíduos com SD com DP, antes e depois do tratamento periodontal, e, correlaciona-los com parâmetros clínicos: índice de placa visível (IPV), profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção (NI). **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 28 indivíduos com DP, 18 com SD e 10 não-sindrômicos (controle). Os parâmetros clínicos foram avaliados por exame periodontal. A saliva não estimulada foi coletada antes e 45 dias após o tratamento. A SOD e a GPx foram analisadas por colorimetria, em espectrofotômetro a 550 nm e 340 nm, respectivamente. A CAT foi analisada pela decomposição do peróxido de hidrogênio, a 240 nm. Os dados, dependendo da normalidade, foram avaliados pelos testes ANOVA /Mann-Whitney, complementados por Tukey /Wilcoxon ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Houve melhora nos parâmetros clínicos após o tratamento ($p<0,005$) e não houve diferença entre os grupos. A GPx e a CAT não apresentaram diferença significativa entre os grupos e períodos, enquanto a SOD apresentou menores médias no grupo SD ($p<0,007$), em ambos os períodos. Não houve correlação significativa entre antioxidantes e parâmetros clínicos. **Conclusões:** O tratamento periodontal não influenciou a atividade da defesa antioxidante, e não foi comprovado relação deste sistema com a maior incidência de doença periodontal em indivíduos SD.

Palavras-chave: Superóxido Dismutase; Glutational Peroxidase; Catalase

Introdução

Os seres vivos possuem metabolismo celular aeróbio, gerando assim radicais livres, que são responsáveis pela manutenção do equilíbrio geral e pela sinalização intracelular. Radicais livres são átomos ou moléculas que não possuem um emparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, o que confere a eles uma maior reatividade e, conseqüentemente, grande instabilidade (Betteridge⁸, 2000).

Por conta disso, tendem a realizar reações de oxido-redução, acoplando o elétron não pareado com outro presente em estruturas próximas. Quando estes radicais livres são derivados do metabolismo do oxigênio, como é o caso do superóxido (O_2^-), da hidroxila (OH^-) e do óxido nítrico (NO), são designados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Gate et al.²², 1999).

Em condições fisiológicas estas EROs são liberadas de forma contínua, como subprodutos da cadeia respiratória e também como agente bactericida nos vacúolos da fagocitose (Fialkow et al.¹⁸, 2007; Halliwell, Cross²⁶, 1994), e não causam nenhum dano às estruturas do organismo, por este possuir um sistema de defesa antioxidante, que mantém o equilíbrio dinâmico entre oxidantes e antioxidantes. Este sistema de defesa antioxidante é constituído por uma parte enzimática e uma não enzimática (Halliwell, Cross²⁶, 1994; Sculley, Langley-Evans⁴⁸, 2002).

A enzimática contém as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), presentes no meio intracelular, as quais realizam a quebra das EROs (Maxwell³⁴, 1995). Já a não enzimática é composta por ácido úrico, ácido ascórbico e glutathione (GSH), presentes no meio extracelular, que atuam sequestrando os íons metálicos (Waddington et al.⁵⁵, 2000).

A SOD apresenta-se em três isoformas: Cu/ZnSOD- presente no citoplasma (SOD-1), MnSOD - localizada na mitocôndria (SOD-2) e EC-SOD - extracelular (SOD-3) (Garcez et al.²⁰, 2005). A GPx integra o grupo das selenoproteínas, que possuem em seu sítio ativo o selênio (Se), obtido da dieta de origem vegetal (Spallholz⁵⁰, 1997). Localiza-se no citoplasma e nas mitocôndrias e utiliza a glutathione (GSH) como co-fator para atuar sobre peróxidos em geral. A principal isoenzima da SOD, a SOD-1, catalisa a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é altamente citotóxico (Garcez et al.²⁰, 2005).

Quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações (condição fisiológica), a GPx se encarrega de neutralizá-lo em O_2 e H_2O . Em situação de estresse oxidativo, a catalase (CAT) libera nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP+), que proporciona maior remoção de H_2O_2 pelo sistema glutathione redutase/peroxidase (Aebi¹, 1984).

A CAT está presente na principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela degradação dos ácidos graxos de cadeia longa, o peroxissoma (Fahimi¹⁷, 1969), sendo o seu pH ideal de atividade entre 6,8 e 7,5 (Aebi¹, 1984).

Como o gene da SOD-1 localiza-se na região distal do braço longo do cromossomo 21, na banda cromossômica 21q22 (lê-se: braço longo do cromossomo 21 região 2, banda 2) (Hattori et al.²⁸, 2000), indivíduos com SD apresentam um aumento de 50% a 150% da função da SOD-1 (Jovanovic et al.³⁰, 1998). Como a razão de SOD-1 para CAT e GPx é maior nestes indivíduos, o H_2O_2 pode se acumular, quebrando a homeostase em favor das EROs, acarretando uma agressão

endógena constante, que resulta no estresse oxidativo (Garcez et al.²⁰, 2005; Jovanovic et al.³⁰, 1998).

Esta agressão endógena atinge as macromoléculas do sistema biológico, provocando desde uma desnaturação de proteínas, com consequente inativação de enzimas, até peroxidação lipídica, comprometendo a função e a estabilidade principalmente das membranas plasmáticas celulares (Halliwell, Cross²⁶, 1994).

O estresse oxidativo tem sido relacionado com a patogênese de diversas doenças: diabetes, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, catarata, envelhecimento precoce (Castelao, Gago-Dominguez¹², 2008; Gate et al.²², 1999; Halliwell, Cross²⁶, 1994; Moriel et al.³⁶, 1999) e, mais recentemente, tem sido relacionado com a doença periodontal (Chapple, Matthews¹⁴, 2007).

Na presença de doença periodontal, as bactérias possuem a capacidade de invadir o tecido gengival e gerar um aumento da expressão de citocinas, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Forrester, Merz¹⁹, 2002). Como resposta do hospedeiro aparecem primeiramente os leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) (Diab-Ladki et al.¹⁶, 2003), que liberam uma grande quantidade de EROs, promovendo a destruição dessas bactérias (Battino et al.⁷, 1999), e, ao mesmo tempo realizam a sua fagocitose (Diab-Ladki et al.¹⁶, 2003). Entretanto, se as EROs não permanecerem dentro do vacúolo da fagocitose, provocam danos no tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar (Canakci et al.¹¹, 2009).

Assim, se não houver um equilíbrio na ação dos PMNLs, pode ocorrer uma produção exagerada de EROs, como por exemplo o O₂⁻, que parece estar diretamente envolvido com a reabsorção óssea, uma vez que sempre é detectado em zonas de reabsorção adjacentes aos osteoclastos (Canakci et al.¹¹, 2009; Diab-

Ladki et al.¹⁶, 2003). Estudos recentes mostram que as EROs podem influenciar também nas células produtoras de matriz extracelular como fibroblastos e osteoblastos, reduzindo sua produção (Canacki et al.¹⁰, 2005).

A hipótese de que o desequilíbrio entre os componentes do sistema de defesa enzimático, possa estar relacionado com a maior severidade e precocidade da doença periodontal em indivíduos com SD, e de que neles, o tratamento não tem a mesma efetividade do que em indivíduos normais, nos levou a investigar a influência do tratamento periodontal não cirúrgico na atividade dos antioxidantes salivares em indivíduos com SD quando comparados com indivíduos não síndrômicos, ambos com doença periodontal crônica.

Material e Método

1 Seleção dos voluntários

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo nº 62/11) (Anexo 1). Os grupos de estudo consistiram em 18 indivíduos com Síndrome de Down (Grupo SD) e 10 indivíduos não síndrômicos (Grupo NS – controle).

Os indivíduos com SD foram recrutados em Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) de Araraquara e região e na Associação para Síndrome de Down de São José dos Campos (ASIN); e os NS foram selecionados entre os indivíduos que procuraram atendimento nas Clínicas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP).

Para serem selecionados para o estudo, os indivíduos tiveram que obedecer os seguintes critérios de inclusão: apresentar cariótipo de trissomia simples do cromossomo 21 ou ser cromossomicamente normal, não ser

institucionalizado, apresentar idade entre 20 e 50 anos, apresentar doença periodontal crônica de leve a moderada e possuir pelo menos 20 dentes na cavidade oral. Como critérios de não inclusão foram considerados: uso de antibióticos, anti-inflamatórios, imunossupressores e de suplementos alimentares como as vitaminas B, C e E nos últimos 3 meses, história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, alteração sistêmica como *diabetes mellitus* ou alguma doença inflamatória crônica ou infecciosa, gestantes ou lactantes, fumantes e não fumantes que deixaram o hábito a menos de 5 anos e indivíduos com Síndrome de Down do tipo mosaico.

Os indivíduos selecionados com SD e seus pais, bem como, os NS foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Todos tiveram seu histórico médico avaliado e foram submetidos a um exame clínico periodontal.

2 Exame Clínico Periodontal

Os participantes desta pesquisa foram submetidos a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região com jato de ar, e uso de espelho bucal e sonda periodontal milimetrada (Sonda Milimetrada Willians – Golgran, São Paulo, Brasil) devidamente esterilizados. Este exame foi realizado por um examinador calibrado (Kappa= 0,80) e consistiu das seguintes avaliações: índice de placa visível (IPV), profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção (NI) (Ainamo, Bay², 1975; Mombelli, Lang³⁵, 1994).

O IPV foi avaliado em quatro faces de cada dente (mesial, vestibular, distal e lingual) e as análises de PS, SS e NI foram realizadas em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual. Foram considerados com DP aqueles pacientes com profundidade de sondagem (PS) $\geq 4\text{mm}$, presença de sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção (NI) $> 3\text{mm}$ em pelo menos oito sítios não adjacentes (Teles et al.⁵⁴, 2009).

Para evitar contaminação com sangue, a coleta inicial da saliva foi feita uma semana após o exame clínico periodontal.

3 Tratamento Periodontal

Todos os participantes do estudo receberam tratamento periodontal não cirúrgico compreendendo instrução de higiene oral, raspagem supra e sub- gengival e alisamento radicular, utilizando instrumentos manuais. O tratamento foi realizado em um sextante por sessão, sendo uma sessão por semana, totalizando quatro sessões, com um acréscimo de uma ou duas sessões de tratamento, na dependência da colaboração de cada paciente. Durante o tratamento, todos os participantes do estudo receberam reforço de higiene oral, semanalmente.

Após o término do tratamento periodontal, foram agendadas sessões de manutenção quinzenais, nas quais foram realizadas profilaxia com taça de borracha e pasta profilática e reforço de higiene oral.

Completados 45 dias pós-tratamento, uma nova coleta de saliva e exame periodontal foram realizados.

4 Coleta da Saliva

A saliva não estimulada foi coletada entre 9 e 11 horas da manhã para minimizar o efeito do ciclo circadiano. Os participantes da pesquisa deviam estar em jejum por um período mínimo de 2 horas, para evitar a alteração na composição salivar. Eles permaneceram confortavelmente sentados, a saliva acumulada durante os 10 segundos iniciais foi descartada e, em seguida, a saliva acumulada na região do assoalho da boca foi cuidadosamente aspirada usando uma sonda traqueal número 14 adaptada a um sugador portátil a vácuo (Aspiramax – MA520-60, NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda, São Paulo, Brasil). Esta depositava a saliva diretamente em um tubo falcon de 10 mL (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), mantido no gelo. O fluxo salivar foi determinado após coleta por 5 minutos, e, esta continuou até ser obtida cerca de 3,5 mL de saliva (quantidade suficiente para a realização de todas as análises propostas e possíveis repetições em caso de necessidade).

O pH salivar foi aferido no local da coleta, utilizando-se um pHmetro portátil digital (Qualxtron - 8010, São Paulo, Brasil). Antes de iniciar as medições de pH, o pHmetro foi devidamente calibrado com soluções padrão de pH 7,00 e 4,00.

A saliva obtida de cada voluntário foi mantida em gelo, transportada até o Laboratório de Genética da Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr/UNESP, onde foi centrifugada a 5.000 rpm (2.655 g) (Centrifuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a 4 °C por um período de 20 minutos, para separar os resíduos. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 500 µL em eppendorfs esterilizados de 1,5 mL (Eppendorf Safe-Lock - Eppendorf, Hamburg, Alemanha), e armazenada em freezer a -80 °C até a realização das análises.

5 Análise da Saliva

As análises da saliva foram realizadas no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Odontologia da USP-São Paulo, sempre em duplicata.

a) Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A função da SOD é acelerar a dismutação do radical superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2).

Nesta análise foi utilizado o kit Ransod (Modelo SD125 – Randox, Co. Antrim, UK). Este kit é composto por: Substrato Misto [Xantina 0,05 mmol/L e I.N.T. ((2,4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazólico) 0,025 mmol/L], Tampão [CAPS (ácido N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfônico) 40 mmol/L pH 10,2 e EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,94 mmol/L], Xantina Oxidase 80 U/L e Padrão (4,62 U/mL).

Este método emprega xantina-xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxidos que reagem com o I.N.T. formando o composto vermelho de formazan. A atividade da SOD é medida pelo grau de inibição desta reação (Sun et al.⁵², 1988).

Inicialmente, foram preparadas cinco diluições do padrão (4,62 U/mL, 2,31 U/mL, 1,15 U/mL, 0,57 U/mL, 0,19 U/mL) para confecção da curva padrão. Em seguida, as amostras e a curva padrão foram preparadas em uma placa de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). Em cada poço, foram pipetados 6 μ L de saliva, das diluições do padrão ou do diluente puro, e acrescentados 200 μ L do substrato misto do kit. A mistura foi agitada por um período de 1 min (Agitador Modelo 255 – Fanem, Karnataka, Índia) e colocada no leitor de Elisa (BioTek Synergy HT, Winooski, EUA). Após a leitura inicial, em cada

poço foram adicionados 30 μ L de xantina oxidase e a leitura foi repetida, desta vez por um período de 3 min. As absorbâncias inicial e final foram determinadas em comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram transformados em U/mL de saliva, tendo como base a curva padrão. A atividade da SOD foi normatizada pela proteína total, sendo expressa em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

b) Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a oxidação da Glutathione (GSH), que é realizada pelo hidroperóxido de cumeno. A atividade da GPx foi medida de acordo com Paglia, Valentine⁴² (1967). Nesta análise foi utilizado o kit Ransel (Modelo RS505 – Randox, Co. Antrim, UK), composto por: Reagente [Glutathione 4 mmol/L, Glutathione Redutase $\geq$ 0,5 U/L, NADPH (nicotinamida adenina di-nucleotideo fosfato - 0,34 mmol/L)], Tampão [Tampão Fosfato 0,05 mol/L pH 7,2 + EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 4,3 mmol/L], hidroperóxido de cumeno 0,18 mmol/L, e, Diluente.

Inicialmente, foi preparado o branco (4 μ L de água destilada + 200 μ L do reagente) e as amostras (4 μ L de saliva + 200 μ L do reagente) em cada compartimento de uma placa de 96 poços, todos em duplicata.

A mistura foi agitada por 1 minuto em agitador (Modelo 255 – Fanem, Karnataka, Índia) e foi adicionado 8 μ L de solução de hidroperóxido de cumeno (composta por 10 mL de hidroperóxido de cumeno em 10 mL de água destilada). Ao final foi realizada a leitura da absorbância no leitor de Elisa (BioTek Synergy HT, Winooski, EUA) em comprimento de onda de 340 nm.

O cálculo da atividade da GPx foi baseado na diferença entre a absorbância inicial e a final em função do tempo. Foi descontado o branco e feita a

normalização pela proteína total, sendo a atividade da enzima expressa em U/mg de proteína.

c) Atividade da Catalase (CAT)

A CAT por meio do seu centro metálico, o íon ferro (Fe^{3+}), realiza a decomposição do H_2O_2 , que em concentrações não fisiológicas causa danos no organismo. Para a determinação da atividade da CAT, foi utilizado o método de Aebi¹ (1984). Inicialmente, foi preparado o Tampão (50 mL de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) + 75 mL de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), pH 7,4) e a água oxigenada 50 volumes (56 μL H_2O_2 + 12 mL Tampão). A mistura foi feita em um becker envolto por papel alumínio para impedir o contato com a luz, que leva a degradação mais rapidamente.

Em cubetas de quartzo (Kasvi, Curitiba, Brasil) foram colocados 10 μL da amostra de saliva + 890 μL do Tampão, foi feita a proteção com *parafilm* (Pechiney, Illinois, EUA) e agitação manual. Em seguida, foram adicionados 100 μL de H_2O_2 , e novamente agitado. A absorbância foi avaliada em espectrofotômetro (Modelo DU 800 - Beckman Coulter, Brea, Canadá) com comprimento de onda de 240 nm por 5 minutos em temperatura entre 20-30 °C.

Os resultados da CAT foram obtidos em U/mg de proteína, utilizando a seguinte fórmula: $\text{CAT} = (\Delta\text{Amostra} \times \text{diluição}) / (\text{TE} \times \text{E} \times \text{proteína total em mg})$. Sendo: $\Delta\text{Amostra} = (\text{absorbância inicial} - \text{absorbância final}) / \text{tempo}$; diluição igual a 1; E (atividade da enzima que hidrolisa 1 mMol de H_2O_2 por minuto a 30°C em pH 7,0) igual a 0,071 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}/\text{U}$; e TE (Tampão) igual a 0,01 mL.

d) Proteína Total

As proteínas são os principais componentes orgânicos da saliva, pois participam como primeira linha de defesa contra micro-organismos patogênicos. O desequilíbrio na quantidade e na constituição das mesmas, pode levar a problemas bucais como cárie e doença periodontal. Para realizar esta análise foi utilizado o kit BCA Protein Assay (Thermo Fisher Pierce Biotechnology, Rockford, EUA), que possui reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹) e reagente B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m/v).

De acordo com Smith et al.⁴⁹, 1985, este kit realiza a detecção colorimétrica e quantificação da proteína total, sendo um dos mais sensíveis métodos (detecta proteínas em concentrações abaixo de 5 µg/ml). Esta detecção ocorre em duas reações. Na primeira, chamada de Reação de Biureto, tem-se a redução do Cu²⁺ para Cu¹⁺ por proteínas em meio alcalino formando um complexo azul claro. Na segunda, o ácido bicinconínico (BCA) reage com o Cu¹⁺, formando um complexo solúvel em água de cor purpura, cuja intensidade é diretamente proporcional a concentração da proteína (Olson, Markwell⁴¹, 2007; Smith et al.⁴⁹, 1985).

Em cada poço de uma placa de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) foram pipetados 25 µl do padrão ou da amostra, foi adicionado 200 µl dos reagentes A e B, sendo lentamente agitados por 30 segundos. Em seguida a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C. No final desse período, a taxa de desenvolvimento da cor fica lenta, significando final da reação. Após a placa esfriar em temperatura ambiente, a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 562 nm pelo período de 1 minuto. Para estimar a quantidade de proteína presente utilizou-se como padrão a albumina bovina sérica

(BSA), e assim, a proteína total foi expressa em mg/mL de saliva (Olson, Markwell⁴¹, 2007).

e) Metodologia Estatística

Para a análise dos dados foi adotado, preferencialmente, o procedimento de análise de variância de dois fatores: grupo (SD e NS) e período de avaliação (antes e após o tratamento), este um fator de medidas repetidas. Na presença de interação significativa entre os dois fatores, realizaram-se comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey para n desiguais. As condições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos, antes e após o tratamento, foram confirmadas, pelo menos aproximadamente, pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Neste caso, os dados experimentais foram descritos pela média e desvio padrão. Quando necessário, os dados foram transformados em logaritmos decimais para a normalização. Além disso, uma correção dos graus de liberdade foi aplicada quando ocorreu heterogeneidade de variâncias, com normalidade dos resíduos dos grupos experimentais. Quando a normalidade não pode ser provada, mesmo com a transformação, adotou-se testes não paramétricos. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre os dois grupos antes e após o tratamento, enquanto o teste de Wilcoxon para dados pareados foi aplicado, para avaliar o efeito do tratamento sobre cada grupo. Neste caso, os dados experimentais foram descritos pela mediana, mínimo e máximo. Para estudar a correlação entre as variáveis clínicas e as variáveis bioquímicas, foram empregados os coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman conforme a normalidade dos dados. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão, corrigido para 1,25% de acordo com o critério de Bonferroni nos testes não paramétricos.

Resultado

O grupo SD foi constituído de 11 homens e 7 mulheres, com idades variando de 23 a 39 anos, enquanto o grupo NS possuía 6 homens e 4 mulheres, com idades variando de 30 a 48 anos. Houve equilíbrio quanto ao gênero, já que a razão do número de homens para o de mulheres é 1,5 e 1,6, respectivamente. Entretanto, houve algum deslocamento da distribuição das idades do grupo NS para valores cerca de dez anos maiores do que do grupo SD.

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias e desvios padrão das variáveis clínicas: fluxo salivar (mL/min), pH, IPV% (índice de placa visível, em porcentagem do número de faces); SS% (sangramento à sondagem, em porcentagem do número de sítios); PS (profundidade de sondagem média, em mm) e NI (nível de inserção médio, em mm).

As análises de variância de medidas repetidas não apontaram diferenças entre médias de pH ($p>0,05$), mas quanto ao fluxo salivar houve evidência de efeito significativo somente de grupo ($p<0,001$). Neste caso, a média de SD foi menor do que a de NS, tanto antes como após o tratamento periodontal, não tendo este mostrado efeito sobre essas variáveis.

Para as variáveis SS% e PS as análises de variância demonstraram somente efeito significativo de período de avaliação ($p<0,001$), sugerindo que o tratamento diminuiu as médias dos dois grupos SD e NS, mas sem diferença entre eles tanto no início como após o tratamento. Para as variáveis IPV% e NI, houve efeito significativo da interação ($p\leq 0,005$). As comparações múltiplas de médias mostraram para NI resultado análogo aos mencionados acima, com os grupos equivalentes e o tratamento diminuindo, em média, o NI para ambos. A média de

IPV% do grupo SD foi inicialmente maior do que a média do grupo NS, ambas diminuíram após o tratamento para valores equivalentes.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas, média (desvio padrão), das características clínicas nos períodos antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico

Variável	Período	SD	NS
Fluxo salivar (mL/min)	<i>Antes</i>	0,18 (±0,12) ^a	0,36(±0,11) ^b
	<i>Após tratamento</i>	0,15 (±0,10) ^a	0,34 (±0,10) ^b
pH	<i>Antes</i>	7,15 (±0,53) ^a	7,23 (±0,39) ^a
	<i>Após tratamento</i>	7,11 (±0,55) ^a	7,37 (±0,039) ^a
Índice de Placa Visível IPV%	<i>Antes</i>	84,75 (10,61) ^c	49,13 (20,32) ^b
	<i>Após tratamento</i>	28,83 (13,90) ^a	21,48 (11,96) ^a
Sangramento Sondagem - SS%	<i>Antes</i>	36,63 (19,49) ^b	24,64 (14,12) ^b
	<i>Após tratamento</i>	11,67 (7,60) ^a	6,93 (4,60) ^a
Profundidade de Sondagem – PS (mm)	<i>Antes</i>	2,30 (0,50) ^b	2,33 (0,43) ^b
	<i>Após tratamento</i>	1,84 (0,45) ^a	1,61 (0,25) ^a
Nível de Inserção NI (mm)	<i>Antes</i>	2,30 (0,52) ^b	2,50 (0,49) ^b
	<i>Após tratamento</i>	1,90 (0,49) ^a	1,77 (0,37) ^a

Médias acompanhadas de letras iguais, para a mesma variável, não são significativamente diferentes.

Na Tabela 2 são apresentadas as estatísticas descritivas: médias e desvios padrão ou medianas, mínimos e máximos, das variáveis bioquímicas: SOD (U/mg de proteína); GPX (U/mg de proteína); CAT (U/mg de proteína) e Proteína total (mg/mL de saliva).

Tabela 2 – Estatísticas descritivas, média (desvio padrão) ou mediana (mínimo; máximo), das variáveis bioquímicas nos períodos antes e após o tratamento

Variável	Período	SD	NS
SOD	Antes	48,43 (31,41; 89,84) ^a	98,16 (76,22; 153,89) ^b
	Após	35,69 (27,42; 104,92) ^a	149,89 (62,05; 435,80) ^b
GPX	Antes	0,03 (0,00; 2,88) ^a	0,04 (0,04; 0,09) ^a
	Após	0,03 (0,02; 0,29) ^a	0,05 (-0,01; 0,13) ^a
Catalase	Antes	6,51 (1,96) ^a	5,85 (2,95) ^a
	Após	7,15 (2,26) ^a	4,60 (2,33) ^a
Proteína	Antes	1,61 (0,59) ^b	0,91 (0,16) ^a
	Após	1,93 (0,57) ^b	0,97 (0,30) ^a

Médias (ou medianas) acompanhadas de letras iguais, para a mesma variável, não são significativamente diferentes.

As análises de variância identificaram somente efeito significativo do fator principal grupo para Proteína total ($p < 0,001$). Neste caso, o grupo SD se mostrou com valores maiores dessa variável do que o grupo NS, mas o tratamento não alterou significativamente os valores iniciais. A SOD, analisada em logaritmos decimais, teve o comportamento mais complexo, com a análise de variância apontando efeito de interação ($p < 0,007$). Entretanto, as comparações múltiplas de médias mostraram valores significativamente mais elevados para o grupo NS e o tratamento não promoveu alteração significativa nos valores iniciais. A variável GPx foi avaliada por procedimentos não paramétricos e a CAT avaliada por Testes Paramétricos, não apresentaram qualquer diferença entre grupos ou efeito do tratamento.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de correlação entre as variáveis clínicas e as variáveis bioquímicas. O coeficiente de Spearman foi usado para GPX e o coeficiente de Pearson para as outras variáveis, tomando-se os valores antes da aplicação do tratamento. Não houve nenhuma evidência de correlação significativa ao nível de 5%.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre variáveis clínicas e variáveis bioquímicas antes do tratamento periodontal

Variável	SD				NS			
	IPV%	SS%	PS	NI	IPV%	SS%	PS	NI
SOD	-0,006	-0,289	-0,325	-0,301	0,587	0,084	0,472	0,428
GPX	0,012	0,017	0,129	0,081	0,285	0,430	0,370	0,382
Catalase	0,163	0,329	0,465	0,482	-0,214	-0,500	-0,329	-0,284
Proteína	0,020	0,272	0,289	0,264	-0,618	-0,363	-0,469	-0,335

Nota: nenhuma correlação significativa ao nível de 5%

Discussão

Estudos relatam uma alta prevalência de doença periodontal em indivíduos com Síndrome de Down (Amano et al.⁴, 2001; Nualart Grollmus et al.⁴⁰, 2007; Reuland-Bosma, van Dijk⁴⁶, 1986). Atribui-se este aumento, a fatores etiológicos locais como função mastigatória deficiente, alterações na anatomia dental e presença de placa bacteriana, uma vez que os indivíduos com SD, devido ao comprometimento intelectual, apresentam higiene oral precária (Reuland-Bosma, van Dijk⁴⁶, 1986).

Porém Saxén et al.⁴⁷ (1977) comparando indivíduos SD com indivíduos não sindrômicos que apresentavam deficiência mental, com idade e higiene bucal

semelhante, concluíram que a resposta imune deficiente nos indivíduos SD contribui de forma significativa para a maior severidade da doença periodontal.

A cavidade oral de indivíduos com SD é precocemente colonizada por vários periodontopatógenos, um dos agentes responsáveis por desencadear a inflamação periodontal (Amano et al.⁵, 2000). A presença destes e de seus produtos no sulco gengival estimulam a primeira linha de defesa da resposta imune, os leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que tem como função provocar a morte dessas bactérias e realizar a sua fagocitose. Porém o excesso de PMNs nos tecidos acarreta um aumento na liberação de radicais livres, que induzem ao estresse oxidativo, levando a danos no tecido periodontal (Amano et al.⁵, 2000; Pryor⁴⁴, 1986; Ram, Chinen⁴⁵, 2011).

Até onde é do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo longitudinal que investiga os efeitos da terapia periodontal não cirúrgica em indivíduos com SD, avaliando alguns componentes do sistema de defesa antioxidante na saliva, e fazendo, também, a sua relação com a condição clínica periodontal.

O sistema de defesa antioxidante é composto por vários níveis de resposta defensiva, incluindo agentes de baixo peso molecular, proteínas e enzimas (Maxwell³⁴, 1995). Como constituintes do sistema enzimático tem-se a SOD, a GPx e a CAT (Halliwell, Cross²⁶, 1994).

A SOD é o antioxidante mais significativo nos tecidos humanos, que realiza a proteção contra os efeitos deletérios das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), principalmente do superóxido, catalisando sua reação, na formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio (Akalin et al.³, 2005). No presente estudo, a atividade da SOD na saliva de indivíduos com SD com DP foi menor do que em

indivíduos NS, e para ambos os grupos não houve diferença estatisticamente significativa antes e após o tratamento.

Segundo Pryor⁴⁴ (1986) o aumento da atividade da SOD em pacientes com periodontite pode ocorrer devido ao aumento da geração de íons superóxido pelos PMNs, que são atraídos para o local da inflamação, gerando um aumento do estresse oxidativo, sendo necessário aumentar a quantidade de SOD para restabelecer o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e proteger o tecido periodontal (Sukhtankar et al.⁵¹, 2013). Assim, o aumento da SOD ocorre a medida que ocorre a progressão da inflamação (Guarnieri et al.²⁴, 1991). Este fato foi muito bem retratado por Wei et al.⁵⁶ (2010), em um estudo longitudinal com 48 indivíduos com DP e 35 controles, no qual mostraram um aumento significativo da atividade da SOD no soro, fluido crevicular gengival e saliva do grupo com DP com relação ao grupo controle ($p < 0,05$), e, após a terapia periodontal, esta atividade diminuiu significativamente em comparação com os níveis basais ($p < 0,05$). Portanto, tratada a inflamação que causa a quebra no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a atividade da SOD volta ao normal (Takane et al.⁵³, 2005), ou ainda, como foi mostrado no estudo de Kim et al.³² (2010) a atividade da SOD reduz após um mês da terapia periodontal.

No presente estudo, como os pacientes selecionados (todos com no mínimo 20 dentes presentes) apresentavam uma periodontite crônica mais localizada, com cerca de 8 sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm e nível de inserção > 3 mm (NI médio = 2,30 e 2,50 mm, e PS médio = 2,30 e 2,33 mm, nos indivíduos SD e controle, respectivamente), com sangramento a sondagem inicial médio em 36,63% dos sítios no grupo SD e 24,64% no grupo controle, não foi possível observar uma diferença significativa na atividade da SOD antes e 45 dias

após o tratamento, apesar de os parâmetros clínicos terem melhorado significativamente.

Panjamurthy et al.⁴³ (2005) avaliando 25 adultos com periodontite crônica verificaram que a atividade da SOD foi maior do que nos indivíduos com saúde periodontal. Akalin et al.³ (2005), também detectaram um aumento da SOD na gengiva inflamada de pacientes com periodontite crônica, entretanto, não observaram diferença significativa da SOD no fluido crevicular gengival destes pacientes com relação ao grupo controle. No presente estudo também não foi observada diferença estatística entre os períodos (antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico) nos dois grupos estudados (SD e controle).

Resultados semelhantes foram observados por Guarnieri et al.²⁴ (1991), que mostraram que a atividade da SOD no fluido crevicular gengival não diferiu entre indivíduos com periodontite crônica e controle, e por Marton et al.³³ (1993) que verificaram que a atividade da SOD tanto em granulomas, como em gengiva saudável foi semelhante.

Porém, no estudo de Sukhtankar et al.⁵¹ (2013) a atividade da SOD em tecido gengival de indivíduos com doença periodontal que inicialmente era significativamente maior, após o tratamento reduziu, chegando a níveis similares aos apresentados por indivíduos periodontalmente saudáveis.

Menor atividade da SOD foi observada por Baltacioglu et al.⁶ (2006), no soro e no fluido crevicular gengival de mulheres pós-menopausa com periodontite crônica quando comparadas com mulheres pré-menopausa com e sem periodontite. Uma redução na defesa antioxidante sistêmica e local sugere, segundo os autores, que a menopausa pode ser um fator de risco para periodontite. Analogamente, neste estudo, observamos que pacientes SD com doença periodontal apresentaram menor

atividade da SOD na saliva, quando comparados com indivíduos cromossomicamente normais com doença periodontal, e, essa diferença se manteve mesmo 45 dias após o tratamento periodontal. Portanto, podemos sugerir que a SD é um fator de risco para a doença periodontal.

De acordo com Canakci et al.¹¹ (2009), indivíduos com periodontite apresentaram altos níveis de malondialdeído e baixa atividade da SOD e GPx na saliva quando comparados com indivíduos controle saudáveis. Altos níveis de malondialdeído e baixa atividade antioxidante na saliva parecem refletir aumentada atividade de radicais livres durante a inflamação. No presente estudo, observou-se que indivíduos cromossomicamente normais, apresentaram menores valores médios de atividade da SOD antes do tratamento e estes níveis aumentaram, embora de forma não significativa após o tratamento, o que reflete uma adequada resposta desses indivíduos ao tratamento periodontal.

Com relação a atividade da GPx em tecido inflamado, Marton et al.³³ (1993) demonstraram que em granulomas esta era menor do que em tecido gengival saudável. Além disso, Huang et al.²⁹ (2000) estudando 23 pacientes com doença periodontal, verificaram que a atividade da GPx aumentou no fluido crevicular gengival após o tratamento periodontal. No presente estudo, para ambos os grupos a atividade da GPx mostrou-se baixa e, os valores médios não sofreram a influência do tratamento periodontal em nenhum dos grupos. Provavelmente isto tenha ocorrido porque as análises foram realizadas na saliva e os pacientes selecionados apresentavam poucos sulcos com PS > 4 mm. Quando as análises são realizadas com o fluido coletado nos sulcos doentes, existe uma maior chance de se detectar maior atividade da GPx e alterações nessa atividade com o tratamento.

Contudo, Novakovic et al.³⁹ (2014) avaliando saliva de 21 indivíduos com saúde periodontal e 42 com periodontite crônica, divididos em 2 grupos, os que receberam tratamento periodontal e os que tiveram apenas instrução de higiene oral, verificaram que o grupo que recebeu o tratamento periodontal teve um maior aumento da GPx. Este aumento, como já foi ressaltado, não ocorreu para os grupos deste estudo.

Resultados de pesquisas realizadas em cérebro de fetos com SD e em plasma e eritrócitos de indivíduos com SD mostraram baixa expressão da SOD e da GPx (Brooksbank, Balázs⁹, 1983; Gulesserian et al.²⁵, 2001; Néve et al.³⁸, 1984). Baixos valores da glutathiona reduzida (GSH) também tem sido relatados em estudos usando eritrócitos e fibroblastos de indivíduos com SD (Hamed et al.²⁷, 2011; Muchová et al.³⁷, 2001), e, segundo Chapple et al.¹³ (2002), na presença da periodontite também ocorre uma redução da GSH e da glutathiona oxidada. Tal depleção contribui para a atividade relativamente baixa da GPx nesses indivíduos, uma vez que esta usa a GSH como co-fator para atuar sobre os peróxidos em geral. Portanto, este é mais um dado que pode explicar a baixa atividade da GPx observada, neste estudo, na saliva de indivíduos com SD, tanto antes como após o tratamento periodontal não cirúrgico. Reforçando esta hipótese, Gimeno et al.²³ (2014), analisando a expressão do gene que codifica a GPx em fibroblastos de fetos com SD e controle, obteve uma baixa expressão desse gene nos fetos com SD, e consequentemente uma baixa atividade dessa enzima.

Também não houve diferença entre os grupos SD e controle com relação a expressão da catalase, tanto antes como depois do tratamento. Embora não estatisticamente significante, os valores médios de atividade da CAT se mostraram ligeiramente mais altos nos indivíduos SD. Crosti et al.¹⁵ (1989) e Kedziora et al.³¹

(1990) também não detectaram diferenças na atividade da CAT em fibroblastos e células sanguíneas de indivíduos com SD e não síndrômicos. Garlet et al.²¹ (2013), no entanto, estudando biomarcadores do sistema oxidativo no sangue de crianças e adolescentes com SD observaram que estes apresentavam uma atividade da CAT 24,7% maior do que os não síndrômicos.

Conforme pode ser observado neste estudo, embora tenhamos obtido uma melhora significativa nos parâmetros clínicos em ambos os grupos, nenhuma correlação significativa foi observada entre estes parâmetros e a atividade dos componentes do sistema antioxidante estudados (SOD, GPx e CAT). Novakovic et al.³⁹ (2014) analisaram os mesmos parâmetros clínicos, obtendo melhora significativa depois do tratamento periodontal, contudo, também não obtiveram correlação destes com a SOD e a GPx. Estes autores consideraram que os resultados obtidos podem ser justificados pelo fato de na saliva não existir uma concentração de antioxidantes suficiente que permitisse a correlação com os parâmetros clínicos periodontais.

Cabe ressaltar que, embora o presente estudo tenha fornecido algumas informações significativas, uma de suas limitações foi o tamanho da amostra, que pode ser justificado pelos rigorosos critérios de inclusão e exclusão adotados. Além disso, a falta de estudos avaliando os parâmetros clínicos e bioquímicos em pacientes com síndrome de Down com doença periodontal, antes e após o tratamento, dificultaram uma discussão mais aprofundada dos resultados obtidos. Em vista disto, outras pesquisas devem ser realizadas para melhor elucidar a relação das alterações no sistema de defesa antioxidante com a alta incidência de doença periodontal em indivíduos com Síndrome de Down.

Conclusão

O presente estudo mostrou, por meio da análise da saliva, que a SD pode ser considerada como um fator de risco para a DP, pois a SOD apresentou menor atividade nestes indivíduos com relação ao controle, e não houve diferença na atividade dos outros antioxidantes analisados entre os grupos. O tratamento periodontal não mostrou influência sobre os parâmetros analisados, e não foi estabelecida uma correlação do sistema de defesa antioxidante enzimático, com os parâmetros clínicos.

Referências*

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.
2. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25(4):229-35.
3. Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(3):238-43.
4. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol.* 2001; 72(3):368-73.

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

5. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*. 2000; 71(2):249-55.
6. Baltacioglu E, Akalin FA, Alver A, Balaban F, Unsal M, Karabulut E. Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in post-menopausal women with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33:385-92.
7. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of antioxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(4):458-76.
8. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000; 49(2):3-8.
9. Brooksbank BW, Balázs R. Superoxide dismutase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Lancet*. 1983; 1(8329):881-2.
10. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70(6):619-28.
11. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent*. 2009; 3(2):100-6.
12. Castelao JE, Gago-Dominguez M. Risk factors for cardiovascular disease in women: relationship to lipid peroxidation and oxidative stress. *Med Hypotheses*. 2008; 71(1):39-44.

13. Chapple IL, Brock G, Eftmiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Path.* 2002; 55(6):367-73.
14. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007; 43:160-232.
15. Crosti N, Bajer J, Gentile M, Resta G, Serra A. Catalase and glutathione peroxidase activity in cells with trisomy 21. *Clin Genet.* 1989; 36(2):107-16.
16. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig.* 2003; 7(2):103-7.
17. Fahimi HD. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol.* 1969; 43(2):275-88.
18. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(2):153-64.
19. Forrester MB, Merz RD. Epidemiology of Down syndrome (Trisomy 21), Hawaii, 1986-97. *Teratology.* 2002; 65(5):207-12.
20. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(12):1607-11.
21. Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM, Dalmarco JB, Wilhelm Filho D. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci.* 2013; 93(16):558-63.

22. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53(4):169-80.
23. Gimeno A, Garcia-Gimenez JL, Audi L, Toran N, Andaluz P, Dasi F, et al. Decreased cell proliferation and higher oxidative stress in fibroblasts from Down Syndrome fetuses. Preliminary study. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(1):116-25.
24. Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhanced superoxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun.* 1991; 15(1):11-6.
25. Gulesserian T, Engidawork E, Fountoulakis M, Lubec G. Antioxidant proteins in fetal brain: superoxide dismutase-1 (SOD-1) protein is not overexpressed in fetal Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 2001; 61:71-84.
26. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994; 102(10):5-12.
27. Hamed RR, Maharem TM, Abdel-Meguid N, Sabry GM, Abdalla AM, Guneidy RA. Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: a comparative study. *Res Dev Disabil.* 2011; 32(5):1470-82.
28. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. Chromosome m, sequencing c. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 2000; 405(6784):311-9.

29. Huang P, Su T, Wang H. [The relationship between GPx activity in gingival fluid and clinical parameters of adult periodontitis]. *W C J Stomatol.* 2000; 18(2):106-8.
30. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(9):1044-8.
31. Kedziora J, Blaszczyk J, Sibinska E, Bartosz G. Down's syndrome: increased enzymatic antioxidative defense is accompanied by decreased superoxide anion generation in blood. *Hereditas.* 1990; 113(1):73-5.
32. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40(4):164-71.
33. Marton IJ, Balla G, Hegedus C, Redi P, Szilagyi Z, Karmazsin L, et al. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(4):254-7.
34. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 1995; 49(3):345-61.
35. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000.* 1994; 4:81-6.
36. Moriel P, Okawabata FS, Abdalla DS. Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclerosis progression. *IUBMB Life.* 1999; 48(4):413-7.

37. Muchova J, Sustrova M, Garaiova I, Liptakova A, Blazicek P, Kvasnicka P, et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(4):499-508.
38. Neve J, Vertongen F, Cauchie P, Gnat D, Molle L. Selenium and glutathione peroxidase in plasma and erythrocytes of Down's syndrome (trisomy 21) patients. *J Ment Defic Res*. 1984; 28(4):261-8.
39. Novakovic N, Todorovic T, Rakic M, Milinkovic I, Dozic I, Jankovic S, et al. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J Periodontal Res*. 2014; 49(1): 129-36.
40. Nualart Grollmus ZC, Morales Chavez MC, Silvestre Donat FJ. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12(3):211-5.
41. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci*. 2007; 48:1-29.
42. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967; 70(1):158-69.
43. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*. 2005; 10(2) 255-64.
44. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol*. 1986; 48:657-67.

45. Ram G, Chinen J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2011; 164(1):9-16.
46. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(1):64-73.
47. Saxén L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome: an orthopantomographic evaluation. *J Periodontol*. 1977; 48(6):337-40.
48. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61(1):137-43.
49. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985; 150(1):76-85.
50. Spallholz, JE. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci*. 1997; 10(2-3):260-70.
51. Sukhtankar L, Kulloli A, Kathariya R, Shetty S. Effect of non-surgical periodontal therapy on superoxide dismutase levels in gingival tissues of chronic periodontitis patients: a clinical and spectrophotometric analysis. *Dis. Markers*. 2013; 34:305-11.
52. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34(3):497-500.
53. Takane M, Sugano N, Ezawa T, Uchiyama T, Ito K. A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis. *J Oral Sci*. 2005; 47(1):53-7.

54. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res.* 2009; 44(3):411-7.
55. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases.* 2000; 6(3):138-51.
56. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010; 55(1):70-8.

CAPÍTULO 2

Avaliação da capacidade antioxidante total e de um biomarcador do estresse oxidativo em pacientes com Síndrome de Down com doença periodontal.*

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

Resumo

Introdução: O excesso de radicais livres no organismo pode levar ao estresse oxidativo, que tem como resultado a peroxidação lipídica, cujo principal produto é o malondialdeído (MDA). **Objetivo:** analisar a capacidade antioxidante total (TAOC) e o nível de MDA na saliva, e correlacionar estes com a condição clínica periodontal. **Materiais e Métodos:** foram selecionados 18 indivíduos com Síndrome de Down (SD) e 10 não sindrômicos (controle), com doença periodontal (DP). Estes foram submetidos a um exame clínico e receberam tratamento periodontal não cirúrgico. A saliva não estimulada foi coletada antes e 45 depois do tratamento periodontal, de manhã e após jejum de 2 horas. A avaliação da TAOC foi feita por colorimetria a 660 nm, e o nível de MDA foi baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico, cujo produto é detectado a 535 nm. Os dados foram analisados por ANOVA complementada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** O tratamento promoveu uma melhora significativa nos parâmetros clínicos e não houve diferença entre os grupos. Com relação ao MDA não houve diferença entre os grupos e os períodos. Para TAOC houve efeito significativo apenas do grupo ($p=0,028$) com menores valores dessa variável para o grupo SD. Não houve correlação significativa entre TAOC e MDA com os parâmetros clínicos. **Conclusões:** Pode-se concluir, que o tratamento periodontal não cirúrgico, embora tenha promovido uma melhora nos parâmetros clínicos, não exerceu influência significativa sobre os produtos do estresse oxidativo em indivíduos com síndrome de Down e não sindrômicos.

Palavras-chave: Malondialdeído, Estresse Oxidativo, Saliva

Introdução

A síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético compatível com a vida, causado pela triplicação de um cromossomo autossômico, que resulta na Trissomia do Cromossomo 21 (Mrak, Griffin²⁷, 2004). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO⁴⁷, 2007) um em cada 1.100-1.200 nascidos vivos apresentam este distúrbio. A presença extra de um cromossomo 21 determina alterações nas características fenotípicas e fisiológicas (Ribeiro et al.³⁴, 2003; Shichiri et al.³⁸, 2011).

Os indivíduos sindrômicos apresentam déficit de aprendizado e memória, envelhecimento precoce, maior tendência a doença de Alzheimer e maior incidência de doença periodontal (Ribeiro et al.³⁴, 2003; Shichiri et al.³⁸, 2011). A inflamação gengival tem início precoce e a periodontite apresenta-se com progressão rápida e generalizada, afetando de 30-40% dos adolescentes e 100% dos indivíduos aos 30 anos de idade (Bagic et al.⁴, 2003; Reuland-Bosma, van Dijk³³, 1986).

A periodontite acomete os tecidos de suporte (gengiva) e de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso) dos dentes. Como principal fator etiológico tem-se a placa bacteriana, composta por bactérias anaeróbias gram-negativas ou facultativas, que colonizam a região da margem gengival por meio de interações específicas, levando à formação da bolsa periodontal (Kornman²⁴, 2008).

O sulco gengival clinicamente sadio possui leucócitos polimorfonucleares (PMN), porém sua quantidade aumenta com o desenvolvimento da periodontite. Isto ocorre devido a um desequilíbrio entre a colonização bacteriana e o sistema de defesa imune, onde a liberação de mediadores pró-inflamatórios atrai mais PMN dos vasos sanguíneos para o tecido conjuntivo gengival. Estes, por meio de interações com os micro-organismos patogênicos, geram radicais livres como: superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio (Battino et al.⁶, 1999; Kantarci et al.²⁰, 2003).

Os radicais livres, presentes em baixas concentrações, são neutralizados pelos antioxidantes, que possuem a função de retardar ou inibir a oxidação do substrato oxidável (Fialkow et al.¹⁴, 2007). Como constituintes do sistema de defesa antioxidante enzimático na saliva temos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Brock et al.⁸, 2004; Sculley, Langley-Evans³⁷, 2002).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio dinâmico entre os radicais livres e a capacidade de defesa antioxidante, como o que acontece no caso da própria fagocitose, da regulação da pressão sanguínea e da sinalização intracelular. Um exemplo de via de sinalização redox-sensível é a indução da expressão gênica pelo Fator nuclear κ - β (NF- κ β), iniciada por oxidantes que ativam a transcrição de genes, os quais liberam citocinas importantes na patogênese da doença periodontal (ativa os fagócitos) e controlada pela liberação de antioxidantes (Honda et al.¹⁹, 2006). Porém em indivíduos com SD a SOD-1 (principal isoenzima da SOD) está superexpressa determinando um aumento na produção de radicais livres, o que desencadeia um estresse oxidativo (Skaleric et al.⁴⁰, 2000).

Os radicais livres em excesso podem atuar em biomoléculas, carboidratos, lipídios, proteínas e DNA provocando danos e até a morte celular (Orrenius et al.³¹, 1989). No DNA, os radicais hidroxila realizam a quebra das ligações cruzadas entre as fitas, o que altera suas bases. Um acúmulo de lesões pode levar a consequências relacionadas a mutagêneses, carcinogênese e até apoptose celular (Morel et al.³⁰, 2001).

Nos carboidratos a hidroxila remove um átomo de hidrogênio do composto levando a quebra das cadeias glicídicas, desencadeando a perda de contato celular, e, assim, o desenvolvimento de divisões celulares ilimitadas; interferindo diretamente

nas reações que geram energia (ATP) para o Ciclo de Krebs e a Cadeia respiratória (Wiseman, Halliwell⁴⁸, 1996). As proteínas contêm muitos sítios reativos, e em contato com os radicais livres ocorre a formação de compostos carbonilados, os quais quando apresentam um sítio de ligação com metais, produzem sinais para atrair proteases celulares que realizam sua degradação (Barreiros et al.⁵, 2006).

Em busca de estabilidade, a hidroxila reage com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas e organelas celulares, removendo uma molécula de hidrogênio do grupo metileno (-CH₂-), e gerando radicais lipídicos (Sies, Cadenas³⁹, 1985). Estes realizam a etapa de propagação, por meio da reação com a molécula de O₂, que origina outros radicais neutralizados por antioxidantes ou por ligações entre eles (Richter³⁵, 1987).

Esta reação em cadeia é conhecida como peroxidação lipídica e tem como consequências: alterações na fluidez e permeabilidade das membranas, expansão do líquido intracelular que pode levar a ruptura e morte celular (Sies, Cadenas³⁹, 1985).

O aumento da permeabilidade da membrana plasmática acarreta um influxo de Ca²⁺ e outros íons e subsequente tumefação celular. O excesso de Ca²⁺ no interior da mitocôndria pode desencadear lesão no DNA e até apoptose. Além disso, como efeitos desta reação, tem-se a vasodilatação e reabsorção do osso (Orrenius et al.³¹, 1989).

Como a peroxidação lipídica é um dos resultados do estresse oxidativo e a principal fonte de malondialdeído (MDA), este tem sido usado como biomarcador para acompanhar este processo (Del Rio et al.¹¹, 2005; Yamaguti et al.⁵⁰, 2013). Estudos apontam uma quantidade significativamente maior de MDA em pacientes

com periodontite, associado a níveis de antioxidantes totais diminuídos em pacientes com periodontite crônica (Diab- Ladki et al.¹², 2003; Liksman et al.²⁵, 2007).

No entanto, até o momento não foram encontrados estudos sobre o nível de MDA e a capacidade antioxidante total em saliva de indivíduos com SD com DP, antes e após o tratamento. Assim, o presente estudo objetivou analisar tais parâmetros em saliva, por esta ser um fluido de fácil coleta e conter biomarcadores de origem local e sistêmica, e fazer uma correlação destes com a condição clínica periodontal.

Material e Método

-Seleção dos voluntários

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo nº 62/11) (Anexo 1), foram recrutados indivíduos com Síndrome de Down, em Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) de Araraquara e região e na Associação para Síndrome de Down de São José dos Campos (ASIN); e indivíduos não sindrômicos (controle) nas Clínicas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP).

Para participar do estudo, os indivíduos tiveram que obedecer os seguintes critérios de inclusão: apresentar cariótipo de trissomia simples do cromossomo 21 ou ser cromossomicamente normal, não ser institucionalizado, apresentar idade entre 20 e 50 anos, apresentar doença periodontal crônica de leve a moderada e possuir pelo menos 20 dentes na cavidade oral. Os critérios de exclusão foram: uso de antibióticos, anti-inflamatórios, imunossupressores e de suplementos alimentares como as vitaminas B, C e E nos últimos 3 meses, história

de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, alteração sistêmica como *diabetes mellitus* ou alguma doença inflamatória crônica ou infecciosa, gestantes ou lactantes, fumantes e não fumantes que deixaram o hábito a menos de 5 anos e indivíduos com Síndrome de Down do tipo mosaico.

Foram selecionados 28 indivíduos, sendo 18 com Síndrome de Down (Grupo SD) e 10 não sindrômicos (Grupo NS – controle), os quais foram informados sobre os objetivos da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Estes foram submetidos a um exame periodontal detalhado, realizado por um examinador calibrado ($Kappa=0,80$), que consistiu das seguintes avaliações: índice de placa visível (IPV) (Ainamo, Bay¹, 1975), profundidade de sondagem (PS) (Mombelli, Lang²⁹, 1994), sangramento à sondagem (SS) (Ainamo, Bay¹, 1975) e nível de inserção (NI) (Mombelli, Lang²⁹, 1994).

As análises de PS, SS e NI foram realizadas em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual. Foram considerados com doença periodontal aqueles indivíduos com profundidade de sondagem (PS) ≥ 4 mm e nível de inserção (NI) > 3 mm em pelo menos 8 sítios não adjacentes, e, presença de sangramento à sondagem (SS) (Teles et al.⁴³, 2009).

Para evitar contaminação com sangue, a coleta inicial da saliva, foi feita uma semana após o exame clínico periodontal.

Em seguida, todos os participantes do estudo receberam tratamento periodontal não cirúrgico compreendendo instrução de higiene oral, raspagem supra e sub-gengival e alisamento radicular. O tratamento foi realizado em quatro a seis sessões, sendo uma por semana, e utilizando apenas instrumentos manuais.

Posteriormente, foi realizada profilaxia e reforço das instruções de higiene oral quinzenalmente até completar 45 dias pós-tratamento, quando uma nova coleta de saliva e exame periodontal foram realizados.

- Coleta da Saliva

A saliva não estimulada foi coletada entre 9 e 11 horas da manhã, após um jejum mínimo de 2 horas, para evitar a alteração na composição salivar. Durante o período da coleta, os voluntários permaneceram confortavelmente sentados e a saliva acumulada na região do assoalho da boca foi coletada com o auxílio de um aspirador portátil (Aspiramax – Modelo MA520-60 - NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda, São Paulo, Brasil), sendo depositada diretamente em um tubo falcon de 10 mL (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), mantido no gelo.

A coleta foi realizada, até ser obtida quantidade suficiente de saliva para a realização de todas as análises propostas (cerca de 3,5 mL). O fluxo salivar foi determinado após coleta por 5 minutos.

O pH salivar foi aferido utilizando-se um pHmetro portátil digital (Qualxtron Modelo 8010, São Paulo – Brasil) previamente calibrado com soluções padrão de pH nos valores de 7,00 e 4,00, no local da coleta.

Em seguida, em laboratório a saliva foi centrifugada a 2.655 g (5.000 rpm) (Centrifuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a 4 °C por um período de 20 minutos, e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 500 µL em eppendorfs esterilizados de 1,5 mL (Eppendorf Safe-Lock - Eppendorf, Hamburg, Alemanha), as quais foram armazenadas em freezer a -80 °C até realização das análises.

- Capacidade Antioxidante Total da Saliva (TAOC)

A avaliação da Capacidade Antioxidante Total foi realizada usando o kit TAS (Modelo NX2332 – Randox, Co. Antrim - UK). Este método é baseado no clareamento da cor característica azul-esverdeada do radical cationico mais estável, o ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothia-zoline-6-sulfonic acid)], pelos antioxidantes presentes. (Miller et al.²⁸, 1993)

A análise foi feita em duplicata, utilizando placas de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). Inicialmente foram preparados o branco (4 µL de água ultra-pura + 200 µL do cromógeno), o padrão (4 µL do padrão + 200 µL do cromógeno) e amostra (4 µL de saliva + 200 µL do cromógeno).

A mistura foi agitada por 1 minuto em um agitador (Modelo 255 – Fanem, Karnataka, Índia) e sua absorbância foi determinada no leitor de Elisa (BioTek Synergy HT, Winooski - EUA) num comprimento de onda de 660 nm. Após isto, foi adicionado à mistura 400 µl do substrato sendo novamente agitado por 1 minuto e a leitura final foi realizada após 3 minutos.

O resultado da TAOC foi obtido em mmol/L de saliva, utilizando a seguinte fórmula: $TAOC = Fator \times (\Delta Branco - \Delta Amostra)$, sendo: $\Delta Amostra = (Absorbância\ final - Absorbância\ inicial) / Tempo$ e, $Fator = Concentração\ do\ Padrão / (\Delta Branco - \Delta Padrão)$. Este resultado foi normalizado pela proteína total, sendo a TAOC expressa em Nmole/mg de proteína.

- Nível de Malondialdeído (MDA)

Os aldeídos são produzidos no processo de peroxidação lipídica, sendo o MDA um dos mais abundantes. O nível de MDA foi avaliado pelo método utilizado

por Esterbauer, Cheeseman¹³ (1990). Este método se baseia na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico que produz um complexo que pode ser detectado espectrofotometricamente. Foram misturados em eppendorf de 1,5 mL: 500 µL de saliva + 500 µL de TCA 20% (solução de ácido tricloroacético 20% em HCl 0,25M) + 50 µL de BHT 4% (solução de hidroxibutil-tolueno 4% em etanol).

Após agitação manual os eppendorfs foram mantidos em gelo por 30 minutos e centrifugados a 5.000 g (8.000 rpm) por 2 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf de 1,5 mL e misturado com TBARS 0,7% (solução de ácido tiobarbitúrico 0,7% em HCl 0,25M) em volumes iguais. Em seguida, a mistura foi aquecida a 95 °C em banho-maria (Modelo 255 – Fanem, Karnataka, Índia) por 45 min, resfriada em temperatura ambiente, colocada em cubetas de poliestireno de 1,5 mL (Hach, Colorado, EUA) e sua absorbância foi determinada em comprimento de onda de 535 nm.

As análises foram feitas em duplicata e os valores de absorbância obtidos foram transformados usando a seguinte fórmula: $C = (\text{Absorbância} \times \text{Peso Molecular MDA}) / (b \cdot e)$; onde: b (comprimento de leitura) = 1 cm, e (Coeficiente de extinção molar) = $153 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sendo o resultado obtido em µg/L e posteriormente normalizado pela proteína total, sendo expresso em mmol/mg de proteína.

- Metodologia Estatística

Os dados referentes a idade dos pacientes tiveram uma distribuição normal, e foram submetidos ao teste t de Student de comparação de médias para analisar as diferenças entre os grupos. Para a variável gênero foi aplicado o teste Qui-quadrado.

Para a comparação das demais variáveis estudadas, foi aplicado o teste de análise de variância de dois fatores: grupo (SD e NS) e período de avaliação (antes e após o tratamento), sendo o último considerado um fator de medidas repetidas. Na presença de interação significativa entre os dois fatores, foram feitas comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey para “n” desiguais. As condições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos, antes e após o tratamento, foram confirmadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando necessário, o procedimento foi aplicado sobre os dados transformados em logaritmos decimais para sua normalização. Para estudar a correlação entre as variáveis clínicas e as variáveis bioquímicas, foram empregados os coeficientes de correlação de Pearson. O nível de significância de 5% foi adotado para a tomada de decisão.

Resultado

As características demográficas estão apresentadas na Tabela 1. O grupo NS (controle) mostrou idade média superior ao grupo SD ($p < 0,001$). Em relação ao gênero, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Na Tabela 1 são mostradas, também, as médias e desvios padrão das variáveis clínicas: pH, fluxo salivar (mL/min), IPV (em % do número de faces); SS (em % do número de sítios); PS (mm) e NI (mm), antes e após o tratamento periodontal. As análises de variância de medidas repetidas não apontaram diferenças entre médias de pH da saliva ($p > 0,05$), mas quanto ao fluxo salivar houve evidência de efeito significativo somente de grupo ($p < 0,001$). Neste caso, a média do grupo SD foi menor do que a do grupo NS, tanto no início como 45 dias após o tratamento.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas, média (desvio padrão), das variáveis demográficas e clínicas nos períodos antes e 45 dias após o tratamento

Variável	Período	SD		NS	
Idade (anos)	-	30 (5)	a	42 (6)	b
Gênero (M/F)%	-	61/39	a	60/40	a
Fluxo Salivar (mL/min)	Antes	0,18 (0,12)	a	0,36 (0,11)	b
	Após	0,15 (0,10)	a	0,34 (0,10)	b
pH	Antes	7,15 (0,53)	a	7,23 (0,39)	a
	Após	7,11 (0,55)	a	7,37 (0,39)	a
IPV%	Antes	84,75 (10,61)	c	49,13 (20,32)	b
	Após	28,83 (13,90)	a	21,48 (11,96)	a
SS%	Antes	36,63 (19,49)	b	24,64 (14,12)	b
	Após	11,67 (7,60)	a	6,93 (4,60)	a
PS	Antes	2,30 (0,50)	b	2,33 (0,43)	b
	Após	1,84 (0,45)	a	1,61 (0,25)	a
NI	Antes	2,30 (0,52)	b	2,50 (0,49)	b
	Após	1,90 (0,49)	a	1,77 (0,37)	a

Médias acompanhadas de letras iguais, para a mesma variável, não são significativamente diferentes.

As análises de variância demonstraram para as variáveis SS% e PS somente efeito significativo de período de avaliação ($p < 0,001$), sugerindo que o tratamento diminuiu as médias dos dois grupos SD e NS, mas sem diferença entre eles tanto antes como após o tratamento. Para as variáveis IPV% e NI, houve efeito significativo da interação ($p \leq 0,005$). As comparações múltiplas de médias mostraram para NI resultado análogo aos mencionados acima, com os grupos equivalentes e o tratamento diminuindo, em média, o NI para ambos. A média de IPV% do grupo SD foi inicialmente maior do que a média do grupo NS, com ambas diminuindo após o tratamento para valores equivalentes.

Na Tabela 2 são apresentadas as estatísticas descritivas: medianas, mínimos e máximos e médias e desvios padrão, das variáveis bioquímicas: MDA (mmol/mg de proteína) e TAOC (Nmol/mg de proteína), respectivamente.

As análises de variância não apontaram diferenças entre os grupos e períodos para o MDA ($p>0,05$). Identificaram somente efeito significativo do fator principal grupo para TAOC ($p=0,028$). Neste caso, o grupo SD se mostrou com valores menores dessa variável do que o grupo NS, mas o tratamento não alterou significativamente os valores iniciais.

Tabela 2 – Estatísticas descritivas, média (desvio padrão) ou mediana (mínimo; máximo), das variáveis bioquímicas nos períodos antes e 45 dias após o tratamento

Variável	Período	SD	NS
MDA (mmol/mg)	Antes	1,16 (0,19; 6,4) ^a	0.86 (0,50; 3,75) ^a
	Após	1,20 (0,4; 9,6) ^a	1,15 (0,06; 2,63) ^a
TAOC (Nmol/mg)	Antes	1,39 (0,32) ^a	1,52 (0,60) ^b
	Após	1,25 (0,26) ^a	1,76 (0,47) ^b

Médias acompanhadas de letras iguais, para a mesma variável, não são significativamente diferentes

Na Tabela 3 são dados os coeficientes de correlação entre as variáveis clínicas e as variáveis bioquímicas. O coeficiente de Pearson foi usado para as todas as variáveis, tomando-se os valores antes da aplicação do tratamento. Não houve nenhuma evidência de correlação significativa ao nível de 5%.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre variáveis clínicas e variáveis bioquímicas

Variável	SD				NS			
	IPV%	SS%	PS	NI	IPV%	SS%	PS	NI
MDA	0,240	0,269	0,248	0,286	0,356	0,514	0,024	0,107
TAOC	-0,015	0,210	0,403	0,432	0,507	0,058	0,346	0,387

Nenhuma correlação significativa ao nível de 5%.

Discussão

Os radicais livres, em sua maioria, são produzidos no interior das células e em grande parte por fontes biológicas; ou seja, fisiologicamente sua produção é em pequenas quantidades e há um equilíbrio com os antioxidantes (Fialkow et al.¹⁴, 2007).

Porém, em condições de quebra da homeostase, como acontece nos indivíduos com SD, que apresentam superexpressão da SOD-1, determinando o aumento da produção de radicais livres, ocorre o acúmulo desses radicais desencadeando o estresse oxidativo (Betteridge⁷, 2000). Este danifica várias macromoléculas e, assim, contribui com o desenvolvimento de patologias como: envelhecimento acelerado, mal de Alzheimer, diabetes e catarata, entre outras (Vasconcelos et al.⁴⁵, 2007).

Quando há o envolvimento dos radicais livres com ácidos graxos poli-insaturados, ocorrem danos nessas macromoléculas, resultando na peroxidação lipídica (Sochaski et al.⁴¹, 2002). Entre os vários produtos formados nesta reação, o principal é o malondialdeído (MDA) (Del Rio et al.¹¹, 2005; Yamaguti et al.⁵⁰, 2013), o qual tem sido relacionado com a doença periodontal (Diab-Ladki et al.¹², 2003; Liskmann et al.²⁵, 2007).

Indivíduos com SD apresentam uma alta prevalência de DP em idades precoces (Bagic et al.⁴, 2003; Reuland-Bosna, van Dijk³³, 1986), entretanto não foram encontrados na literatura, estudos avaliando os níveis de MDA e a capacidade antioxidante total na saliva desses indivíduos. Na sua grande maioria os trabalhos estudando a relação desses biomarcadores com a doença periodontal são realizados em indivíduos normais com e sem periodontite.

Akalin et al.² (2007) avaliaram a concentração de MDA no fluido crevicular gengival (GCF) em 36 pacientes com periodontite crônica comparados com 28 controles sem a doença, e encontraram uma maior concentração de MDA nos afetados pela doença periodontal. Em contra partida, na avaliação realizada no sangue dos mesmos indivíduos, os autores observaram que o nível de MDA não diferenciou entre os grupos.

No presente estudo, não foram observadas diferenças nos níveis de MDA na saliva de indivíduos com periodontite antes e 45 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico. Resultados semelhantes foram observados por Wei et al.⁴⁶ (2010) quando avaliaram os níveis de MDA no soro e na saliva de 48 indivíduos com periodontite crônica comparados com 35 controles saudáveis, independente do tratamento. No mesmo estudo, Wei et al.⁴⁶ verificaram que no fluido gengival os níveis de MDA foram maiores nos indivíduos com periodontite crônica antes do tratamento. Depois do tratamento houve redução destes chegando a níveis semelhantes aos do grupo controle. Maiores níveis de MDA, no GCF, pode ser explicado pelo fato de a peroxidação lipídica e os produtos resultantes desse processo estarem presentes em maior quantidade no interior da bolsa periodontal do que na saliva e no plasma dos pacientes com periodontite crônica (Akalin et al.², 2007).

Contudo, Tsai et al.⁴⁴ (2005), comparando os grupos com periodontite e controle saudável, verificaram que na saliva assim como no fluido crevicular gengival de ambos os grupos ocorria uma redução imediata dos níveis de peroxidação lipídica após o tratamento periodontal não cirúrgico. Isto pode ser explicado pelo fato de na presença de doença periodontal, o aumento da concentração de PMN estimular um aumento da liberação de antioxidantes, consequentemente, o seu nível na saliva aumenta (Kim et al.²², 2010).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis salivares de MDA entre indivíduos com SD com DP e não sindrômicos com DP. Esses resultados corroboram com Garlet et al.¹⁶ (2013) que também não observaram diferença no nível de MDA no plasma, em crianças com SD comparadas com crianças saudáveis, ambas com gengiva normal.

Contudo, pode-se observar que antes do tratamento, embora sem significância estatística, a mediana referente aos níveis de MDA foi mais alta para os indivíduos SD. Essa tendência dos SD apresentarem níveis mais altos de MDA, pode estar relacionada com o maior estresse oxidativo já relatado inclusive em crianças com SD (Garcez et al.¹⁵, 2005; Gualandri et al.¹⁷, 2003).

Divergências de resultados entre os diferentes estudos podem ser encontradas em função do tecido ou fluido, bem como da metodologia usada para a realização das análises. A peroxidação lipídica tem sido bastante estudada no plasma e soro sanguíneo, no tecido gengival, no fluido gengival e na saliva. Neste estudo, optou-se por realizar as análises em saliva devido às vantagens que ela tem apresentado como fluido de diagnóstico; além de sua coleta não causar ansiedade nos pacientes, por ser fácil e não invasiva. Outra vantagem é a melhor relação

custo-benefício em coletas de grande escala (Kaufman, Lamster²¹, 2002; Takane et al.⁴², 2005).

Entretanto, como os níveis de peroxidação lipídica aumentam no local da inflamação, em termos de doença periodontal, o aumento o nível de MDA é mais pronunciado no sulco gengival e na bolsa periodontal, conseqüentemente, os valores obtidos em fluido gengival são os que melhor representam a condição. (Akalin et al.², 2007).

A saliva foi usada neste estudo, por representar bem a condição intra-oral, pois além da secreção das glândulas salivares, contém alguns elementos do fluido gengival e metabólitos teciduais que podem ser úteis na determinação da degradação tecidual. Além disso, usou-se a saliva não estimulada, porque quando é feita a estimulação para a coleta, ocorre um aumento de volume, e isto prejudica a concentração (Kaufman, Lamster²¹, 2002). Neste estudo, o fluxo salivar foi significativamente menor para os indivíduos SD, contudo, não foram observadas diferenças antes e após o tratamento periodontal para ambos os grupos. Assim, podemos considerar que as comparações das concentrações de MDA feitas na saliva são confiáveis.

O MDA tem sido o foco de atenção nos estudos sobre a peroxidação lipídica, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA); porém, atualmente, sabe-se que este teste não é específico para MDA, pois outros aldeídos que estão presentes no local da coleta acabam participando da mesma reação. Na técnica desenvolvida por Mao et al.²⁶ (2006) em soro humano, a detecção do MDA é feita por HPLC, sendo esta técnica considerada mais específica, porém seu custo é elevado.

No presente estudo foi feita a quantificação do MDA utilizando o ácido tiobarbitúrico, contudo, tomou-se o cuidado de deixar os voluntários em jejum por duas horas antes da coleta, a saliva foi mantida em gelo durante a coleta, não se usou saliva estimulada e procedeu-se a centrifugação da saliva para remoção de resíduos que poderiam funcionar como contaminantes.

Pelo fato de os aspectos metodológicos geralmente não serem levados em conta na discussão, percebe-se que há muitos resultados conflitantes referentes aos níveis de biomarcadores do estresse oxidativo em indivíduos com SD (Campos et al.⁹, 2011).

A extensão do dano tecidual além de ser avaliada através desses biomarcadores, também pode ser feita por meio de análise dos antioxidantes (Ex: SOD, CAT e GPx) (Gutteridge¹⁸, 1995), porém, a medição de cada um separadamente não é prática e seus efeitos antioxidantes se somam. Dessa forma, tem-se realizado a análise da capacidade antioxidante total.

Neste estudo, foi comparada a capacidade antioxidante total (TAOC) na saliva de indivíduos com SD e não sindrômicos (controle) com doença periodontal, antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico. O grupo SD apresentou TAOC inferior ao grupo controle em ambos os períodos, e, o tratamento não alterou a condição inicial em ambos os grupos. Embora os indivíduos não sindrômicos tenham apresentado maior valor médio de TAOC após o tratamento, essa diferença não teve significância estatística. Sculley, Langley-Evans³⁶ (2003) relataram uma redução da capacidade antioxidante total na saliva de indivíduos com periodontite e gengivite. Corroborando, Brock et al.⁸ (2004) verificaram concentrações de antioxidantes significativamente menores no fluido gengival de indivíduos com periodontite comparados com os periodontalmente saudáveis.

Em estudos recentes, Konuganti et al.²³ (2012) e Zilinskas et al.⁴⁹ (2011) analisaram a capacidade antioxidante total, no soro e no sangue de indivíduos com e sem periodontite (controle). Os resultados, nesses fluidos, também demonstraram que a capacidade antioxidante total em pacientes com periodontite foi significativamente menor do que nos indivíduos controle. Panjamurthy et al.³² (2005) afirmaram que a redução na defesa antioxidante pode estar relacionada com o aumento do estresse oxidativo após verificarem que, em indivíduos com DP, houve um aumento dos marcadores do estresse oxidativo e uma redução da atividade antioxidante. Isto pode ocorrer, pois durante a inflamação periodontal os neutrófilos, que estão no sangue periférico, aumentam a liberação de oxidantes, principalmente o superóxido. Porém, se esta liberação for descontrolada, o estresse oxidativo é desencadeado e assim temos um aumento dos danos e uma menor capacidade antioxidante (Asman³, 1988).

Em um estudo avaliando o nível de antioxidantes no soro e na saliva, Chapple et al.¹⁰ (1997) verificaram que pacientes com periodontite apresentam uma reduzida capacidade antioxidante na saliva. Os autores consideraram que esta pode resultar, ou predispor a efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio. No soro não foram observadas diferenças entre os grupos de indivíduos com e sem periodontite.

Por outro lado, Kim et al.²² (2010) constataram que a capacidade antioxidante total na saliva de pacientes com periodontite crônica e, também do grupo controle diminuiu imediatamente após o tratamento periodontal não cirúrgico, mas com o tempo ela aumentou ligeiramente e 3 meses após o tratamento, não diferiu do *baseline*. Os resultados encontrados no presente estudo aos 45 dias pós tratamento, tanto para os níveis de MDA como para TAOC, também não

apresentaram diferença significativa quando comparados com aqueles obtidos antes do tratamento. Isso nos leva a sugerir que como no estudo de Kim et al.²² (2010), mesmo que tenha tido alguma diferença nesses parâmetros imediatamente após o tratamento, esta pode ter se tornado não significativa com o tempo, apesar de se ter detectado melhoras nas condições clínicas periodontais.

Analisando a literatura, pudemos constatar que não existe um método tido como padrão-ouro para quantificar a capacidade antioxidante total e o estresse oxidativo. Os estudos utilizam diferentes métodos de medição de biomarcadores e diferentes tipos de amostras biológicas, levando assim à obtenção de resultados muitas vezes contraditórios.

Este estudo apesar de ter mostrado algumas tendências de alteração nos níveis de Malondialdeído e da TAOC, após o tratamento periodontal, estas alterações não foram estatisticamente significantes. O tamanho da amostra pode ser considerado uma limitação do trabalho, prejudicando a detecção de diferenças entre os grupos e, principalmente, antes e depois do tratamento periodontal. Contudo, o número amostral utilizado, justifica-se pela dificuldade de se conseguir indivíduos que se enquadrassem nos critérios de inclusão e que não apresentassem nenhum dos fatores de exclusão presentes no delineamento do estudo. Além disso, vários indivíduos foram excluídos da pesquisa por falta de colaboração durante a fase de manutenção do tratamento ou não retornaram para a coleta final de saliva.

Assim, considera-se os resultados deste estudo, importantes para ampliar os conhecimentos sobre a capacidade antioxidante total e o nível de peroxidação lipídica na saliva de indivíduos com doença periodontal, bem como das alterações determinadas pelo tratamento periodontal, principalmente em indivíduos

que apresentam deficiências no sistema imunológico, como é o caso dos portadores de Síndrome de Down. Portanto, baseado nos conhecimentos adquiridos, outros estudos devem ser realizados visando o desenvolvimento de terapias antioxidantes que possam prevenir ou tratar de forma mais adequada os problemas periodontais em indivíduos com Síndrome de Down.

Referências *

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25(4):229-35.
2. Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(7):558-65.
3. Asman B. Peripheral PMN cells in juvenile periodontitis. Increased release of elastase and of oxygen radicals after stimulation with opsonized bacteria. *J Clin Periodontol.* 1988; 15(6):360-4.
4. Bagic I, Verzak Z, Cukovic-Cavka S, Brkic H, Susic M. Periodontal conditions in individuals with Down's syndrome. *Coll Antropol.* 2003; 27(2):75-82.
5. Barreiros ALBS, David JP, David JM. Estresse Oxidativo: Relação entre espécies reativas de oxigênio e a defesa do organismo. *Quím Nova.* 2006; 29: 113-23.
6. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4):458-76.
7. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2):3-8.

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

8. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol*. 2004;31(7): 515-21.
9. Campos C, Guzman R, Lopez-Fernandez E, Casado A. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in adolescents and adults with Down syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(7):760-8.
10. Chapple IL, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SR, et al. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann Clin Biochem*. 1997; 34 (Pt 4):412-21.
11. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005; 15(4):316-28.
12. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig*. 2003; 7(2):103-7.
13. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-21.
14. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(2):153-64.
15. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2005; 80(12):1607-11.

16. Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM, et al. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci.* 2013; 93(16):558-63.
17. Gualandri W, Gualandri L, Demartini G, Esposti R, Marthyn P, Volonte S, et al. Redox balance in patients with Down's syndrome before and after dietary supplementation with alpha-lipoic acid and L-cysteine. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2003; 23(1):23-30.
18. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12):1819-28.
19. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144(1):35-40.
20. Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003; 74(1):66-75.
21. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva– a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(2):197–212.
22. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40(4):164-71.
23. Konuganti K, Seshan H, Zope S, Silvia WD. A comparative evaluation of whole blood total antioxidant capacity using a novel nitroblue tetrazolium reduction test in patients with periodontitis and healthy subjects: A randomized, controlled trial. *J Indian Soc Periodontol.* 2012; 16:620-2.

24. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008; 79(8):1560-8.
25. Liskmann S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(1):27-33.
26. Mao J, Zhang H, Luo J, Li L, Zhao R, Zhang R, et al. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. 2006; 832(1):103-8.
27. Mrak RE, Griffin WS. Trisomy 21 and the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63(7):679–85.
28. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 1993; 84(4):407-12.
29. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000*. 1994; 4:81-6.
30. Morel I, Abalea V, Cillard P, Cillard J. Repair of oxidized DNA by the flavonoid myricetin. *Methods Enzymol*. 2001; 335:308-16.
31. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci*. 1989; 10(7):281-5.
32. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*. 2005; 10(2):255-64.
33. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(1):64-73.

34. Ribeiro LM, Jacob CM, Pastorino AC, Kim CA, Fomin AB, Castro AP. Evaluation of factors associated with recurrent and/or severe infections in patients with Down's syndrome. *J Pediatr (Rio J)*. 2003; 79(2):141-8.
35. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids*. 1987; 44(2-4):175-89.
36. Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 105(2):167-72.
37. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61(1):137-43.
38. Shichiri M, Yoshida Y, Ishida N, Hagihara Y, Iwahashi H, Tamai H, et al. alpha-Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(12):1801-11.
39. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985; 311(1152):617-31.
40. Skaleric U, Manthey CM, Mergenhagen SE, Gaspirc B, Wahl SM. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2000; 108(2):130-5.
41. Sochaski MA, Bartfay WJ, Thorpe SR, Baynes JW, Bartfay E, Lehotay DC, et al. Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism*. 2002; 51(5):645-51.
42. Takane M, Sugano N, Ezawa T, Uchiyama T, Ito K. A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis. *J Oral Sci*. 2005; 47(1):53-7.

43. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res.* 2009; 44(3):411-7.
44. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005; 40(5):378-84.
45. 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; 30:1323-38.
46. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010; 55(1):70-8.
47. WHO. Down syndrome. *Genes and human diseases.* 2007.
48. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996; 313 (Pt):17-29.
49. Zilinskas J, Kubilius R, Zekonis G, Zekonis J. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47:193-9.

50. Yamaguti PM, Simões A, Ganzerla E, Souza DN, Nogueira FN, Nicolau J. Effects of single exposure of sodium fluoride on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in salivary glands of rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;1-7.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos problemas que mais afetam a condição oral dos indivíduos com SD é a doença periodontal (Ribeiro et al.³⁵, 2003; Shichiri et al.³⁷, 2011). Esta desenvolve-se precocemente e apresenta uma rápida progressão (Bagic et al.⁴, 2003). A destruição periodontal ocorre devido à quebra da homeostase entre os sistemas oxidante e antioxidante (Canakci et al.⁸, 2009).

No presente estudo, buscamos quantificar a atividade dos componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático e o nível de um biomarcador do estresse oxidativo, o MDA, em indivíduos com SD e compará-los com indivíduos não síndrômicos, bem como, correlacionar a atividade desses componentes com os parâmetros clínicos relacionados com DP.

Um dos componentes do sistema antioxidante enzimático é a SOD, que possui a função de catalisar a reação do superóxido em peróxido de hidrogênio (Garcez et al.¹⁶, 2005). Neste estudo, a atividade da SOD na saliva de indivíduos com SD foi menor do que em indivíduos cromossomicamente normais, e essa diferença se manteve aos 45 dias após o tratamento periodontal. Outros dois componentes do sistema antioxidante avaliados foram a GPx e a CAT, que neutralizam o peróxido de hidrogênio (Garcez et al.¹⁶, 2005). Estas mostraram baixa atividade, e não sofreram a influência do tratamento periodontal em nenhum dos grupos.

Como os antioxidantes atuam de forma conjunta e seus efeitos se somam, é interessante fazer a análise da TAOC. Neste estudo, verificou-se que os indivíduos SD com DP apresentaram uma menor capacidade antioxidante total do que os não síndrômicos, e, não foram constatadas alterações desta com o tratamento periodontal. Uma reduzida defesa antioxidante sistêmica e/ou local,

conforme detectado neste trabalho, sugere que a SD pode ser um fator de risco para a DP.

Em ambos os grupos (SD e controle) o tratamento periodontal não cirúrgico promoveu melhora dos parâmetros clínicos (IPV, SS, PS e NI), mas não houve correlação dos componentes do sistema de defesa antioxidante com estes parâmetros. Uma possível explicação para essa falta de correlação seria a presença de baixa concentração desses antioxidantes na saliva total não estimulada, o que impossibilita a sua correlação com os parâmetros clínicos periodontais; ou então, a metodologia usada neste estudo pode não ser sensível o suficiente para detectar pequenas diferenças nas concentrações desses antioxidantes na saliva, as quais são importantes para determinar a melhora nas condições clínicas.

Quando ocorre o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o estresse oxidativo é desencadeado, e como principal produto da peroxidação lipídica tem-se o MDA (Tsai et al.⁴², 2005). Neste trabalho, não foi constatada diferença significativa nos níveis de MDA entre sindrômicos e não sindrômicos. Também não foram detectadas diferenças entre os períodos (antes e 45 dias depois do tratamento).

Este estudo apresentou concordância com alguns estudos levantados na literatura (Akalin et al.¹, 2007; Canakci et al.⁸, 2009; Sukhtankar et al.⁴¹, 2013) e também, contradições com outros (Garcez et al.¹⁶, 2005; Gualandri et al.¹⁷, 2003). Isto deve-se ao fato de que cada estudo utiliza um tipo de amostra biológica e diferentes métodos de medição, levando assim a obtenção de resultados às vezes contraditórios. Assim, são necessários mais estudos que permitam obter maiores informações sobre a regulação endógena do metabolismo oxidativo, que possam ser utilizadas no diagnóstico precoce, monitoramento da doença periodontal e de outras condições de natureza inflamatória associadas à síndrome de Down; bem como,

para que estratégias terapêuticas mais eficientes sejam desenvolvidas, visando a intervenção com suplementação antioxidante no tratamento de indivíduos com SD.

REFERÊNCIAS

Referências*

1. Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(7):558-65.
2. Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(3):238-43.
3. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol.* 2000; 71(2):249-55.
4. Bagic I, Verzak Z, Cukovic-Cavka S, Brkic H, Susic M. Periodontal conditions in individuals with Down's syndrome. *Coll. Antropol.* 2003; 27(2):75-82.
5. Barr-Agholme M, Dahllof G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol.* 1998; 69(10):1119-23.
6. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4):458-76.
7. Camera A, Hopps E, Caimi G. Diabetic microangiopathy: physiopathological, clinical and therapeutic aspects. *Minerva Endocrinol.* 2007; 32(3):209-29.

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

8. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent.* 2009; 3(2): 100-6.
9. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007; 43:160-232.
10. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(2):192-208.
11. Desai S. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(3):279-85.
12. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig.* 2003; 7(2):103-7.
13. Down JLH. Observation on ethnic classification of idiots. *L Barts.* 1866; 3:259-62.
14. Fahimi HD. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol.* 1969; 43(2):275-88.
15. Forrester MB, Merz RD. Epidemiology of Down syndrome (Trisomy 21), Hawaii, 1986-97. *Teratology.* 2002; 65(5):207-12.
16. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(12):1607-11.

17. Gualandri W, Gualandri L, Demartini G, Esposti R, Marthyn P, Volonté S, et al. Redox balance in patients with Down's syndrome before and after supplementation with alpha-lipoic acid and L-cysteine. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2003; 23(1):23–30.
18. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
19. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. Chromosome m, sequencing c. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 2000; 405(6784):311-9.
20. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet.* 1959; 1(7075):710.
21. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(9):1044-8.
22. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40(4):164-71.
23. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(11): 4997-5001.
24. Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, et al. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(2): 236-46.

25. Lejeune J, Gauthier M, Turpin R. Study of Somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959; 248(11): 1721-2.
26. Liu Q, Raina AK, Smith MA, Sayre LM, Perry G. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol Aspects Med.* 2003; 24(4-5):305-13.
27. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17(3):235-48.
28. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(3):268-77.
29. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 2005; 353(1-2):133–9.
30. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11):1287-312.
31. Pinto M, Neves J, Palha M, Bicho M. Oxidative stress in Portuguese children with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2002; 8(2):79-82.
32. Polani PE. Chromosome anomalies. *Annu Rev Med.* 1964; 15:93-114.
33. Remacle J, Lambert D, Raes M, Pigeolet E, Michiels C, Toussaint O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem J.* 1992; 286 (Pt 1):41-6.
34. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(1):64-73.

35. Ribeiro LM, Jacob CM, Pastorino AC, Kim CA, Fomin AB, Castro AP. Evaluation of factors associated with recurrent and/or severe infections in patients with Down's syndrome. *J Pediatr*. 2003; 79(2):141-8.
36. Saxen L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome: an orthopantomographic evaluation. *J Periodontol*. 1977; 48(6):337-40.
37. Shichiri M, Yoshida Y, Ishida N, Hagihara Y, Iwahashi H, Tamai H, et al. Alpha-Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(12):1801-11.
38. Skaleric U, Manthey CM, Mergenhagen SE, Gaspirc B, Wahl SM. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2000; 108(2):130-5.
39. Sreedevi H, Munshi AK. Neutrophil chemotaxis in Down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Pediatr Dent*. 1998; 22(2):141-6.
40. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*. 1991; 11(5):203-8.
41. Sukhtankar L, Kulloli A, Kathariya R, Shetty S. Effect of non-surgical periodontal therapy on superoxide dismutase levels in gingival tissues of chronic periodontitis patients: a clinical and spectrophotometric analysis. *Dis Markers*. 2013; 34(5):305-11.

42. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005; 40(5): 378-84.
43. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 1995; 252:38-53.
44. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral dis.* 2000; 6(3):138-51.
45. Yamaguti PM, Simões A, Ganzerla E, Souza DN, Nogueira FN, Nicolau J. Effects of single exposure of sodium fluoride on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in salivary glands of rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;1-7.
46. Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res.* 2006; 55(9): 359-63.

ANEXO

Anexo 1 – Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "*ANÁLISE CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL*" sob o protocolo nº 62/11, de responsabilidade do Pesquisador (a) *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 06 (seis) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "*CLINICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENE EXPRESSION ANALYSIS IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME WITH PERIODONTAL DISEASE*", protocol number 62/11, under Dr. *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 06 (six) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 14 de fevereiro de 2012.


Prof. Dr. Mauricio Metrelles Nagle
 Coordenador

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara 26 de março de 2014

Thamiris Orrico Rodrigues