

Adriana de Sales Cunha Correia

**SAÚDE BUCAL DE PACIENTES COM DESORDENS
NEUROLÓGICAS E NUTRIÇÃO ENTERAL - ANÁLISE
MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTOCOLO
DE PREVENÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica.

Orientador: Profa. Adjunto Sandra M. H. C. Á. de Aguiar

ARAÇATUBA - SP
2012

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Correia, Adriana de Sales Cunha.

C824s Saúde bucal de pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral: análise microbiológica, bioquímica e protocolo de prevenção. / Adriana de Sales

Cunha Correia. - Araçatuba : [s.n.], 2012

156 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho
Ávila de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

1. Nutrição enteral 2. Saúde bucal 3. Pessoas com deficiência

Black D27

CDD 617.645

Dedicatória

A Thiago, Maria Luíza e João Lucas, minhas razões de viver...

Meu Rei,

Novamente não tenho palavras para agradecer você. Meu companheiro, meu amigo, às vezes meu pai, às vezes meu filho..... Seu apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui e sem ele eu teria desistido certamente. Obrigada por me fortalecer nos momentos mais difíceis que passei em minha vida nestes longos 4 anos de curso.

Obrigada por ser um pai tão amoroso, brincalhão, exigente e dedicado. Te amo demais.

“Quando estamos longe um do outro eu sinto, faltar um pedaço do meu coração, porque sem respirar seu ar eu não existo, vai além dos limites da minha razão...”

Edson Cadorini

Minha Princesa,

Eu te amo muito. Perdoa a mamãe pela ausência em tantos momentos... Você é a minha primogênita, me ensinou a delícia de ser mãe, me deu a oportunidade de ser melhor.... Obrigada pela filha incrível, surpreendente e apaixonante que você é. Mamãe te ama demais, meu amor!!!!.

*“É do cabelo amarelo, dos óio cor de chuchu
Quando eu virar gente grande, me caso logo com tu
O samba de Maria Luiza
O samba de Maria Luiza
O samba de Maria Luiza é bonito pra chuchu
O samba de Maria Luiza é bonito pra chuchu
Ela canta e ela dança, menina
O samba da Marilu, Marilu, Marilu, Marilu
O samba de Maria Luiza é bonito como o quê
E é por isso que o papai
Já tá apaixonado por você
Tá apaixonado por você Maria Luiza*

Tom Jobim

Meu Príncipe,

Você me faz sentir amada de uma forma toda especial e verdadeira. Obrigada por ser meu companheirinho, meu chicletinho, meu amorzão. Que Deus o abençoe muito em sua vida. Perdoa a mamãe por tantos momentos separados desde que você nasceu, em meio a este curso, e como é bom saber que você sempre quer voltar prá casa. Te amo, meu filho.

“Do céu, do céu, do céu...”

Do mar, do mar, do mar...

Do céu, do céu, do céu...

Do mar, do mar, do mar....

João Lucas Cunha Correia, meu precoce compositor...

Agradecimento Especial

À minha querida orientadora, Professora Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar

Obrigada pelo seu carinho, paciência, pela união nos momentos bons e difíceis que passamos juntas nessa jornada de pouco mais de três anos.... Sua sensatez foi decisiva para que eu possa ter chegado aqui hoje e eu lhe agradeço muito por isso. Que Deus a abençoe muito em sua vida, e que consigamos continuar com garra e muita determinação a trilhar o caminho de pedras que é o atendimento odontológico das pessoas com deficiências. Conte sempre comigo.

Muito obrigada, Professora.

Ao meu co-orientador, Professor Elerson Gaetti Jardim Jr.

O senhor me fez entender o exato sentido da palavra pré-conceito. Eu tinha um pré-conceito em relação à sua pessoa, mesmo sem o conhecer pessoalmente. Sabia apenas de sua exigência, certo temperamento forte. Porém gostaria de afirmar que hoje, após estes três anos de uma convivência muito saudável, estou certa de que o senhor é uma pessoa de uma sinceridade marcante, porém extremamente honesta, de uma cultura exemplar, humor irreparável e conhecimento técnico admirável. Obrigada por ter me concedido tantos momentos de ensinamento, antes como aluna e no momento como uma iniciante colega de Disciplina. O senhor me inspira a estudar, conhecer, procurar.....

Muito obrigada, Professor.

À querida Profa. Ana Cláudia Estevanato Nakamune

Como foi bom neste meu último ano de doutorado conhecer pessoa tão amável, prestativa, comprometida e amiga. Obrigada professora por sua atenção, sua entrega ao meu trabalho, sua vibração com os resultados, sua energia contagiante. A senhora sempre levou ao pé da letra a arte do ensinar, e eu espero ter correspondido à altura.

Muito obrigada, Professora.

Agradecimientos

A Deus

Salmo 121

*“Elevo meus olhos para os montes.
De onde me virá o socorro?
O meu socorro vem do Senhor
Que fez o céu e a terra.
Não deixará vacilar o teu pé.
Aquele que te guarda não tosquenejará.
Eis que não tosquenejará
Nem dormirá o guarda de Israel.
O Senhor é quem te guarda.
O Senhor é a tua sombra a tua direita.
O sol não te molestará de dia.
Nem a lua de noite.
O Senhor te guardará de todo o mal.
Ele guardará a tua alma.
O Senhor guardará a tua entrada
E a tua saída
Desde agora e para sempre. Amém.”*

Obrigada Senhor pela vida e pela força em todos os momentos de fraqueza.

A meus amados pais, Dalmio e Cleiber

Vocês são o meu exemplo de vida, de honestidade, de amor aos filhos, de dignidade. Obrigada pela dedicação, por todo o investimento na minha formação, pelo incentivo em todas as horas.

Dady,

Você é o meu herói, meu amigo, meu professor, meu maior incentivador. Te amo muito.

Mamify,

Você é meu refúgio, meu oásis no deserto. Tenha sempre certeza do meu infinito amor por você. Te amo, te amo, te amo.

Às minhas queridas irmãs, Andréa e Amanda

Dedéa,

Minha gêmula!!!! Tenho certeza que você vai se emocionar ao ler partes deste trabalho, pois você verá que a forte ligação entre nós advém não só da genética, mas também de nossa união pré-natal.

Amomy,

Minha irmãzinha do coração, já é uma mulher, mas sempre será nossa caçulinha tão amada.

Amo vocês, minhas queridas.....como é bom quando estamos juntas!

Às minhas avós Maria e Maria (in memorian), meus avôs, João e João (in memorian). Apesar da distância e da saudade, vocês e todos os meus tios, tias e primos têm um lugar reservado no meu coração. Amo vocês.

Aos meus queridos sogros, Célio e Neusa

Obrigada pelo incentivo, por me ajudarem tanto com a Maria Luíza e com o João Lucas, pelo amor e carinho nestes quase 18 anos de convivência...

Sogrinha, obrigada pelas orações que tanto me fortaleceram...

Sogrinho, obrigada por me fazer sentir amada como uma filha...

Vocês estão no meu coração. Amo muito vocês dois!!!

Aos meus queridos cunhados,

Helinho e Rafa

Obrigada pela amizade, pelos churrascos, pelas piadas e tantos risos...

Wellington e Lamunier

Obrigada por fazerem minhas irmãs felizes!!!

À minha querida cunhada Amanda

Obrigada pelo carinho, amizade. Espero que possamos estar mais juntas e vivenciar o crescimento e amizade de nossos filhos.

Aos meus sobrinhos Samuel, Lara, Ana Laura e Rebeca.

Vocês são meus amores!!!! Titia ama vocês!!!

À Dona Osmarina,

Deidei, obrigada por cuidar tão bem de mim, do Thi, e principalmente por seus cuidados tão preciosos com a Malú e com o João. A Senhora é uma bênção de Deus nas nossas vidas...

À Mariana e ao Fábio,

Vocês sabem o quanto os amo e sou grata pela amizade, carinho e dedicação. Vocês são a essência da palavra "amigos"...

À Prof.^a Christiane Marie Schweitzer, pelo carinho e prestatividade com que me recebeu até mesmo em sua casa para fazer-me entender a difícil arte da bioestatística.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos seus representantes Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Diretora e, Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Vice-Diretor.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu coordenador Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof^a Dra. Rosângela dos Santos Nery, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan, Profa. Cristiane Duque e Prof^a Dra. Cleide Cristina R. Martinhon pelo carinho e atenção em todos os momentos.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva, pela amizade, auxílio e convivência tão especiais.

Aos queridos amigos da minha turma de Doutorado Tatyana, Diurianne, Marcelo, Paulo, Simone e Isabelle por estes quatro anos de amizade, respeito e companheirismo. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela harmoniosa convivência.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Ana Paula Cláudio, Ivone, Denise, Izamar, Luzia, Juis Cláudio e Maria Cláudia pela atenção, carinho e disponibilidade com que sempre me receberam.

À Valéria de Queiróz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo, carinho e paciência..

Aos meus queridos amigos Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho e Carolina Simonetti Lodi, tão especiais, tão queridos, tão importantes para mim. Minha amiga Carol, você mora no meu coração.

À Maria Aparecida Nascimento Xavier, Presidente do Hospital Neurológico “Ritinha Prates” de Araçatuba-SP, pelo apoio para que a realização deste curso fosse possível.

Aos meus queridos pacientes do Hospital Neurológico “Ritinha Prates”, meu amor e meu carinho eternos.

À amiga Ana Cláudia, auxiliar odontológica do Hospital Neurológico “Ritinha Prates”, pela convivência harmoniosa, companheirismo, dedicação e por ter me ajudado nas coletas de material biológico em Araçatuba e em Tupã. Valeu, querida!

À Equipe de Enfermagem do Hospital Neurológico “Ritinha Prates”, pela execução do protocolo de prevenção proposto neste estudo. O bem que vocês fizeram aos nossos pacientes foi incomparável...

À diretoria, funcionários e queridos pacientes da Casa da Criança de Tupã-SP, pela oportunidade de ampliar os horizontes deste meu trabalho e da minha vida acadêmica como um todo.

À Banda Pra Quinteto Falta Um, pela amizade, carinho e pelos momentos de diversão, piadas hilárias e muita música de qualidade!!!

Aos queridos amigos Cesão e Rita, César Suart e Rita, Ângelo e Lú, Miltinho e Fá, Tito e Aline, Joao e Aline, Juninho e Sabrina, Adhemar e Déia, Nathan e Carol, Pablo e Paulinha, e aos meus “sobrinhos postiços”, Marcela, João Paulo, Cauê, Maria Tereza, Rafa, Thales, Ana Clara pela nossa amizade tão gostosa!!!

À Thalita Tanizawa, que me ajudou imensamente com o meu pequeno inglês, e sempre acreditou que eu conseguiria ir mais longe do que eu mesma acreditava...

À Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Okamoto, pela convivência recente, mas extremamente válida e importante para meu crescimento profissional na docência.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Robson Varlei Ranieri, por sua amizade tão sincera. Você é daquelas pessoas que nos inspira pela alegria, disposição, competência e dinamismo. Obrigada por me receber tão bem nesta minha jornada pela Microbiologia...

Aos profissionais e amigos do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini, José Marcelo Tramarim (nosso Marcelinho), Miriam Regina Mouro Ferraz Lima, e Giseli Mitsuy Kayahara pela convivência agradável e momentos de muita descontração.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Resumo

Saúde bucal de pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral - Análise microbiológica, análise bioquímica e protocolo de prevenção.

2012. 156f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

Distúrbios nutricionais são comuns em pacientes com desordens neurológicas. Este estudo analisou a microbiota bucal e orofaríngea de pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral, os componentes salivares que pudessem influenciar nas condições de saúde bucal e estabeleceu um protocolo de prevenção em saúde bucal para os pacientes avaliados. Participaram do grupo de estudo pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral por sonda de gastrostomia (GGT/ n=11). O grupo controle (GC) foi composto de pacientes (n=13) com desordens neurológicas e dieta normal, por via oral. Foram realizadas coletas de saliva, biofilme supragengival, biofilme subgengival, secreção de mucosa (jugal, assoalho bucal e dorso lingual) e secreção de orofaringe, para análise microbiológica por cultura e PCR. Um protocolo de higiene bucal foi estabelecido para o GGT, incluindo raspagem dentária mensal, escovação dentária diária com creme dental para controle de cálculo dentário, e limpeza da cavidade bucal com gaze embebida em solução a base de digluconato de clorexidina a 0,12% com xilitol a 5%. A cultura bacteriana apontou alta prevalência de microorganismos entéricos (18,1%) e leveduras (89,0%) no GGT, porém o PCR apresentou cerca de 23,9% de amostras positivas no GGT para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, dentre outros microrganismos avaliados, enquanto no GC a prevalência destas bactérias foi estatisticamente significativa (39,9%). A nova rotina realizada em pacientes (n=6) do GGT mostrou melhora expressiva no Índice de Sangramento Gengival (ISG) médio, que apresentou redução de 15% após 6 meses de uso do protocolo, e a média do Índice de Higiene Oral Simplificado (IHOS), baixou de

1,48 para 0,57 (redução de 60%) no mesmo período. Um grupo de voluntários (n=14) sem desordens neurológicas foi adicionado à pesquisa para análise bioquímica de saliva. A saliva total não estimulada foi obtida por aspiração do assoalho da cavidade bucal. Foram determinadas, através de espectrofotometria, as concentrações de cálcio, fósforo, ácido úrico, amilase salivar, proteínas totais salivares e magnésio nas amostras coletadas. Observou-se uma redução significativamente acentuada de 150% e 220% do ácido úrico salivar nos pacientes gastrostomizados em relação aos pacientes com alimentação via oral e os voluntários, respectivamente. Os valores de magnésio, fósforo e amilase também diferiram entre os grupos. Os valores de cálcio e do fluxo salivar não diferiram entre os grupos. Um protocolo de saúde bucal específico para pacientes com distúrbios neurológicos e com dieta enteral faz-se necessário, a fim de reduzir o índice de mortalidade desta população por distúrbios respiratórios, originados por microrganismos periodontopatógenos.

Palavras-chave: nutrição enteral; saúde bucal; pessoas com deficiências.

Abstract

Oral health of patients with neurological disorders and enteral nutrition - Microbiological analysis, biochemical analysis and prevention protocol.

2012. 156f. Thesis (Doctorate in Dental Science) – Faculty of Dentistry of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

Nutritional disorders are common in patients with neurological disorders. This study examined the oral and oropharyngeal microbiota of patients with neurological disorders and enteral nutrition, the salivary components that could influence the oral health status and it was established a protocol for prevention in oral health for these patients. The study group was composed by patients with neurological disorders and enteral nutrition by gastrostomy tube (GGT / n = 11). The control group (CG) consisted of patients (n = 13) with neurological disorders and orally normal diet. It was collected saliva, supragingival biofilm, dental biofilm, secretion of mucous (buccal, mouth floor and tongue dorsum) and oropharyngeal secretions for microbiological analysis by culture and PCR. An oral care protocol was established for GGT, including dental scraping monthly, daily tooth brushing with toothpaste to dental calculus control, and cleaning the oral cavity with soaked gauze in solution based on digluconate chlorhexidine 0.12% with 5% of Xylitol. The bacterial culture showed high prevalence of enteric microorganisms (18.1%) and yeast (89.0%) in GGT, but the PCR showed about 23.9% of the positive samples for *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, among other microorganisms evaluated, while in the GC group the prevalence of these bacteria was statistically significant (39.9%). The new routine performed in the GGT patients (n=6) showed significant improvement in average of the Gingival Bleeding Index (GBI), which declined by 15% after 6 months of using these protocol, and the average of the Simplified Oral Hygiene Index (OHI) decreased from 1.48 to 0.57 (60% reduction) in the same period. A group of

volunteers (n = 14), without neurological disorders, was added to the search for biochemical analysis of saliva. The unstimulated saliva was obtained by aspiration from the floor of the oral cavity. The concentrations of calcium, phosphorus, uric acid, salivary amylase, salivary total protein and magnesium in the samples were determined by spectrophotometry. There was a significantly decrease from 150% and 220% of uric acid in the salivary of the patients with gastrostomy tube when compared to patients with oral feeding and volunteers, respectively. The values of magnesium, phosphorus and amylase also differed between the groups. The amounts of calcium and salivary flow did not differ between groups. A protocol of specific oral health for patients with neurological disorders and enteral nutrition is necessary in order to reduce the mortality rate of this population for respiratory problems, caused by periodontal microorganisms.

Keywords: enteral nutrition, oral health, people with disabilities.

Listas

Lista de Tabelas

TABELA 1 -	IHOS e ISG dos pacientes do GGT e do GC da análise microbiológica.	113
TABELA 2 -	Condição de saúde bucal dos pacientes do GGT e do GC da análise microbiológica	114
TABELA 3 -	Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores para detecção do complexo vermelho de Socransky e demais microrganismos	115
TABELA 4 -	Ocorrência de Leveduras Totais e a família <i>Enterobacteriaceae</i> por amostra nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	67
TABELA 5 -	Ocorrência de Leveduras Totais nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	68
TABELA 6 -	Ocorrência de membros da família <i>Enterobacteriaceae</i> nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	69
TABELA 7 -	Ocorrência de microrganismos do complexo vermelho de Socransky nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle.	70
TABELA 8 -	Ocorrência dos microrganismos avaliados nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle.	70
TABELA 9	Ocorrência de <i>C. albicans</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	71
TABELA 10 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	72
TABELA 11 -	Ocorrência de <i>T. forsythia</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	73

TABELA 12 -	Ocorrência de <i>T. denticola</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção..	73
TABELA 13 -	Ocorrência de <i>E. corrodens</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	74
TABELA 14 -	Ocorrência de <i>Mollicutes</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	75
TABELA 15 -	Ocorrência de <i>P. micra</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	75
TABELA 16	Ocorrência de <i>P. intermedia</i> nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	76
TABELA 17	Ocorrência de <i>P. nigrescens</i> por amostra nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.	76
TABELA 18	Média e erro padrão da média de parâmetros bioquímicos da saliva total não estimulada a partir de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG).	83

Lista de Abreviaturas

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase	36
ADA	American Dental Association	39
APAE-SP	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais - São Paulo	41
AAID	American Association of Intellectual and Developmental Disabilities	41
UNESP	Universidade Estadual Paulista	53
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba	53
CID-10	Código Internacional de Doenças	53
GGT	Grupo Gastrostomizados	54
N	Número na amostra	54
GC	Grupo Controle	55
CPOD	Índice de dentes cariados, perdidos e obturados	55
ISG	Índice de sangramento gengival	55
IHOS	Índice de higiene oral simplificado	55
GNGT	Grupo Não Gastrostomizados	56
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	69
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	69
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>	69
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	70
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	70
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	70
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>	70
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	70
CG	Control Group	79
NTFG	Non Tube-Fed Group	79

TFG	Tube-fed Group	79
ml/min	Mililitro por minuto	79
Mg/dL	Miligramma por decilitro	80
U/L	Unidade por litro	80
g/dL	Gramma por decilitro	82

Lista de Anexos

Anexo A	Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	103
Anexo B	Prontuário Clínico	104
Anexo C	Prontuário Odontológico	105
Anexo D	Protocolo de higiene oral para pacientes com nutrição enteral	106
Anexo E	Fotos do protocolo de prevenção no Hospital Neurológico Ritinha Prates	107
Anexo F	Fotos da coleta para análise microbiológica por cultura e PCR	110
Anexo G	Fotos da coleta para análise bioquímica	111
Anexo H	Tabela 1	113
Anexo I	Tabela 2	114
Anexo J	Tabela 3	115
Anexo K	Artigo sobre os parâmetros do estresse oxidativo na saliva dos pacientes desta pesquisa	116
Anexo L	Normas da revista	136

Lista de Figuras

Figura 1	Fluxo Salivar (mL/min)	79
Figura 2	Concentração de ácido úrico (mg/dL)	80
Figura 3	Concentração de amilase salivar (U/L)	80
Figura 4	Concentração de cálcio (mg/dL)	81
Figura 5	Concentração de fósforo (mg/dL)	81
Figura 6	Concentração de magnésio (mg/dL)	82
Figura 7	Concentração de proteínas totais (g/dL)	82
Figura 8	Paciente do Hospital Neurológico Ritinha Prates	107
Figura 9	Abridor de boca de Molt	107
Figura 10	Uso de fio-dental	108
Figura 11	Escovação dentária	108
Figura 12	Uso de solução antisséptica na cavidade oral	109
Figura 13	Coleta de saliva	110
Figura 14	Coleta de secreção de mucosa oral	110
Figura 15	Coleta de saliva para análise bioquímica	111
Figura 16	Coleta de saliva para análise bioquímica em Tupã-SP	111
Figura 17	tubo de vidro ligado à bomba a vácuo	112

Sumário

Sumário

1	INTRODUÇÃO	35
2	BREVE REVISÃO DA LITERATURA	38
2.1	O paciente com desordens neurológicas	40
2.2	Distúrbios nutricionais em pacientes com desordens neurológicas	42
2.3	Alterações bucais em pacientes com desordens neurológicas e distúrbios nutricionais	43
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODO	53
4.1	Crítérios de inclusão e exclusão	53
4.2	Determinação da amostra para análise microbiológica	54
4.3	Determinação da amostra para análise bioquímica	56
4.4	Coleta dos espécimes clínicos	57
4.5	Processamento microbiológico	59
4.6	Análise dos componentes salivares	62
4.7	Protocolo de prevenção	63
4.8	Análise estatística	64
5	RESULTADOS	66
5.1	Avaliação clínica	66
5.2	Análise microbiológica por cultura	67
5.3	Análise microbiológica por PCR	69
5.4	Análise dos componentes salivares	78
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	94

Introdução

1 Introdução

A nutrição enteral por sonda nasogástrica é um procedimento frequentemente utilizado em pacientes hospitalizados quando estes apresentam problemas com a alimentação oral, como dificuldade de deglutição e estado nutricional pobre. Os pacientes que recebem nutrição enteral apresentam vários tipos de complicações, tais como diarreia, vômitos, constipação, aspiração pulmonar, o deslocamento do tubo (ou sonda), o entupimento do tubo (ou sonda), hiperglicemia e alterações eletrolíticas (PANCORBO-HIDALGO et al., 2001).

Em crianças com paralisia cerebral o tempo de alimentação pode estar consideravelmente aumentado e, em vez de ser uma experiência agradável, as refeições podem ser angustiantes para a criança e para o cuidador. Cada vez mais no caso de crianças incapazes de manter um estado nutricional normal através da alimentação por via oral, as sondas de gastrostomia ou jejunostomia estão sendo utilizadas para prover o sistema digestivo com nutrientes (SLEIGH, BROCKLEHURST, 2004; SULLIVAN, 2008).

A primeira idéia a embasar este estudo foi entender os mecanismos de formação e acúmulo de cálculo dentário sem a presença de resíduo alimentar, base para a formação e maturação de biofilme, que ocorre quando a alimentação se dá por

via oral, mas não quando o indivíduo é alimentado por via enteral. Inúmeras hipóteses começaram a ser levantadas, principalmente em relação à composição da microbiota oral de pessoas com distúrbios neurológicos e alimentação por sonda de gastrostomia ou jejunostomia. Em virtude do déficit nutricional avançado, estes pacientes corriqueiramente apresentam complicações respiratórias, sendo a principal a pneumonia aspirativa, que comprovadamente pode ser causada por aspiração de conteúdo bucal ou orofaríngeo contaminado. As inúmeras medicações clínicas e psicotrópicas, além de antibióticos usados para as mais diversas infecções respiratórias inferiores e superiores, infecções de trato urinário e tantas outras, também poderiam alterar a microbiota bucal, ou ainda agir sistemicamente sobre a composição e fluxo salivares, os quais são fundamentais para a homeostase do ecossistema oral.

A participação dos componentes salivares na condição de saúde bucal de pacientes com distúrbios neurológicos e nutrição enteral se tornou então um novo objetivo dentro desta pesquisa, visto que a dieta administrada via sonda de gastrostomia apresenta um aspecto nutricional de extrema importância, agindo por vezes como suplementação alimentar, rica em íons minerais, elementos antioxidantes e vitaminas, os quais poderiam também modificar os padrões salivares, como pH, capacidade tampão, fluxo e até mesmo a capacidade antioxidante.

Neste estudo foi avaliada a condição de saúde bucal de pacientes com distúrbios neurológicos e nutrição enteral, através de análise microbiológica por cultura e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de espécimes clínicos orais, bem como pela análise bioquímica dos componentes salivares. Foi ainda estabelecido um

protocolo de saúde bucal para estes pacientes, a fim de melhorar as condições orais desta população.

2 Breve Revisão da Literatura

Poucos são os trabalhos relacionando o acúmulo de cálculo dentário e pacientes alimentados por via enteral, sendo que os existentes datam dos primórdios das décadas de 80 e 90 (KLEIN e DICKS, 1984; DICKS e BANNING, 1991; DYMENT e CASAS, 1999).

Publicado em 1991 o guia de cuidados de saúde bucal para pacientes com deficiências físicas e intelectuais da Associação Odontológica Americana não continha qualquer protocolo específico para tratamento de crianças com nutrição enteral (ADA, 1991). Todavia, desde 1967, Littleton et al. mostraram que o biofilme bucal de indivíduos com alimentação por via oral é altamente acidogênica, enquanto o biofilme bucal de pacientes com nutrição enteral apresentaria uma tendência pequena em reduzir o pH. Essa quantidade de ácidos reduzida diminuía a quantidade de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e bactérias filamentosas na placa dos pacientes alimentados por sonda, o que levou os autores a concluir que a diminuição da capacidade de reduzir o pH estava relacionada a uma mudança da população bacteriana, causada por uma alteração na produção de ácidos pela flora residente, em virtude da ausência de carboidratos exógenos.

A associação entre o conteúdo oral e orofaríngeo contaminado e a ocorrência de pneumonia aspirativa está extremamente difundido na literatura (LEIBOVITZ et al., em 2003; LEIBOVITZ et al., 2004; SCANNAPIECO, 1999; SCANNAPIECO e HO, 2001; SCANNAPIECO, 2006; PAJU, SCANNAPIECO, 2007).

A importância dos cuidados de saúde bucal como prevenção da pneumonia aspirativa em pacientes debilitados também é notável. Em 2002 Mojon afirmou que em pacientes idosos institucionalizados a colonização do biofilme bucal por patógenos pulmonares é frequente, e ressaltou a importância de melhorar a saúde bucal de pacientes que estejam em risco e naqueles que vivem em instituições de cuidados a longo-prazo.

Abe et al. (2006) classificaram os pacientes de seu estudo de acordo com a presença de biofilme bucal nos elementos dentários em pacientes de alto risco (grande quantidade de biofilme bucal) e pacientes de baixo risco (pouco biofilme bucal) para pneumonia e afirmaram que o uso de índices de saúde bucal são úteis não somente para avaliar a higiene bucal do paciente, mas também para estabelecer metas específicas para os cuidados de saúde bucal em instituições de cuidados a longo-prazo e em âmbito hospitalar.

Os cuidados de saúde bucal realizados por profissionais da odontologia são referidos como de grande importância na prevenção da pneumonia aspirativa, pneumonia associada à ventilação e pneumonia nosocomial (ADACHI et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2008; SARIN et al., 2008; BASSIM et al., 2008;). O uso de produtos antissépticos bucais no controle do biofilme dentário e da redução do conteúdo oral e orofaríngeo contaminado também é apresentado como fundamental na prevenção dos distúrbios respiratórios por periodontopatógenos (DERISO et al.,

1996; KOEMAN, VAN DER VEM, HALK, et al., 2006; SANTOS, MELLO, WALKIM et al., 2008; MUNRO et al., 2009).

A fim de embasar este estudo, inicialmente foi caracterizado através de trabalhos correlatos da literatura o paciente com desordens neurológicas e nutrição enteral. Os estudos serão apresentados em meio às definições de deficiência intelectual, distúrbios nutricionais e alterações bucais presentes nesta população.

2.1 O PACIENTE COM DESORDENS NEUROLÓGICAS

Segundo o Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da USP (<http://www.fm.usp.br/pdf/neurologia.pdf>), as desordens neurológicas podem ter diferentes origens: genética ou hereditária; congênita, ou seja, dependente de um distúrbio do desenvolvimento embrionário ou fetal do Sistema Nervoso Central ou Periférico; adquirida, ou seja, ocorrendo, com maior ou menor influência do ambiente, ao longo dos diferentes períodos da vida, desde a fase neonatal até a velhice. Em diferentes combinações e gradações, diversos sinais e sintomas compõem os principais grupos de desordens neurológicas, dentre elas as alterações do desenvolvimento como a deficiência mental, paralisia cerebral, déficit de atenção/hiperatividade, dislexia e outros.

O termo deficiência mental foi utilizado a partir do século XIX, sendo conceito construído e empregado pelo “modelo médico” para classificar, denominar e

conceituar aqueles que possuíam um problema no seu desenvolvimento mental, na área cognitiva, que influenciava na sua autonomia e independência e na sua adaptação ao meio social (SOUZA, 2011).

O termo deficiência intelectual surgiu nos primeiros anos do século XXI, na Declaração de Montreal sobre a Deficiência Intelectual. Este documento foi o resultado das discussões feitas na Conferência Internacional sobre Deficiência Intelectual, realizada pela Organização Pan-americana de Saúde e pela Organização Mundial de Saúde, na cidade de Montreal – Canadá, nos dias 05 e 06 de outubro de 2004 (SOUZA, 2011). Esse termo veio substituir, de forma conceitual e valorativa, a denominação “deficiência mental” (SASSAKI, 2006), que ainda pode ser encontrada na legislação brasileira que trata das pessoas com deficiência relacionada à cognição, associada ao intelecto, e à adaptação social (SOUZA, 2011).

Segundo o Manual TODOS PELOS DIREITOS (APAE-SP, 2011), as desordens neurológicas podem causar deficiências físicas, as quais consistem em problemas no sistema locomotor, que levam ao mau funcionamento ou paralisia dos membros (Paraplegia, Tetraplegia, Hemiplegia, Paralisia Cerebral e Amputação), deficiências intelectuais, que são caracterizadas pela “limitação significativa tanto no funcionamento intelectual como no comportamento adaptativo que se expressam nas habilidades conceituais, sociais e práticas, originando-se antes dos 18 anos de idade” (AAID, 2010), e ainda as deficiências visual e auditiva. Dependendo do dano cerebral, as deficiências físicas, visual, auditivas e intelectuais geradas pela desordem neurológica podem estar associadas entre si, sendo muito comum a associação da deficiência intelectual à paralisia cerebral.

2.2 DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS EM PACIENTES COM DESORDENS NEUROLÓGICAS

Distúrbios nutricionais e problemas gastrointestinais são comuns em crianças com desordens neurológicas (SULLIVAN, 1997). Isto ocorre porque danos durante o desenvolvimento do sistema nervoso central podem resultar em disfunção significativa no trato gastrointestinal e se refletem em prejuízo à função motora oral, ruminação, refluxo gastro-esofágico, com ou sem aspiração, retardo no esvaziamento gástrico e constipação (SULLIVAN, 1997). Este é um problema crônico em 80 a 90% das crianças com paralisia cerebral e em crianças com deficiência no desenvolvimento neurológico que estão em risco especial de desenvolver desnutrição por causa da descoordenação da deglutição, refluxo gastroesofágico e constipação (CHONG, 2001). Para Sullivan (2008) os problemas gastrointestinais associados ainda incluem disfunção motora oral, levando à dificuldades na alimentação, risco de aspiração, tempo de alimentação prolongado, e desnutrição com comprometimento físico presente.

De acordo com Langmore et al. (1998), o papel da disfagia e da aspiração na patogênese da pneumonia pode ser melhor compreendida pela consideração da contribuição da colonização e resistência do hospedeiro. A aspiração pode ocorrer, mas somente levará a pneumonia se o material aspirado for patogênico para os pulmões e se a resistência do hospedeiro ao inócuo estiver comprometida.

2.3 ALTERAÇÕES BUCAIS EM PACIENTES COM DESORDENS NEUROLÓGICAS E DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS

Melvin (1991) analisou as várias funções da saliva e seu papel na prevenção de doenças dentárias, relatando que elucidar as funções dos diversos componentes salivares, bem como os mecanismos subjacentes à fisiologia da glândula salivar normal é essencial para o desenvolvimento de raciocínio lógico para a prevenção e tratamento da patologia oral, visto que avaliar o estado funcional das glândulas salivares e composição salivar ajudará na identificação de indivíduos mais suscetíveis à doença oral.

O fluxo salivar e o pH intra-oral são foco de inúmeros trabalhos, dentre eles o de Ayars et al (1982), que demonstraram como a redução do fluxo salivar e a concomitante redução do pH intra-oral pode predispor pacientes à colonização bacteriana por *Klebsiella pneumoniae*.

Santos et al. (2007) mostraram em seu estudo que adolescentes com paralisia cerebral apresentam menor fluxo salivar, atividade de peroxidase, amilase, concentração de proteínas totais salivares e maior concentração de ácido siálico do que adolescentes sem paralisia cerebral, o que pode aumentar o risco de doenças bucais nesta população. A mesma autora em um trabalho mais recente mostrou que indivíduos com paralisia cerebral espástica apresentam menor taxa de fluxo, pH e capacidade tampão salivar do que indivíduos sem dano neurológico, o que pode aumentar o risco de doenças bucais nesta população (Santos et al., 2010).

Segundo Battino et al. (2002), durante a inflamação gengival, o fluxo do fluido crevicular aumenta a alteração da composição salivar com produtos da resposta inflamatória, o que, por sua vez, pode ter algum papel no controle e/ou modulação dos danos oxidativos na cavidade oral.

Em pacientes com distúrbios nutricionais, os componentes e o fluxo salivar têm influência direta na composição da microflora oral e de orofaringe. Em 1977, McMurray et al. afirmaram que a imunidade secretora pode estar prejudicada em crianças com desnutrição moderada, devido à diminuição dos níveis de imunoglobulina A nas secreções como lágrimas e saliva. Todavia, nenhum protocolo para os cuidados de higiene oral de crianças alimentadas por sonda foi publicado, apesar de crianças com nutrição enteral apresentarem cálculo abundante e baixa atividade de cárie (DYMENT et al., 1999), sendo que nos casos de saúde oral precária e alimentação por sonda enteral há maior risco de desenvolvimento de pneumonia por aspiração. Os autores ainda afirmam que para otimizar a saúde bucal e reduzir o risco de pneumonia por aspiração, essa população deve receber atendimento odontológico em intervalos mais frequentes que as crianças alimentadas por via oral. Isto porque alguns estudos (KLEIN & DICKS, 1984; DICKS & BANNING, 1991) demonstram o acúmulo excessivo de cálculo supragengival em pacientes gastrostomizados, inclusive na sonda de alimentação. Klein e Dicks em 1984 mostraram em seu estudo com pacientes mentalmente comprometidos que a formação de cálculo dentário é significativamente mais rápida em pacientes com nutrição enteral, e que a maioria (71%) deste cálculo foi formada nos primeiros 30 dias. Em 1991 Dicks e Banning também relataram uma formação de cálculo

significativamente mais rápida em pacientes com nutrição enteral, embora os níveis de higiene bucal deste grupo tenham sido superiores.

Leibovitz et al. (2003a) apresentaram estudo sobre a colonização da orofaringe por bactérias bucais em pacientes com sonda nasogástrica, revelando uma significativa maior prevalência de bactérias gram-negativas em pacientes alimentados por sonda nasogástrica. Os mesmos autores (LEIBOVITZ et al. 2003b) relataram que a alimentação prolongada por sonda enteral em pacientes idosos está associada à colonização patogênica da orofaringe e a alterações na saliva, aumentando o risco de pneumonia por aspiração. Em 2004 Leibovitz et. al reafirmaram que a alimentação por sonda enteral em pacientes idosos está associada à colonização patogênica da orofaringe, sendo que a aspiração do conteúdo orofaríngeo infectado é a principal causa de pneumonia por aspiração.

Existem vários fatores que levam à contaminação da orofaringe em pacientes em uso de nutrição enteral exclusiva. A diminuição do fluxo salivar pela ausência de contato com os alimentos seria uma das causas principais do aparecimento desses patógenos (PEREIRA, 2007). A diminuição da produção de saliva pode ser um fator que delimita o aumento da colonização de bactérias Gram-negativas (AYARS, ALTMAN, FRETWELL, 1982).

O papel das bactérias orais nas infecções respiratórias tem sido exaustivamente investigado pela comunidade científica. Já em 1999 Scannapieco afirmou que uma associação entre as condições orais como doença periodontal e condições respiratórias severas estavam sendo observadas, e que o dente poderia servir como reservatório para colonização de patógenos respiratórios e subsequente pneumonia nosocomial. Em 2002 Sumi et al. demonstraram que os dentes devem ser

considerados um importante reservatório de microrganismos, os quais podem colonizar a faringe, sendo que o controle da placa bacteriana na prevenção da pneumonia não deve ser subestimado.

A aspiração de agentes patogênicos respiratórios advindos de biofilmes orais para o trato respiratório inferior aumenta o risco de desenvolvimento de uma infecção pulmonar (SCANNAPIECO, 2006; PAJU, SCANNAPIECO, 2007). Além disso, os pacientes podem aspirar produtos inflamatórios a partir de tecidos periodontais inflamados para o trato respiratório inferior, contribuindo para afecção do pulmão. Em 2001 Scannapieco e Ho já haviam demonstrado a associação entre a doença respiratória obstrutiva crônica (DROC) e a doença periodontal, sugerindo a possibilidade de que a doença periodontal poderia contribuir para a DROC.

A microbiota envolvida nas infecções periodontais é de natureza mista, onde diversas espécies microbianas exercem papéis específicos na etiopatogênese dessas condições (FAVERI et al., 2009), destacando-se os anaeróbios Gram-negativos dos gêneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Pseudomonas*, *Aggregatibacter*, *Campylobacter* e *Treponema*, particularmente as espécies *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* (FAVERI et al., 2009; RAMSEIER et al., 2009). Esses microrganismos estabelecem profundas inter-relações ecológicas, que parecem determinar, da mesma forma que as condições imunológicas, o risco de desenvolvimento de quadros infecciosos e inflamatórios periodontais, que poderiam levar à perda de inserção conjuntiva e dos tecidos de suporte dos dentes (SOCRANSKY et al., 1998; WARA-ASWAPATI, et al., 2009; KEBSCHULL, PAPAPANOU, 2011).

Em 1998, Socransky et al. demonstraram que a microbiota bucal poderia ser agrupada em cinco complexos diferentes (complexo laranja, complexo roxo, complexo vermelho, complexo verde, complexo amarelo), sendo que o "complexo vermelho", formado por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, apresenta maior relevância no desenvolvimento das periodontites, além de determinar um prognóstico mais reservado no tratamento de sítios periodontais inflamados colonizados por esses agentes microbianos (WARASWAPATI, et al., 2009; KEBSCHULL, PAPAPANOU, 2011).

White (1997) afirma que os níveis de cálculo e o local de formação são específicos da população e são afetados pelos hábitos de higiene oral, acesso aos cuidados profissionais, dieta, idade, origem étnica, o tempo desde a última limpeza dental, doenças sistêmicas e o uso de medicamentos prescritos. Em relação a medicamentos utilizados e sua relação com as alterações na cavidade oral Turesky, Breuer e Coffman (1992) mostraram que há uma redução estatisticamente significativa de cálculo entre indivíduos medicados com beta-bloqueadores, diuréticos, anticolinérgicos, medicações para tireóide e redutores do ácido úrico, apesar da elevada quantidade de placa presente.

Métodos não invasivos para avaliar o risco de doenças poderiam aumentar a participação em programas de rastreamento e tratamento e melhorar a aderência às intervenções dietéticas e de estilo de vida (SOUKUP et al., 2012).

A análise da composição salivar pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para a localização e avaliação de várias patologias orais e sistêmicas, principalmente quando a correlação entre as concentrações salivares e sanguíneas são elevadas (NAGLER et al., 2002a; NAGLER et al., 2002b).

Uma abordagem para monitorização não invasiva é o uso de biomarcadores salivares. A principal vantagem deste meio é a facilidade de execução, em comparação com aquele utilizado para análise de sangue (MILLER et al., 2010). Os tecidos da cavidade bucal estão em contato permanente tanto com sangue quanto com saliva. Algumas modificações das concentrações de cátions pode ser a consequência de processos patológicos ao nível da área buco-maxilar (GRĂDINARU et al., 2007).

A saliva pode constituir a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e tem efeitos protetores contra microorganismos, toxinas e oxidantes (NAGLER et al., 2002; BATTINO et al., 2002).

A diminuição na produção da saliva como resultado de medicações, doenças orais ou dentais podem levar à colonização da orofaringe com organismos patogênicos (LIEM et al., 1996; JONSSON, HAGA, GORDON, 2000). A contaminação da orofaringe por microorganismo patogênicos pode ser modulada por vários fatores, como a taxa de secreção salivar, a capacidade tampão e os componentes antibacterianos da saliva (MCMURRAY et al., 1977; ANZANO, LAMB, OLSON, 1981).

A mudança no status da mastigação de pacientes submetidos à nutrição enteral causa impacto nos mecanismos de defesa enzimático e não enzimático presentes na saliva (KARINCAOGLU et al., 2005). A ausência do estímulo mastigatório modifica o estado fisiológico da cavidade oral e altera o potencial efeito protetor das enzimas e imunoglobulinas presentes na saliva (LAFORCE et al., 1976).

Sendo assim, com base na breve literatura apresentada, tornou-se necessário avaliar a microbiota bucal e orofaríngea de pacientes com desordens

neurológicas e nutrição enteral, a influência desta dieta sobre os parâmetros bioquímicos salivares, além de estabelecer um protocolo de prevenção em saúde bucal específico para esta população.

Proposição

3 Proposição

Este estudo propôs-se a:

1. Analisar e comparar a microbiota bucal e orofaríngea de pacientes com distúrbios neurológicos e nutrição enteral por sonda de gastrostomia com pacientes alimentados por via oral.
2. Analisar bioquimicamente os níveis de alguns componentes salivares dos pacientes em estudo.
3. Estabelecer um protocolo de higiene bucal para prevenção das doenças bucais em pacientes com distúrbios neurológicos e nutrição enteral, o qual pudesse ser viável e reproduzível.

Material e Método

4 Material e Método

Previamente à realização desta pesquisa o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (Resolução nº 01 de 13/06/1889 do Conselho Nacional de Saúde) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista (Processo FOA- 00953/2010), conforme ANEXO A.

Em seguida foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para a definição da amostra, além de determinação da amostra para cada análise realizada.

4.1 **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

- Critérios de inclusão:
 - Pacientes com desordens neurológicas de acordo com a CID-10 (Classificação Internacional de Doenças), classificados pelo código F70-F79 (Retardo mental).
 - Pacientes com nutrição enteral por sonda de gastrostomia ou jejunostomia.
 - Paciente dentado.

- Critérios de exclusão:
 - O responsável legal pelo paciente não ter aceitado os termos da pesquisa após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
 - O paciente não ter preenchido os requisitos pré-estabelecidos como critérios de inclusão.

4.2 DETERMINAÇÃO DA AMOSTRA DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Foi então definida uma amostra aleatória de pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral, sendo constituído o grupo experimental Gastrostomizados:

- Grupo Gastrostomizados (GGT/ N= 11):
 - Pacientes (N= 6, média de idade 33 anos) com nutrição enteral exclusiva por sonda de gastrostomia, moradores do Hospital Neurológico Ritinha Prates de Araçatuba-SP.
 - Pacientes (N= 5, média de idade 24 anos) com nutrição enteral exclusiva por sonda de gastrostomia, moradores da Casa da Criança de Tupã-SP.

Como grupo controle (GC/ N= 13, média de idade 28 anos) do estudo foram selecionados também, ao acaso, pacientes com distúrbios neurológicos e alimentação por via oral, os quais recebiam dieta normal, triturada ou pastosa. Os pacientes desse grupo eram moradores do Hospital Neurológico Ritinha Prates de Araçatuba-SP.

Dos pacientes do GGT, 36% eram do sexo feminino, enquanto no GC a prevalência foi de 38%. No GGT 54% dos pacientes era traqueostomizado, e no GC todos os pacientes apresentavam respiração normal, por via nasal ou oral. O diagnóstico mais prevalente no GGT foi a tetraplegia espástica (63%), enquanto no GC foi a encefalopatia crônica (30%).

Foram levantados através de anotação em ficha clínica (ANEXO C) o Índice CPOD, Índice de Sangramento Gengival (ISG) e o Índice de Higiene Oral Simplificado (IHOS) dos pacientes do GGT moradores do Hospital Neurológico Ritinha Prates (N=6). Todavia, não foi possível realizar a coleta desses dados nos pacientes do GGT moradores da instituição de Tupã-SP, em virtude da rotina de enfermagem do local. Sendo assim, para estes pacientes (N=5) foi utilizada na análise de resultados somente a condição de saúde bucal no dia das coletas de espécimes clínicos para as análises microbiológicas, conforme Tabelas 1 e 2 (ANEXO H e I, respectivamente), que também apresentam as condições finais após a implementação do protocolo preventivo.

Os dados referentes a diagnósticos clínicos, medicações clínicas, antibioticoterapias e medicações psicotrópicas foram anotados em prontuário (ANEXO B).

4.3 DETERMINAÇÃO DA AMOSTRA DA ANÁLISE

BIOQUÍMICA

Para a análise dos componentes salivares foi necessário estabelecer um novo grupo, composto por indivíduos sem desordens neurológicas. Foram convidados aleatoriamente a participar do presente estudo alguns colaboradores do Hospital Neurológico Ritinha Prates, ficando esta etapa do trabalho com os seguintes grupos experimentais:

- Grupo de pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral
GGT: Grupo Gastrostomizados (N= 11, média de idade 35 anos)

- Grupo de pacientes com desordens neurológicas e alimentação por via oral
GNGT: Grupo Não-Gastrostomizados (N= 13, média de idade 30 anos)

- Grupo Controle: voluntários colaboradores do Hospital Neurológico Ritinha Prates
GC: Grupo Controle (N= 14, média de idade 26 anos)

Na amostra selecionada para esta análise, dos pacientes do GGT, 25% eram do sexo feminino, enquanto no GNGT a prevalência foi de 71% e no GC de 43%.

No GGT 58% dos pacientes era traqueostomizado, e no GNGT assim como no GC todos os pacientes apresentavam respiração normal, por via nasal ou oral. O diagnóstico mais prevalente no GGT foi a tetraplegia espástica (58%), enquanto no GNGT foi a paralisia cerebral clássica (33%). Os voluntários do GC não apresentavam desordens neurológicas.

4.4 COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

Esta etapa foi efetivada por um único pesquisador, sendo a primeira coleta realizada entre os meses de Julho a Dezembro de 2010 e a segunda coleta realizada entre os meses de Julho a Dezembro de 2011.

As coletas (ANEXO F) foram realizadas imediatamente antes do exame clínico das condições dentárias dos pacientes. Para a coleta de saliva, os cuidadores receberam orientação de que os pacientes não poderiam beber, comer (Grupo Controle) ou realizar a higiene bucal uma hora antes da coleta. A coleta foi realizada através da sucção do fluido com seringas descartáveis de 1 ml. A seguir, a saliva foi transferida para meio de transporte VMGA III, segundo Möller (1966), para cultivo microbiológico, e para criotubos contendo água ultrapura Milli Q, que foram armazenados a -196°C, para a extração do DNA bacteriano.

A coleta foi realizada com auxílio de curetas esterilizadas e o biofilme foi transferido para meio de transporte VMGA III e para criotubos contendo água ultrapura MilliQ.

Os espécimes do biofilme subgengival foram obtidos com o uso de cones de papel absorvente esterilizados, após a remoção do biofilme supragengival, dos três sítios periodontais não contíguos com maior profundidade clínica de sondagem e, nos pacientes com periodontite, perda óssea e sangramento gengival. A seguir, depois de permanecerem por 30 segundos no interior dos sulcos gengivais ou bolsas periodontais, os cones de papel foram transferidos para criotubos contendo água ultrapura e para tubos contendo meio de transporte VMGA III (cultivo) e enviadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

As amostras oriundas das mucosas bucais foram coletadas por meio de zaragatoas que foram friccionadas contra o dorso da língua, assoalho de boca, vestibulo bucal e mucosa jugal. No caso das amostras de orofaringe, a zaragatoa deveria alcançar sempre a região mais posterior da mesma. A seguir, como para os demais espécimes clínicos, as zaragatoas utilizadas foram transferidas para meio de transporte VMGA III e para tubos contendo água ultrapura MilliQ.

Após 12 meses da primeira coleta, novos espécimes clínicos foram obtidos para caracterizar as transformações na microbiota bucal com a utilização dos espécimes clínicos dos pacientes para avaliação microbiológica. As amostras clínicas foram mantidas em água ultrapura permaneceram a -196°C até a extração de DNA microbiano, bem como transferidas para meio de transporte VMGA III para minimizar o contato das amostras que foram submetidas à cultura.

Para a análise da concentração dos principais componentes salivares foram coletadas amostras de saliva de acordo com a técnica preconizada por Chaves Neto (2005). A saliva total não estimulada foi coletada entre 8:00 e 10:00 horas. No dia da coleta a higiene oral dos pacientes foi realizada apenas com água, escova e fio

dental, sem a utilização de produtos fluoretados. Os pacientes estavam em jejum de pelo menos duas horas.

O fluido salivar presente no assoalho bucal foi aspirado através de um cateter de plástico macio evitando-se, através de manobras bem suaves, sob sucção leve. O cateter empregado para a coleta estava conectado a um frasco de vidro estéril e lacrado, que também estava conectado a uma bomba de vácuo (ANEXO G).

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

Após a primeira coleta foi estabelecido e executado um protocolo de prevenção para promoção de saúde bucal nos pacientes com nutrição enteral. Após 12 meses de execução do protocolo a segunda coleta de espécimes clínicos para análise microbiológica foi realizada, além da coleta de saliva para a análise bioquímica.

4.5 PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO

a Através de Cultura

Os espécimes clínicos foram processados dentro de um prazo de 4 horas de sua coleta. Os espécimes mantidos em tubos contendo meio de transporte VMGA III foram submetidos a diluições seriadas em solução de VMG I, para minimizar o contato dos microrganismos com o oxigênio atmosférico. Dessas diluições, alíquotas

de 0,1 ml foram inoculadas em placas contendo os seguintes meios de cultura e submetidos às seguintes condições de incubação (GAETTI-JARDIM JR. et al., 2012):

a) ágar de tripticaseína de soja (TAA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo, incubado em aerobiose, a 37° C, por 2 e 3 dias para isolamento de aeróbios e facultativos;

b) ágar Sabouraud Dextrose acrescido de 100µg/mL de cloranfenicol, incubado em aerobiose, a temperatura ambiente, por 3-7 dias para o isolamento de leveduras.

c) ágar MacConkey, a 37° C, por 2 e 3 dias para isolamento de microrganismos entéricos.

Após o isolamento dos microrganismos e obtenção de cultura pura, foram realizadas as análises morfo celular e morfo colonial dos mesmos, além do teste respiratório, para caracterizar o relacionamento dos diferentes microrganismos com o oxigênio atmosférico, e prova da catalase. A seguir procedeu-se à identificação em nível de gênero e, quando possível, nível de espécie dos isolados. A identificação microbiana foi realizada através de análise morfo colonial, morfo celular e bioquímica.

b Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q, bem como o DNA dos microrganismos isolados por cultura, foi extraído através do “kit” RTP Spin Bacteria DNA (Invitex, GmbH, Berlin, Alemanha) segundo as especificações do

fabricante e o DNA foi mantido a -196°C , até a realização das reações de amplificação. As concentrações de DNA bacteriano foram determinadas em espectrofotômetro ($A_{260\text{ nm}}$). A presença de membros da família *Enterobacteriaceae* e dos principais microrganismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos oportunistas (*Eikenella corrodens*¹, *Parvimonas micra*², *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), além dos membros da classe *Mollicutes* e *Candida albicans* também foi avaliada por PCR (ASHIMOTO, et al., 1996), com iniciadores e condições de amplificação do DNA específicas para cada microrganismo (ANEXO J).

A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que varia de 30 s. a 2 min., 72°C (30s. a 2 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA.

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e fotografados sobre transiluminador de luz UV. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP).

¹*E. corrodens*, anaeróbio facultativo de cultivo exigente.

²*Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*: anaeróbios obrigatórios.

4.6 PROCESSAMENTO DOS COMPONENTES

SALIVARES

Na análise foram avaliadas as concentrações dos principais componentes salivares a fim de elucidar as seguintes hipóteses:

- A nutrição enteral altera o fluxo salivar.
- A nutrição enteral modifica a composição química da saliva.

No material biológico coletado foram levantadas as concentrações de cálcio, fósforo, ácido úrico, proteínas totais salivares, magnésio e atividade de amilase.

Foram utilizados para análise dos componentes salivares avaliados no estudo os Kits Comerciais da Labtest® sendo para o cálcio o CA Arzenazo Liquiform (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), para o fósforo o Fósforo UV Liquiform (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com a metodologia de Daly e Ertingshausen modificada (DALY & ERTINGSHAUSEN, 1972).

Para a avaliação da atividade de amilase foi utilizado o kit Amilase CNPG Liquiform (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com a metodologia do substrato Gal-G2- α -CNP (BIOCHE, 1999), para obter a concentração de ácido úrico o Ácido Úrico Liquiform (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com a metodologia Enzimático-Trinder.

Para as proteínas totais salivares foi utilizado o kit Proteínas Totais (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com a metodologia Biureto e para o magnésio o Magnésio (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com metodologia da Labtest.

4.7 PROTOCOLO DE PREVENÇÃO

O protocolo de prevenção em saúde bucal (ANEXO D) estabelecido para os pacientes do Grupo Gastrostomizados foi executado após a primeira coleta de material para análise microbiológica e consistiu de:

- a. Consulta odontológica mensal, na qual era realizada raspagem e aplainamento corono-radicular, com equipamento Profi II Dabi Atlante, uso de fio-dental e finalização com limpeza bucal utilizando-se gaze embebida em enxaguante bucal a base de digluconato de clorexidina a 0,12% com xilitol a 5%.
- b. Escovação dentária diária com creme dental para controle de cálculo (1x/dia), realizada pela equipe de enfermagem no período da tarde.
- c. Higiene oral com enxaguante bucal digluconato de clorexidina a 0,12% com xilitol a 5% (2x/dia), realizada pela equipe de enfermagem pela manhã e à noite.

O protocolo (ANEXO E) estabelecido foi proposto para as duas instituições participantes do estudo, porém a Casa da Criança de Tupã não realizou as atividades solicitadas, tendo mantido a sua rotina já estabelecida de higiene oral. Somente os seis pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral do Hospital Neurológico Ritinha Prates participaram das atividades do protocolo de prevenção proposto, o qual continua sendo executado na instituição.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados foram utilizados os testes de correlação de Pearson, Spearman e Kendall, com níveis de significância de 1% e 5%, de acordo com o critério estabelecido.

Resultados

5 Resultados

5.1 AValiação Clínica

Os dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 (ANEXOS H e I, respectivamente) evidenciam a precariedade das condições de saúde bucal dos pacientes do GC, em virtude da presença de grande quantidade de biofilme bucal e sangramento gengival, muito prevalentes em pacientes com distúrbios neurológicos e alimentação por via oral. É possível observar ainda que os pacientes do GGT apresentavam grande acúmulo de cálculo dentário. Nessa mesma linha, a instituição do protocolo preventivo produziu melhorias clínicas significativas no grupo GGT, que apresentavam condições iniciais menos favoráveis.

A análise dos dados clínicos através dos testes de correlações de Pearson, teste de Spearman e o teste de Kendall evidenciou que os indivíduos com mais idade apresentavam o CPOD mais elevado ($p < 0,05$), bem como maior ISG, tanto antes quanto após o protocolo preventivo ($p < 0,01$). Os índices CPOD e ISG também se mostraram associados ao índice IHOS, onde os detentores de melhores condições de higiene foram os que apresentavam menor CPOD e ISG, antes e depois do acompanhamento realizado.

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA POR CULTURA

Os resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam inicialmente a ocorrência de leveduras era significativamente mais frequente entre os pacientes gastrostomizados, em relação ao grupo controle (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), enquanto a ocorrência dos integrantes da família *Enterobacteriaceae* não diferiu, entre os grupos, significativamente, no início do experimento. Após a instauração do protocolo preventivo de higienização, observou-se uma pronunciada redução na ocorrência de Leveduras Totais e uma elevação na presença de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$).

Tabela 4: Ocorrência de Leveduras Totais e a família *Enterobacteriaceae* por amostra nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

Grupos	Leveduras Totais N (%)		Família <i>Enterobacteriaceae</i> N (%)	
	A*	B**	A	B
GGT (n=11)	49 (89,0) ¹	0 (0,0) ³	10 (18,1) ⁵	35 (63,6) ⁷
GC (n=13)	29 (46,0) ²	21 (32,8) ⁴	5 (7,6) ⁶	14 (21,5) ⁸

*: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

** : segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

x= Total de dados válidos: ¹=55 amostras, ²=63 amostras, ³=54 amostras, ⁴=64 amostras, ⁵=55 amostras, ⁶=55 amostras, ⁷=65 amostras, ⁸=65 amostras.

A Tabela 5 evidencia, separando por espécime clínico, que a ocorrência de leveduras, no início do experimento, é maior no grupo dos pacientes gastrostomizados em relação ao controle, mas essa diferença se inverte com a instituição dos protocolos preventivos (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$). A significância estatística, considerando-se os espécimes clínicos isoladamente, é menor em função do pequeno número de amostras do grupo de pacientes estudados.

Tabela 5: Ocorrência de Leveduras Totais nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	Leveduras Totais N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A*	B*	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	5(45,4)	0(0,0)	11(100,0)	0(0,0)	11(100,0)	0(0,0)	11(100,0)	0(0,0)	11(100,0)	0(0,0)
GC (n=13)	8(61,5)	4(30,7)	8(61,5)	6(46,1)	6(46,1)	3(23,0)	5(38,4) ^a	5(38,4)	2(16,6) ^a	3(25,0)

*: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

** : segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= 12 amostras.

Os dados apresentados na Tabela 6 carecem de significância estatística quando avaliados isoladamente, em função do número pequeno de amostras de cada espécime clínico, mas que, quando reunidos, mostram um aumento na colonização por microrganismos entéricos da família *Enterobacteriaceae* após a instituição dos protocolos preventivos.

Tabela 6: Ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae* nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	Família <i>Enterobacteriaceae</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A*	B**	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	1(9,0)	8(72,7)	2(18,1)	9(81,8)	4(36,3)	9(81,8)	2(18,1)	5(45,4)	1(9,0)	4(36,3)
GC (n=13)	3(23,0)	4(30,7)	1(7,6)	3(23,0)	1(7,6)	4(30,7)	0(0,0)	2(15,3)	0(0,0)	1(7,6)

*: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

** : segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA POR PCR

Os resultados estão apresentados em forma de tabelas, contemplando a presença de microorganismos do complexo vermelho de Socransky, ligados à presença de doenças periodontais e os demais microorganismos estudados nos diferentes espécimes clínicos coletados.

A Tabela 7 é referente aos anaeróbios Gram-negativos que compõem o complexo vermelho de Socransky, onde se verifica que a ocorrência de *P. gingivalis* é maior no grupo controle do que entre os pacientes gastrostomizados (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), enquanto a ocorrência de *T. forsythia* e *T. denticola* mostrou-se semelhante nos dois grupos.

Tabela 7 – Ocorrência de microrganismos do complexo vermelho de Socransky nos pacientes do Grupo Gastrostomizados e Grupo Controle. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos.

Grupos	Microrganismo N (%) ^x		
	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>T. denticola</i>
GGT (n=11)	12 (10,9) ¹	14 (12,7) ³	53 (48,1) ⁵
GC (n=13)	51 (39,5) ²	21 (16,4) ⁴	82 (63,5) ⁶

^x= Total de dados válidos: ¹=110 amostras, ²=129 amostras, ³=110 amostras, ⁴=128 amostras, ⁵=110 amostras, ⁶=129 amostras.

Para os demais microrganismos avaliados por PCR, observa-se, na Tabela 8, que entre os pacientes gastrostomizados há maior ocorrência de *E. corrodens*, mas uma menor presença de *P. nigrescens* (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), não tendo sido detectadas diferenças significantes para os demais microrganismos.

Tabela 8 – Ocorrência dos microrganismos avaliados nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle. Dados referentes a todos os espécimes clínicos reunidos.

Grupos	Microrganismos N (%) ^x					
	<i>C. albicans</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>P. micra</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>P. nigrescens</i>
GGT (n=11)	12 (10,9) ¹	59 (53,6) ³	38 (34,8) ⁵	0 (0,0) ⁷	25 (26,3) ⁹	10 (9,0) ¹¹
GC (n=13)	19 (14,6) ²	31 (25,0) ⁴	32 (26,4) ⁶	2 (1,5) ⁸	34 (26,9) ¹⁰	37 (29) ¹²

^x= Total de dados válidos: ¹=110 amostras, ²=130 amostras, ³=110 amostras, ⁴=124 amostras, ⁵=109 amostras, ⁶=121 amostras, ⁷=110 amostras, ⁸=129 amostras, ⁹=95 amostras, ¹⁰=126 amostras, ¹¹=110 amostras, ¹²=129 amostras

Os dados relativos à ocorrência de *C. albicans*, obtidos por PCR (Tabela 9), são complementares aos dados apresentados nas Tabelas 4 e 5, obtidos por cultura. Comparando-se essas tabelas é possível verificar que muitas das amostras positivas por PCR para *C. albicans* também apresentavam outras espécies de levedura, que foram designadas, coletivamente, nas tabelas anteriores, de “leveduras totais”. Considerando-se apenas os dados de *C. albicans*, o protocolo preventivo não interferiu significativamente com a ocorrência e distribuição desse patógeno oportunista.

Tabela 9 – Ocorrência de *C. albicans* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>C. albicans</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(27)	0(0,0)	2(18,1)	3(27,2)	1(9,0)	2(18,1)	1(9,0)
GC (n=13)	1(7,6)	1(7,6)	2(15,3)	1(7,6)	1(7,6)	1(7,6)	3(23,0)	1(7,6)	4(31)	4(30,7)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

Quando os resultados para cada um dos principais anaeróbios do complexo vermelho são individualizados, como a Tabela 10 para *P. gingivalis*, Tabela 11 para *T. forsythia* e Tabela 12 para *T. denticola*, verifica-se que o biofilme microbiano, supra e subgingival são as principais fontes de contaminação da saliva, mucosa e orofaringe dos pacientes [Teste de Correlação de Spearman ($p < 0,05$ a $p < 0,01$)].

Para *P. gingivalis* (Tabela 10), a ocorrência nos pacientes gastrostomizados esteve basicamente restrita aos biofilmes e saliva, enquanto no

grupo controle esse anaeróbio produtor de pigmento preto pode ser detectado em parcela bastante significativa das amostras de orofaringe e mucosa. Em função do pequeno número de amostras não foi possível determinar se a instituição de um protocolo preventivo de atendimento e higienização teve influência sobre a presença desse anaeróbio nos grupos estudados.

Tabela 10 – Ocorrência de *P. gingivalis* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>P. gingivalis</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	3(27,2)	1(9,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(9,0)	3(27,2)	0(0,0)	2(18,1)	2(18,1)
GC (n=13)	3(23,0)	6(46,1)	4(30,7)	5(38,4)	6(46,1)	6(46,1)	5(41,6) ^a	5(38,4)	7(53,8)	4(30,7)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras

Para *T. forsythia* o mesmo fenômeno relatado para *P. gingivalis* pode ser observado, mas, nesse caso, sem diferenças entre os dados obtidos dos pacientes gastrostomizados e do grupo controle (Tabela 11). Da mesma forma, em função do número de amostras não foi possível concluir, para *T. forsythia* e *T. denticola*, os efeitos do protocolo de higiene bucal.

Tabela 11 – Ocorrência de *T. forsythia* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>T. forsythia</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(9,0)	0(0,0)	1(9,0)	3(27,2)	3(27,2)	4(36,3)	2(18,1)
GC (n=13)	2(15,3)	1(7,6)	1(7,6)	0(0,0)	1(7,6)	1(7,6)	1(9,0) ^a	2(15,3)	7(53,8)	5(38,4)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 11 amostras

Para *T. denticola* (Tabela 12), observou-se um aumento na ocorrência desse microrganismo após a implementação do protocolo preventivo, principalmente nas amostras oriundas de orofaringe, mucosa (teste de Qui-quadrado, $p < 0,01$) e biofilme supragengival (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), mas esse aumento só se faz presente nos dados do grupo de gastrostomizados.

Tabela 12 – Ocorrência de *T. denticola* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>T. denticola</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	3(27,2)	3(27,2)	3(27,2)	5(45,4)	6(54,5)	9(81,8)	3(27,2)	9(81,8)	5(45,4)	7(63,6)
GC (n=13)	5(38,4)	7(53,8)	7(53,8)	6(46,1)	5(38,4)	11(84,6)	10(83,3) ^a	8(61,5)	12(92,3)	11(84,5)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras

A ocorrência de *E. corrodens* (Tabela 13) foi significativamente maior nos pacientes gastrostomizados, em comparação com o grupo controle, sendo que observou-se um aumento dessa distribuição no grupo especial após a implementação do protocolo preventivo (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), a despeito das modestas dimensões da amostra.

Tabela 13 – Ocorrência de *E. corrodens* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>E. corrodens</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	2(18,1)	8(72,7)	3(27,2)	9(81,8)	2(18,1)	10(90,9)	5(45,4)	10(90,9)	2(18,1)	8(72,7)
GC (n=13)	0(0,0)	3(23,0)	3(25,0) ^a	4(30,7)	1(7,6)	1(7,6)	3(30,0) ^b	8(61,5)	4(36,3) ^c	4(30,7)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras, ^b= somente 10 amostras, ^c= somente 11 amostras

No caso da classe *Mollicutes*, observa-se (Tabela 14) que sua distribuição nos dois grupos de pacientes é semelhante, em quase todos os espécimes clínicos, com exceção da orofaringe, onde sua ocorrência é significativamente mais elevada no grupo de gastrostomizados (teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$), independentemente do protocolo instituído.

Tabela 14 – Ocorrência de *Mollicutes* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>Mollicutes</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	2(18,1)	1(9,0)	3(27,2)	5(45,4)	7(63,6)	8(72,7)	1(9,0)	5(45,4)	5(45,4)	1(10,0) ^e
GC (n=13)	2(15,3)	2(16,6) ^a	5(38,4)	3(30,0) ^b	5(38,4)	1(8,3) ^c	2(16,6) ^d	5(38,4)	4(30,7)	3(27,2)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras, ^b= somente 10 amostras, ^c= somente 12 amostras, ^d= somente 12 amostras, ^e= somente 10 amostras

Outros microrganismos, como os anaeróbios Gram-positivos da espécie *P. micra*, foram raramente detectados, nos pacientes de ambos os grupos, como apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 – Ocorrência de *P. micra* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>P. micra</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
GC (n=13)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0) ^a	1(7,6)	0(0,0)	1(7,6)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras

A ocorrência de *P. intermedia*, outro anaeróbio Gram-negativo periodontopatogênico, foi semelhante nos dois grupos de pacientes, sendo que o protocolo preventivo reduziu sua distribuição nas amostras de biofilme e saliva, onde é encontrado com maior frequência (Tabela 16). Para *P. nigrescens* essas relações não foram detectadas, mas sua ocorrência foi reduzida no grupo controle, sendo que entre os pacientes gastrostomizados sua distribuição foi bastante restrita (Tabela 17).

Tabela 16 – Ocorrência de *P. intermedia* nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>P. intermedia</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	5(50,0) ^a	1(9,0)	2(22,2) ^c	1(9,0)	0(0,0)	3(27,2)	3(27,2)	0(0,0)	7(70,0) ^e	3(27,2)
GC (n=13)	3(30,0) ^b	1(7,6)	3(23,0)	1(7,6)	0(0,0)	1(7,6)	6(50,0) ^d	4(30,7)	9(69,2)	6(46,1)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 10 amostras, ^b= somente 10 amostras, ^c= somente 9 amostras, ^d= somente 12 amostras, ^e= somente 10 amostras

Tabela 17 – Ocorrência de *P. nigrescens* por amostra nos grupos Gastrostomizados e grupo Controle antes e 12 meses após o início do protocolo de prevenção. Agrupados todos os resultados obtidos com os diferentes espécimes clínicos por amostras coletadas.

Grupo	<i>P. nigrescens</i> N (%)									
	Saliva		Mucosa		Orofaringe		Biofilme Supra		Biofilme Sub	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GGT (n=11)	1(9,0)	1(9,0)	0(0,0)	2(18,1)	1(9,0)	2(18,1)	1(9,0)	0(0,0)	1(9,0)	1(9,0)
GC (n=13)	1(7,6)	0(0,0)	4(30,7)	1(7,6)	2(15,3)	1(7,6)	9(75,0) ^a	5(38,4)	9(69,2)	5(38,4)

A: primeira coleta, realizada antes do início do protocolo de prevenção.

B: segunda coleta, realizada 12 meses após o início do protocolo de prevenção.

^a= somente 12 amostras

Quanto aos dados microbiológicos, os testes de correlação de Pearson, Spearman e Kendall mostraram resultados similares e evidenciaram associações estatisticamente significativas entre a composição da microbiota estudada e os demais parâmetros.

Inicialmente, verificou-se uma estabilidade de colonização da maioria dos microrganismos testados, onde a ocorrência nas amostras iniciais estava normalmente associada à presença dos mesmos nas amostras finais, mesmo com a implementação do protocolo preventivo.

Pelo teste de correlações de Pearson e os testes de Spearman e Kendall verifica-se relação inversa entre a presença de *P. intermedia* na saliva, mucosa e biofilme e o índice de IHOS, tanto antes como depois da instituição do protocolo, o mesmo tendo sido observado para *P. gingivalis* (teste de correlações, $p < 0,05$ a $p < 0,01$). A ocorrência desses anaeróbios também mostrou-se mais elevada em indivíduos de mais idade, o mesmo ocorrendo com a presença subgingival e supragingival de *P. gingivalis* e *T. forsythia* (teste de correlações de Pearson, $p < 0,01$) e a ocorrência de *E. corrodens* no sulco (teste de correlações de Pearson, $p < 0,01$). A presença de *T. forsythia* ainda foi potencializada pelo consumo de medicamentos com ação psicotrópica (teste de correlações de Spearman, $p < 0,05$).

E. corrodens ainda teve sua presença na cavidade bucal potencializada pelo consumo de medicamentos psicotrópicos ou com atividade antimicrobiana (teste de correlações de Pearson, $p < 0,01$).

Não foram observadas associações entre as espiroquetas da espécie *T. denticola* e os parâmetros clínicos avaliados.

A presença de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento preto (*P. intermedia*, *P. nigrescens* ou *P. gingivalis*) no sulco gengival, biofilme supragengival e saliva esteve ligada à presença de sangramento gengival (teste de correlações, $p < 0,05$), sendo que a presença de *P. intermedia* também foi mais frequente nos pacientes com CPOD mais elevado no final do período de estudo (teste de correlações de Spearman, $p < 0,05$).

O consumo de drogas antimicrobianas esteve associado à presença de membros da família *Enterobacteriaceae* (teste de correlações de Spearman, $p < 0,01$) e de *P. nigrescens* (teste de correlações de Spearman, $p < 0,05$), a qual também esteve associada a sangramento gengival.

A utilização de medicação psicotrópica mostrou associação negativa com a ocorrência de leveduras na boca dos pacientes (teste de correlações, $p < 0,01$) e a ocorrência dessas leveduras foi mais elevada nos pacientes com maior índice CPOD (teste de correlações de Spearman, $p < 0,01$). Por outro lado, esses fungos foram mais frequentes em pacientes idosos, com maior CPOD final e com higiene oral mais precária (teste de correlações de Spearman, $p < 0,01$).

Os microrganismos da classe *Mollicutes* mostraram relação positiva com o consumo de drogas com efeitos psicotrópicos (teste de correlações de Kendall, $p < 0,01$) e antimicrobianos/antibióticos sistêmicos (teste de correlações de Kendall, $p < 0,01$) e ainda com sangramento gengival (teste de correlações de Pearson, $p < 0,01$).

5.4 ANÁLISE DOS COMPONENTES SALIVARES

Para avaliação dos resultados desta análise deve ser considerada a legenda a seguir:

- CG: Control Group (Grupo Controle)
- NTFG: Non Tube-fed Group (Grupo Não-Gastrostomizados)
- TFG: Tube-Fed Group (Grupo Gastrostomizados)

Os resultados estão apresentados em forma de gráficos e tabelas, contemplando o fluxo salivar e a concentração dos componentes salivares analisados nas amostras coletadas dos voluntários do grupo controle (CG), pacientes com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e dos pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). De acordo com o gráfico a seguir, não houve diferença significativa na taxa de fluxo salivar entre os grupos avaliados.

a. Fluxo salivar (mL/min):

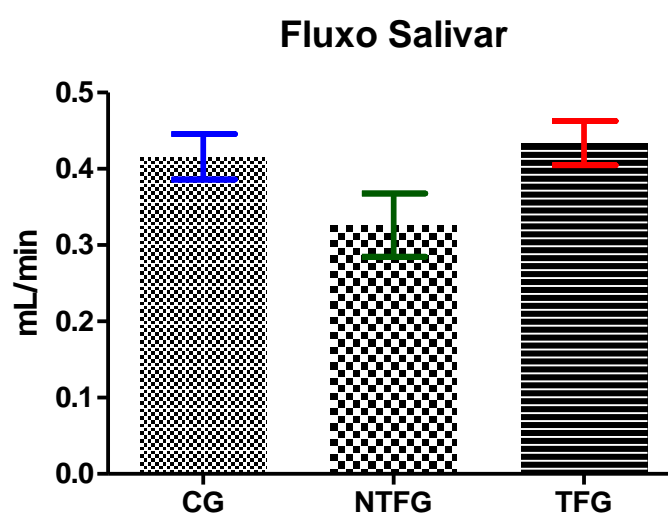


Fig.1. Fluxo salivar de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. Não significativo entre os grupos.

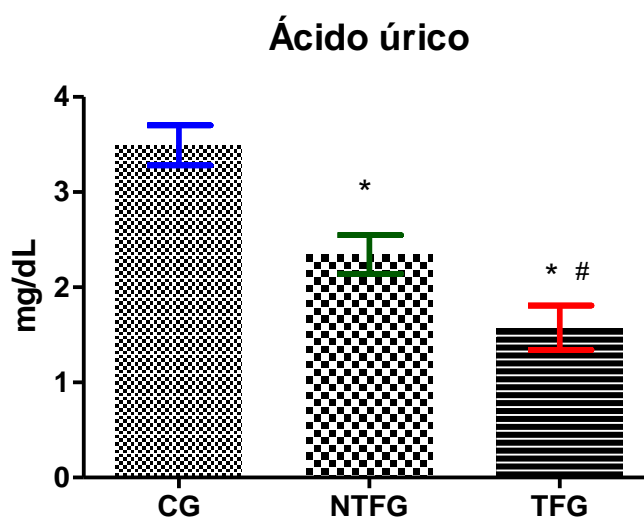
b. Concentração de ácido úrico (mg/dL)

Fig.2. Concentração de ácido úrico de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação a CG; # $p < 0,05$ em relação a NTFG.

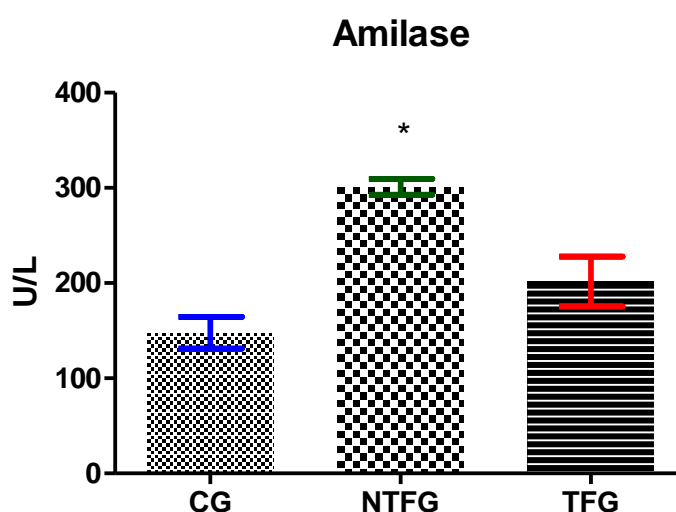
c. Concentração de amilase salivar (U/L)

Fig.3. Atividade da amilase de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação a CG e TFG; Não significativo TFG em relação a CG.

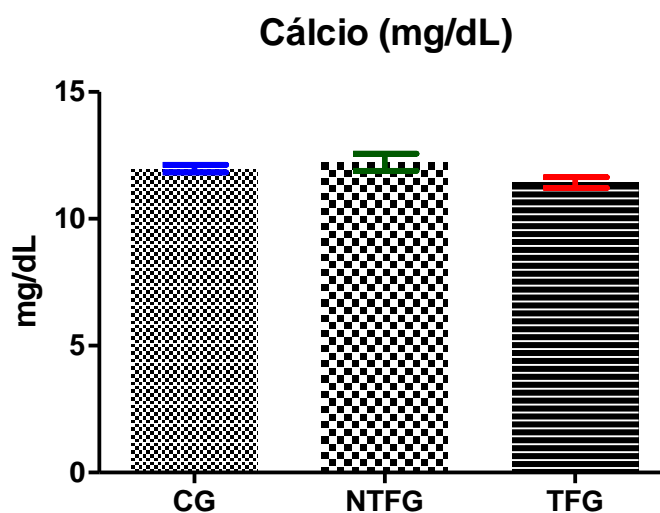
d. Concentração de cálcio (mg/dL):

Fig.4. Concentração de cálcio de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. Não significativo entre os grupos.

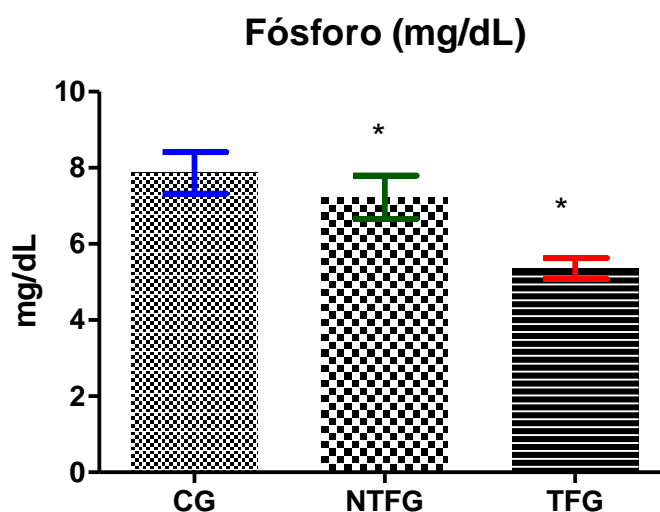
e. Concentração de fósforo (mg/dL):

Fig.5. Concentração de fósforo de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação a CG.

f. Concentração de magnésio (mg/dL):

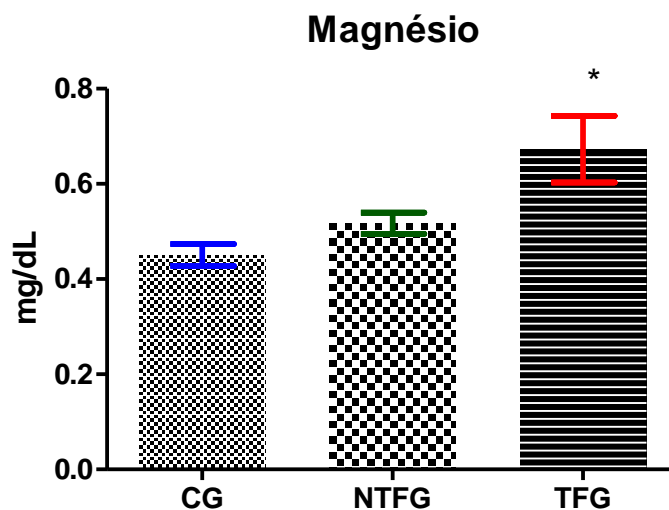


Fig.6. Concentração de magnésio de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação a CG e NTFG; Não significativo NTFG em relação a CG.

g. Concentração de proteínas totais (g/dL):

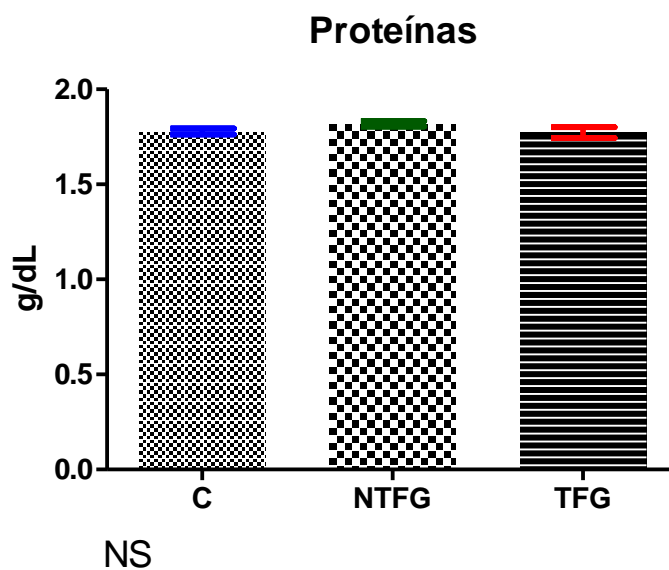


Fig.7. Concentração de proteínas totais de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG). Valores expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA com Teste de Tukey. Não significativo entre os grupos.

Os pacientes do grupo gastrostomizados apresentaram atividade de amilase (37% de aumento em TFG, quando comparado somente a GC, com $p < 0,05$) e magnésio (49% e 30% mais elevado em TFG em relação a CG e NTFG, com $p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente) significativamente elevada, enquanto as concentrações de ácido úrico (redução de 220% e 150% em TFG, contra CG e NTFG, respectivamente) estavam reduzidas no mesmo grupo. De acordo com a Tabela 18 é possível observar a acentuação dos parâmetros salivares nos pacientes com nutrição enteral.

Tabela 18. Média e erro padrão da média de parâmetros bioquímicos da saliva total não estimulada a partir de indivíduos sem desordens neurológicas (CG), com desordens neurológicas e alimentação por via oral (NTFG) e com desordens neurológicas e nutrição enteral (TFG).

Parâmetros	GC(n=14)	NTFG(n=15)	TGF(n=15)
Taxa de Fluxo Salivar (ml/min)	0,416 ± 0,030	0,327 ± 0,041	0,0434 ± 0,029
Proteína total salivar (g/dL)	1,778 ± 0,016	1,818 ± 0,014	1,773 ± 0,028
Amilase (U/L)	147,8 ± 16,70	301,1 ± 8,32*	201,6 ± 26,08*
Ácido úrico (mg/dL)	3,493 ± 0,210	2,344 ± 0,204*	1,575 ± 0,233*, †
Cálcio (mg/dL)	11,98 ± 0,151	12, 23 ± 0,338	11,43 ± 0,211
Fósforo (mg/dL)	7, 868 ± 0,543	7, 228 ± 0,571	5,351 ± 0,275*, †
Magnésio (mg/dL)	0,451 ± 0,023	0, 517± 0,022	0,673 ± 0,070*, †

* $P < 0,05$ versus CG; † $P < 0,05$ versus NTFG

Discussão

6 Discussão

Na última década o cirurgião-dentista passou a vivenciar uma rotina pouco comum no segmento odontológico: trabalhar em equipe multidisciplinar, em instituição de saúde especializada em cuidados crônicos ou de cunho hospitalar, com pacientes extremamente dependentes na realização de suas atividades de vida diária, tais como alimentação, vestuário e principalmente atividades de higiene corporal e higiene oral.

Nestes locais, a importância do atendimento odontológico profissional e da motivação da equipe de enfermagem para a realização de uma atividade de higiene bucal diária e supervisionada é indispensável (MOJON, 2002; ABE et al., 2006; ADACHI et al., 2007; SARIN et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2008; BASSIM et al., 2008). Em se tratando do paciente com desordens neurológicas, que em sua maioria ainda apresenta outras deficiências associadas, como a auditiva, visual, perda total ou parcial da fala, além de movimentos involuntários bruscos, solicitar a realização da higiene bucal pode, por vezes, determinar o início de uma “sessão de tortura”, tanto para o paciente quanto para o seu “algoz” cuidador, em virtude da não colaboração do paciente ou até mesmo da desmotivação da equipe.

Ainda que exista um empenho por parte da equipe odontológica e de enfermagem dentro do ambiente hospitalar ou institucional na promoção de saúde

bucal de pacientes dependentes, é fato que alguns pacientes, que não se alimentam por via oral, por terem sido submetidos à cirurgia de gastrostomia ou jejunostomia, a fim de terem providas as suas necessidades nutricionais que outrora não mais o eram pela via oral normal, muitas vezes apresentam um peculiar e muito característico acúmulo de cálculo dentário, de cor amarelo-claro a ouro, bastante enrijecido e aderido às superfícies dentárias, recobrando faces lisas e oclusais, sendo de difícil remoção com instrumento cortante manual e destacando-se como placas quando do uso de ponta ultrassônica. Indagações sobre esta alteração surgiram principalmente pelo fato desses pacientes não mais se alimentarem pela boca, mas ainda assim apresentarem acúmulo de cálculo dentário abundante, apesar do pouco ou nenhum acúmulo de biofilme bucal e da baixa atividade de cárie dentária (DYMENT et al., 1999).

Em nosso estudo, o protocolo de prevenção instituído evidenciou uma melhora clínica bastante acentuada (Tabelas 1 e 2, ANEXO H e ANEXO I, respectivamente), o que reduziu significativamente a prevalência de leveduras nos pacientes do GGT, corroborando com inúmeros trabalhos na literatura que avaliaram a redução de microrganismos patogênicos após a instituição de protocolos de saúde bucal (MOJON, 2002; ABE et al., 2006; ADACHI et al., 2007; SARIN et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2008; BASSIM et al., 2008). No entanto os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* não apresentaram tanta sensibilidade ao protocolo, de forma semelhante ao que observaram Leibovitz et al. em 2003 (a).

A ocorrência de leveduras no início do experimento foi maior no GGT em relação ao GC, mas essa diferença se inverte com a instituição dos protocolos preventivos. Considerando-se apenas os dados de *C. albicans* obtidos por PCR, o

protocolo preventivo não interferiu significativamente com a ocorrência e distribuição desse patógeno.

Apesar da instituição do protocolo de prevenção houve um aumento na colonização por microrganismos entéricos da família *Enterobacteriaceae*.

A ocorrência de *P. gingivalis* maior no GC do que entre os pacientes do GGT provavelmente está relacionada à presença de biofilme dental, a qual está diretamente ligada à presença de resíduos alimentares na cavidade oral.

Nos resultados apresentados em relação aos principais anaeróbios do complexo vermelho de Socransky, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, a importância do biofilme microbiano, supra e subgingival como principais fontes de contaminação da saliva, mucosa e orofaringe dos pacientes ficou evidente.

Em função do pequeno número de amostras não foi possível determinar se a instituição de um protocolo preventivo de atendimento e higienização teve influência sobre a presença de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* nos grupos estudados.

Em relação à classe *Mollicutes*, sua ocorrência foi significativamente mais elevada no GGT do que no GC. Para *P. intermedia* foi possível notar que o protocolo preventivo reduziu sua distribuição nas amostras de biofilme e saliva, onde é encontrado com grande frequência. Já *P. micra*, e *P. nigrescens* tiveram uma distribuição bastante restrita entre os pacientes gastrostomizados.

O uso de medicações clínicas, antibióticos e psicotrópicos mostrou correlação positiva com a presença de *T. forsythia*, *Mollicutes* e *E. corrodens*, tanto nos pacientes do GGT quanto dos pacientes do GC.

Segundo Brown (2007), a pneumonia é uma das infecções sérias mais comuns, causando morbidade e mortalidade significantes, ambas em indivíduos

saudáveis e debilitados. O autor ainda afirma que qualquer método de prevenção da pneumonia deve ter um benefício substancial e implicações importantes para os cuidados de saúde prestados.

Neste estudo, a instituição de um protocolo de prevenção em saúde bucal apresentou resultados clínicos satisfatórios e foi efetivo no controle de algumas espécies microbianas, reduzindo o conteúdo bucal e orofaríngeo contaminado, e podendo colaborar com a redução do risco de pneumonia aspirativa nos pacientes com distúrbios neurológicos e nutrição enteral, podendo melhorar a qualidade e expectativa de vida destes indivíduos (SCANNAPIECO & HO, 2001; SCANNAPIECO, 2006; PAJU & SCANNAPIECO, 2007).

A facilidade de armazenamento e coleta não-traumática são aspectos atraentes da saliva, especialmente para crianças e pacientes com distúrbios neurológicos, quando possíveis repetições de coletas são necessárias. A composição da proteína salivar reflete também o processamento do sinal celular que resulta da influência diária do meio ambiente, bem como a partir de estresse agudo ou crônico (CHAVES NETO et al., 2011).

O ácido úrico é o produto de degradação terminal do catabolismo da purina e contribui para a capacidade antioxidante do sangue e de saliva. No entanto, a enzima responsável por sua produção também gera radicais livres e vários estudos têm mostrado que o ácido úrico pode agir como um agente pró-inflamatório e pró-oxidante (LIPI et al., 2008). Soukup et al. (2012) observaram a concentração de ácido úrico salivar significativamente elevada em pacientes com síndrome metabólica e sugerem que o mesmo pode ser um biomarcador útil para o monitoramento não-invasivo de risco cardiometabólico. Leibovitz et al. (2003), em um estudo comparando pacientes idosos com e sem nutrição enteral obtiveram maiores

concentrações salivares de sódio, cloreto e amilase nos indivíduos que estavam com nutrição enteral exclusiva, enquanto os valores de fósforo, magnésio e ácido úrico foram menores neste grupo. Em 2004 os mesmos autores mostraram uma redução de 50% dos níveis de ácido úrico em pacientes alimentados por tubo naso-gástrico.

A análise de traços de metais na saliva ainda tem alguns problemas, tais como diferentes composições salivares, frequente contaminação de amostras por sangue, concentrações muito baixas de analitos, a falta de um método padrão de análise, e a ausência de valores de referência confiáveis (BARBOSA et al, 2005; ESTEBAN e CASTANO, 2009). Há variações das concentrações de cátions salivares em diferentes estados fisiológicos ou patológicos. Tem sido demonstrado que os pacientes com periodontite apresentam conteúdo de cálcio diminuído na saliva da parótida (KURANER et al., 1991).

O magnésio e outros cátions bivalentes têm ações importantes a nível celular. O Mg^{+2} é necessário para uma gama muito ampla de reações celulares, incluindo todas as transferências de fósforo, e a sua privação inibe todos os componentes da resposta coordenada (GRĂDINARU et al., 2007).

A ingestão da saliva e posteriormente a sua absorção no trato intestinal inicia um círculo vicioso entre a secreção salivar de fosfato e absorção de fosfato em jejum, agravando assim a hiperfosfatemia, a qual está associada à calcificação cardiovascular e aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (SAVICA et al., 2011).

Em nosso estudo os pacientes do grupo gastrostomizados apresentaram atividade de amilase (37% de aumento em TFG, quando comparado somente a GC, com $p < 0,05$) e magnésio (49% e 30% mais elevado em TFG em relação a CG e NTFG, com $p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente) significativamente elevada, enquanto as

concentrações de ácido úrico (redução de 220% e 150% em TFG, contra CG e NTFG, respectivamente) e fósforo estavam reduzidas no mesmo grupo. Estas alterações salivares, de acordo com nossos resultados, podem ter sido acentuadas pelo uso de nutrição enteral, o que poderia aumentar o risco de desenvolvimento de doenças bucais.

Observamos em nossos resultados uma redução significativa da concentração de ácido úrico salivar em pacientes com nutrição enteral, o que está de acordo com os achados de Leibovitz et al. (2003), o qual associou esta diminuição à presença de flora patogênica. De acordo com Pereira (2007), pacientes que não recebem qualquer alimento ou bebida por via oral apresentam aumento na concentração de amilase salivar, corroborando com nossos resultados. Todavia, segundo a autora, seria improvável que isto beneficie o crescimento bacteriano. Na verdade, o aumento na concentração de amilase salivar pode representar um mecanismo de defesa à contaminação de patógenos na cavidade bucal de pacientes hospitalizados (PEREIRA, 2007).

Ao realizarmos esta pesquisa, pudemos observar a importância dos cuidados com a saúde bucal na melhora da qualidade de vida e saúde geral de pessoas que dependem de cuidados de terceiros. Assim sendo, tanto os membros da família ou os profissionais da área de saúde que deles cuidam, são os que mais precisam ser motivados educacionalmente pelo cirurgião-dentista, principalmente quando o cuidador é responsável por um paciente com distúrbios neurológicos e nutrição enteral.

Conclusão

7 Conclusão

Baseados na metodologia utilizada e nos resultados verificados, foi possível concluir que:

- ✓ Pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral apresentam alteração em sua microbiota residente, havendo maior prevalência de leveduras totais e enterobactérias nestes indivíduos.
- ✓ A nutrição enteral acentua as alterações na composição salivar de pacientes com desordens neurológicas, o que pode conduzir ao aumento da susceptibilidade a doenças da cavidade bucal nesta população estudada.
- ✓ O protocolo de prevenção em saúde bucal estabelecido foi eficiente na melhora dos índices clínicos de saúde bucal e pode ser uma ferramenta de motivação para promoção de saúde e prevenção de distúrbios respiratórios em pacientes com desordens neurológicas e nutrição enteral.

Referências

Referências

American Association on Intellectual and Developmental Disabilities. Intellectual Disability: Definition, Classification and Systems of Support, 11th edition, 2010.

Abe S, Ishihara K, Adachi M, Okuda K. Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly. Arch Gerontol Geriatr. 2006 Jul-Aug;43(1):53-64. Epub 2005 Nov 4.

Adachi M, Ishihara K, Abe S, Okuda K. Professional oral health care by dental hygienists reduced respiratory infections in elderly persons requiring nursing care. Int J Dent Hyg. 2007 May;5(2):69-74.

Anzano MA, Lamb AJ, Olson JA. Impaired salivary gland secretory function following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in rats. J Nutr. 1981 Mar;111(3):496-504.

APAE-SP. Manual TODOS PELOS DIREITOS. 2011, in: http://www.apaesp.org.br/todospelosdireitos/SitePages/manual_direitos.pdf

Ayars GH, Altman LC, Fretwell MD. Effect of decreased salivation and pH on the adherence of Klebsiella species to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1982 Oct;38(1):179-82.

Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. Environ Health Perspect. 2005 Dec;113(12):1669-74.

Bassim CW, Gibson G, Ward T, Paphides BM, Denucci DJ. Modification of the risk of mortality from pneumonia with oral hygiene care. *J Am Geriatr Soc.* 2008 Sep;56(9):1601-7. Epub 2008 Aug 4.

Botti Rodrigues Santos MT, Siqueira, WL, Nicolau J. Amylase and peroxidase activities and sialic acid concentration in saliva of adolescents with cerebral palsy. *Quintessence International.* 2007 June;38(6):467-472.

Brown JS Oral biofilms, periodontitis and pulmonary infections. *Oral Dis.* 2007 Nov;13(6):513-4.

Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002 Mar;29(3):189-94.

Chaves Neto, AH, Sasaki KT, Nakamune ACMS. Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG Rev Pós Grad* 2011;18(2):90-5.

Chong SK. Gastrointestinal problems in the handicapped child. *Curr Opin Pediatr.* 2001 Oct;13(5):441-6.

Conferência Internacional sobre Deficiência Intelectual, na cidade de Montreal – Canadá, 05 e 06 de outubro de 2004, Organização Pan-americana de Saúde e Organização Mundial de Saúde (OPM/OMS). Disponível em <http://www.defnet.org.br/decl_montreal.htm>.

Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". *Clin Chem.* 1972 Mar;18(3):263-5.

DeRiso AJ 2nd, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest.* 1996 Jun;109(6):1556-61.

Dicks JL, Banning JS. Evaluation of calculus accumulation in tube-fed, mentally handicapped patients: the effects of oral hygiene status. *Spec Care Dentist*. 1991 May-Jun;11(3):104-6.

Dyment HA, Casas MJ. Dental care for children fed by tube: a critical review. *Spec Care Dentist*. 1999 Sep-Oct;19(5):220-4.

Esteban M, Castaño A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int*. 2009 Feb;35(2):438-49. Epub 2008 Oct 31.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MPA, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 36 739-749.

Gaetti-Jardim Jr E, Monti LM, Ciesielski FIN, Gaetti-Jardim EC, Okamoto AC, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ. Subgingival microbiota from *Cebus apella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions, *Anaerobe*. 18 (2012) 263-269.

Grădinaru I, Ghiciuc CM, Popescu E, Nechifor C, Mândreci I, Nechifor M. Blood plasma and saliva levels of magnesium and other bivalent cations in patients with parotid gland tumors. *Magnes Res*. 2007 Dec;20(4):254-8.

Ishikawa A, Yoneyama T, Hirota K, Miyake Y, Miyatake K. Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. *J Dent Res*. 2008 Jun;87(6):594-8.

Jonsson R, Haga HJ, Gordon TP. Current concepts on diagnosis, autoantibodies and therapy in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2000;29(6):341-8.

Karıncaoglu Y, Batcıoglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jan;34(1):7-12.

Koeman M, van der Ven AJ, Hak E, Joore HC, Kaasjager K, de Smet AG, Ramsay G, Dormans TP, Aarts LP, de Bel EE, Hustinx WN, van der Tweel I, Hoepelman AM, Bonten MJ. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jun 15;173(12):1348-55. Epub 2006 Apr 7.

Kebschull, M, Papapanou, P.N. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses, *J Clin Periodonto.* 38 (2011) 17–27.

Klein FK, Dicks JL. Evaluation of accumulation of calculus in tube-fed mentally handicapped patients. *J Am Dent Assoc.* 1984 Mar;108(3):352-4.

Kuraner T, Beksac MS, Kayakirilmaz K, Çağlayan F, Onderoğlu LS, Özgünes H. *Biol Trace Elem Res.* 1991 Oct;31(1):43-9. Serum and parotid saliva testosterone, calcium, magnesium, and zinc levels in males, with and without periodontitis.

Laforce FM, Hopkins J, Trow R, Wang WL. Human oral defenses against gram-negative rods. *Am Rev Respir Dis.* 1976 Nov;114(5):929-35.

Langmore SE, Terpenning MS, Schork A, Chen Y, Murray JT, Lopatin D. (1998). Predictors of aspiration pneumonia: how important is dysphagia? *Dysphagia*, 13(2), 69–81.

Leibovitz A, Plotnikov G, Habot B, Rosenberg M, Segal R. Pathogenic colonization of oral flora in frail elderly patients fed by nasogastric tube or percutaneous enterogastric tube. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003a Jan;58(1):52-5.

Leibovitz A, Plotnikov G, Habot B, Rosenberg M, Wolf A, Nagler R, Graf E, Segal R. Saliva secretion and oral flora in prolonged nasogastric tube-fed elderly patients. *Isr Med Assoc J.* 2003b May;5(5):329-32.

Leibovitz A, Nagler R, Plotnikov G, Habet B, Segal R. Biochemical, immunological and enzymatic components of saliva in prolonged naso-gastric-fed elderly patients. *Aging Clin Exp Res.* 2004 Dec;16(6):457-60.

Levine MJ. Salivary macromolecules. A structure/function synopsis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Sep 20;694:11-6.

Liem IH, Olmos RA, Balm AJ, Keus RB, van Tinteren H, Takes RP, Muller SH, Bruce AM, Hoefnagel CA, Hilgers FJ. Evidence for early and persistent impairment of salivary gland excretion after irradiation of head and neck tumours. *Eur J Nucl Med.* 1996 Nov;23(11):1485-90.

Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favalaro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2008 Jun;392(1-2):1-7. Epub 2008 Mar 7.

Littleton NW, McCabe RM, Carter CH. Studies of oral health in persons nourished by stomach tube. II. Acidogenic properties and selected bacterial components of plaque material. *Arch Oral Biol.* 1967 May;12(5):601-9.

McMurray DN, Rey H, Casazza LJ, Watson RR. Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and saliva of young Colombian children. *Am J Clin Nutr.* 1977 Dec;30(12):1944-8.

Melvin JE. Saliva and dental diseases. *Curr Opin Dent.* 1991 Dec;1(6):795-801.

Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):171-89.

Mojon P. Oral health and respiratory infection. *J Can Dent Assoc.* 2002 Jun;68(6):340-5.

Munro CL, Grap MJ, Jones DJ, McClish DK, Sessler CN. Chlorhexidine, toothbrushing, and preventing ventilator-associated pneumonia in critically ill adults. *Am J Crit Care*. 2009 Sep;18(5):428-37; quiz 438.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*. 2002a Feb 1;32(3):268-77.

Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med*. 2002b May;50(3):214-25.

Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis*. 2007 Nov;13(6):508-12.

Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernandez FP, Ramírez-Pérez C. Complications associated with enteral nutrition by nasogastric tube in an internal medicine unit. *J Clin Nurs*. 2001 Jul;10(4):482-90.

Pereira, AC. Atividade da amilase e ácido úrico salivar em pacientes submetidos à nutrição enteral exclusiva. 2007. Tese (Mestrado em Patologia Clínica) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007. 71 f.

Ramseier C.A. et al., Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease, *J Periodontol*. 80 (2009) 436-446.

Reed UC. Neurologia: noções básicas sobre a especialidade <http://www.fm.usp.br/pdf/neurologia.pdf>

Santos MT, Batista R, Guaré RO, Leite MF, Ferreira MC, Durão MS, Nascimento OA, Jardim JR. Salivary osmolality and hydration status in children with cerebral palsy. *J Oral Pathol Med*. 2011 Aug;40(7):582-6.

Santos PSS, Mello WR, Wakim RCS, Paschoal, MAG. Uso de Solução Bucal com Sistema Enzimático em Pacientes Totalmente Dependentes de Cuidados em Unidade de Terapia Intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2008 Abril/Junho; 20(2).

Sarin J, Balasubramaniam R, Corcoran AM, Laudenbach JM, Stoopler ET. Reducing the risk of aspiration pneumonia among elderly patients in long-term care facilities through oral health interventions. *J Am Med Dir Assoc.* 2008 Feb;9(2):128-35.

Sasaki RK. Inclusão. Construindo uma sociedade para todos . 7. ed. – Rio de Janeiro: WVA, 2006. 176 p

Savica V, Calò LA, Santoro D, Monardo P, Santoro G, Muraca U, Davis PA, Bellinghieri G. Salivary glands: a new player in phosphorus metabolism. *J Ren Nutr.* 2011 Jan;21(1):39-42.

Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol.* 1999 Jul;70(7):793-802.

Scannapieco FA, Ho AW. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Periodontol.* 2001 Jan;72(1):50-6.

Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. *J Am Dent Assoc.* 2006 Oct;137 Suppl:21S-25S.

Sleigh G, Brocklehurst P. Gastrostomy feeding in cerebral palsy: a systematic review. *Arch Dis Child.* 2004 Jun;89(6):534-9.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL, Microbial complexes in subgingival plaque, *J Clin Periodontol.* 25 (1998) 134-144.

Soukup M, Biesiada I, Henderson A, Idowu B, Rodeback D, Ridpath L, Bridges EG, Nazar AM, Bridges KG. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2012 Apr 19;4(1):14. doi: 10.1186/1758-5996-4-14.

Sousa CHG. Pessoa com deficiência intelectual: desafios para inclusão nas empresas de grande porte do Pólo Industrial de Manaus/AM /; orientadora: Inez Terezinha Stampa. – 2011. 140 f. ; 30 cm. Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Serviço Social, 2011 .

Sullivan PB. Gastrointestinal problems in the neurologically impaired child. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1997 Sep;11(3):529-46.

Sullivan PB. Gastrointestinal disorders in children with neurodevelopmental disabilities. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(2):128-36.

Sumi Y, Nakamura Y, Michiwaki Y. Development of a systematic oral care program for frail elderly persons. *Spec Care Dentist*. 2002 Jul-Aug;22(4):151-5.

Toyobo B. Study on determination of Amylase activity using 2-chloro-4-nitrophenyl- α -galactosylmaltoside (Gal-G2- α -CNP), 1999.

Turesky S, Breuer M, Coffman G. The effect of certain systemic medications on oral calculus formation. *J Periodontol*. 1992 Nov;63(11):871-5.

Wara-Aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweechaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population, *Oral Diseases*. 15(2009) 354-359.


White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 2):508-22.

Anexos

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "*Condição de saúde bucal de pacientes neurológicos com dieta enteral e seu efeito sobre a saúde sistêmica – análise da microbiota bucal e orofaríngea*", sob a responsabilidade da Pesquisadora SANDRA MARIA HERONDINA COELHO ÁVILA DE AGUIAR, está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 08/04/2011, de acordo com o Processo FOA-00953/2010.

Araçatuba, 19 de abril de 2011.



ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM
Coordenador do CEP

ACBD/wbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3234 E-mail: cep@foa.unesp.br

PRONTUÁRIO

NOME: _____ DATA: _____

1. Data de Nascimento: ___ / ___ / ___ Cidade de Origem: _____

2. Diagnóstico Médico: _____
_____3. Medicamentos em uso: _____

4. Gastrectomizado? _____ Sim _____ Não

5. Traqueostomizado? _____ Sim _____ Não

6. Edema? _____ Sim _____ Não

7. Condições bucais no exame clínico inicial: _____

8. Necessidade de medicação ansiolítica antes da consulta: _____ Sim _____ Não

9. Nome da medicação: _____

10. Dieta: _____ ~~Especial~~ _____ Normal

11. Nome da dieta: _____

12. Comunicação do paciente: _____

13. Observações adicionais: _____

NOME: _____ DATA: _____

A - AVALIAÇÃO DENTÁRIA

1 - CRO.D

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

B - AVALIAÇÃO PERIODONTAL

1 - ISG (+ sangramento; - sem sangramento)

17/55	16/54	11/51	26/64	27/65
47/85	46/84	41/81	36/74	37/75

CODIFICAÇÃO	CONDIÇÃO/ESTADO
+	Saudável
-	Sangramento

Aizawa e Bay-

2 - ÍNDICE DE HIGIENE ORAL SIMPLIFICADO

16/54	11/51	26/64
46/84	31/81	36/74



PROTOCOLO DE HIGIENE ORAL PARA PACIENTES COM NUTRIÇÃO ENTERAL

ATIVIDADE	MATERIAL NECESSÁRIO	PRODUTO DE USO ORAL	FREQUENCIA
PACIENTES DENTADOS E PACIENTES EDÊNTULOS			
FISIOTERAPIA BUCAL	GAZE	DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA A 0,12%	PACIENTES DENTADOS: 2 VEZES AO DIA (MANHÃ E NOITE)
	ANTISSÉPTICO ORAL		PACIENTES EDÊNTULOS: 3 VEZES AO DIA (MANHÃ, TARDE E NOITE)
	ABRIDOR DE MOLT		
SOMENTE PACIENTES DENTADOS			
ESCOVAÇÃO DENTAL	ESCOVA DENTAL	CREME DENTAL COLGATE TOTAL 12	1 VEZ AO DIA, NO PERÍODO DA TARDE
	CREME DENTAL		
	ABRIDOR DE MOLT		
	SUGADOR PORTÁTIL		
PASSAGEM DE FIO-DENTAL	FIO-DENTAL	FIO DENTAL MARCA A CRITÉRIO DA INSTITUIÇÃO	1 VEZ AO DIA, APÓS ESCOVAÇÃO
	ABRIDOR DE MOLT		
LIMPEZA PROFISSIONAL:	ULTRASSOM ODONTOLÓGICO PARA RASPAGEM E JATO DE BICARBONATO	BICARBONATO DE SÓDIO EM PÓ	CONSULTA MENSAL
		ÁGUA DESTILADA	
	FIO-DENTAL	FIO DENTAL MARCA A CRITÉRIO DA INSTITUIÇÃO	
	FISIOTERAPIA BUCAL COM ANTISSÉPTICO ORAL E GAZE	DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA A 0,12%	

FOTOS DA ROTINA DO PROTOCOLO DE PREVENÇÃO EXECUTADO NO HOSPITAL NEUROLÓGICO RITINHA PRATES.



Fig. 8: Paciente do Hospital Neurológico Ritinha Prates



Fig. 9: Abridor de Boca de Molt utilizado durante a atividade de escovação dentária e passagem de fio-dental



Fig. 10: Uso de fio-dental



Fig. 11: Escovação dentária



Fig. 12: Enxaguando a cavidade oral com água e utilizando bomba de sucção portátil.

FOTOS DA COLETA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA POR CULTURA E PCR

Fig. 13: Coleta de saliva com seringa descartável estéril



Fig. 14: Coleta de secreção de mucosa oral com zaragatoa sendo levemente friccionada na mucosa.

FOTOS DA COLETA DE SALIVA PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA.

Fig. 15: Coleta de saliva para análise bioquímica com sucção a vácuo. Procedimento pouco invasivo e indolor.



Fig. 16: Coleta de saliva para análise bioquímica em paciente da Casa da Criança de Tupã, Tupã-SP.



Fig.17 : Tubo de vidro ligado à bomba a vácuo. Cânula de sucção promovendo entrada da saliva para o interior do tubo.

Tabela 1: IHOS e ISG dos pacientes do GGT e do GC da análise microbiológica.

Paciente	Instituição	IHOS		ISG	
		Inicial	Final	Inicial	Final
S3	Ritinha	1,16	0,66	20%	0
S4	Ritinha	1,6	0,8	0	0
S5	Ritinha	2,16	0,16	20%	0
S7	Ritinha	1,33	0,83	10%	0
S8	Ritinha	1,83	1	30%	0
S9	Ritinha	0,8	0	20%	0
S11	C Criança	-	-	-	-
S12	C Criança	-	-	-	-
S13	C Criança	-	-	-	-
S14	C Criança	-	-	-	-
S15	C Criança	-	-	-	-
TOTAL (média)		1,48	0,575	16,6%	0,0%
C1	Ritinha	-	-	-	-
C2	Ritinha	-	0,33	-	20%
C3	Ritinha	-	0,66	-	0
C4	Ritinha	-	-	-	-
C5	Ritinha	-	-	-	-
C6	Ritinha	-	0,83	-	0
C7	Ritinha	-	-	-	-
C8	Ritinha	-	0,66	-	50%
C9	Ritinha	-	1	-	50%
C11	Ritinha	-	-	-	-
C12	Ritinha	-	1	-	50%
C13	Ritinha	-	0,5	-	50%
C15	Ritinha	-	0,5	-	40%

Tabela 2: Condição de saúde bucal dos pacientes do GGT e do GC da análise microbiológica.

Paciente	Instituição	Condição de saúde bucal inicial	Condição de saúde bucal final
S3	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S4	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S5	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S7	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S8	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S9	Ritinha	Cálculo em faces lisas e oclusais	Sem biofilme visível, sem cálculo
S11	C Criança	Cálculo em faces lisas e oclusais, muito biofilme bucal, candidíase oral	C;alculo oclusal, pouco biofilme
S12	C Criança	Bruxismo, cálculo oclusal, pouco biofilme, candidíase oral	Cálculo oclusal, pouco biofilme
S13	C Criança	Mordida aberta anterior, pouco biofilme, cálculo oclusal	Cálculo oclusal, sem placa
S14	C Criança	Mordida aberta anterior, pouco biofilme, cálculo oclusal e cervical, higiene boa	Sem biofilme visível, sem cálculo
S15	C Criança	Pouco cálculo, só oclusal, sem placa	Sem biofilme visível, sem cálculo
C1	Ritinha	Muito biofilme bucal, cálculo cervical	Muito biofilme bucal, cálculo cervical
C2	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C3	Ritinha	Muito biofilme bucal	Muito biofilme bucal
C4	Ritinha	Muito biofilme, cálculo cervical	Muito biofilme, cálculo cervical
C5	Ritinha	Muito biofilme bucal	Muito biofilme bucal
C6	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C7	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C8	Ritinha	Muito biofilme bucal	Muito biofilme bucal
C9	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C11	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C12	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme
C13	Ritinha	Muito biofilme bucal, cálculo cervical	Muito biofilme bucal, cálculo cervical
C15	Ritinha	Pouco biofilme	Pouco biofilme

Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores para detecção do complexo vermelho de Socransky e demais microrganismos.

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Temp. Anel.¹	Amplicon (pb)²
<i>C. albicans</i>	5' GCC GGT GAC GCT CCA AGA GCT G 3'	55°C	158
	5' CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC 3'		
<i>E. corrodens</i>	5' CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA 3'	45°C	688
	5' CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C 3'		
<i>Mollicutes</i>	5' GGG AGC AAA CAC GAT TAG ATA CCC T 3'	55°C	270
	5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3'		
<i>P. gingivalis</i>	5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3'	60°C	404
	5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3'		
<i>P. intermedia</i>	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3'	55°C	575
	5' TCA ACA TCT CTG TAT CCTGCG T 3'		
<i>P. micra</i>	5' TCG AAC GTG ATT TTT GTG GA 5'	55°C	1074
	5' TCC AGA GTT CCC ACC TCT 3'		
<i>P. nigrescens</i>	5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG	55°C	804
	5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG 3'		
<i>T. forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3'	60°C	641
	5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'		
<i>T. denticola</i>	5' AAG GCG GTA GAG CCG CCG CTC A 3'	55°C	311
	5' AGC CGC TGT CGA AAA GCC CA 3'		

¹Temp. Anel. = Temperatura de anelamento do primer DNA da amostra;

²pb = pares de bases que quantificam o tamanho do amplicon formado.

Artigo sobre os parâmetros do estresse oxidativo na saliva dos pacientes desta pesquisa.

Title: Enteral nutrition feeding alters the antioxidant activity in the unstimulated whole saliva composition of neurological patients.

Adriana Sales Cunha Correia^a, Antonio Hernandes Chaves Neto^b, Ariana Ferreira Pereira^c, Adriane Belló-Klein^d, Sandra M. H. C. A Aguiar^e, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune^f

^aDiscipline of Microbiology, Department of Pathology and Oral Diagnostics, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, and Oral Oncology Center, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^cLaboratory of Biochemistry, Department of Basic Sciences, and Oral Oncology Center, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^dDiscipline of Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Science, Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^eDiscipline of Pediatric, Department of Pediatric Dentistry and Social, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^fDiscipline of Biochemistry, Department of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Abstract

Enteral nutrition is used with neurological disorders patients, who lose the ability to swallowing and chewing food. The absence mastication and oral cavity contact with food can modify salivary antioxidants, which are important for the maintenance of the oral health. The aim of this study was investigate salivary oxidative stress parameters in enteral feeding patients with neurological disorder. Unstimulated whole saliva was collected from 12 patients with neurological disorders and enteral feeding (TFG), 15 neurological patients with regular feeding by mouth (NTFG), and 14 voluntaries without neurological disorder or enteral feeding (CG). The salivary levels of total antioxidant capacity (FRAP), uric acid (UA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (Gpx) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) were measured and compared between studied groups. FRAP was higher in TFG and NTFG were measured compared with CG. UA, TBARS and Gpx were significantly lower in TFG when compared with CG. There was no different in the salivary flow rate and SOD between all groups. Although the results is showing an increase antioxidant activity [higher ($p < 0.05$) in NTFG (4651 ± 192.5) and TFG (4743 ± 116.7) than CG (1844 ± 343.8)] in the total saliva of patients with enteral nutrition, decreased activity of Gpx [lower ($p < 0.05$) in the NTGF (8.242 ± 1.093) and GTF (8.373 ± 1.603) than CG (15.300 ± 2.613) respectively]] and the concentration of UA (32.89% and 54.91% lower in NTFG and TFG than CG, respectively) the main salivary antioxidant, these patients are predisposed vulnerability to oral disease triggered by oxidative stress, which emphasizes the importance of care in order to prevent the pathological process initiation.

Keywords: Saliva; Enteral nutrition feeding; Antioxidant activity; Neurological patients.

Introduction

Enteral nutrition is a technique very used with neurological disorders patients, who lose the ability to swallowing and chewing food. Patients receiving enteral nutrition show several kinds of complications such as diarrhea, vomiting, constipation, lung aspiration, tube dislodgement, tube clogging, hyperglycemia and electrolytic alterations (Pancorbo-Hidalgo et al., 2001).

The contact with food and chewing can modify the salivary composition, and various salivary components known to play a role in the saliva of defense, including against oxidative stress, which can lead to damage in various oral structures, which since gingivitis, periodontitis until the emergence of cancerous lesions.

Saliva may constitute a first line of defense against free radical-mediated oxidative stress. Potent free radicals attack on the oral mucosa leading to various alterations as infection, inflammatory oral pathologies and cancer (Hasnis et al., 2004; Battino et al., 2002; Kim et al., 2010; Karıncaoglu et al., 2005). There is no study in the literature with regard to saliva oxidant/antioxidant system in patient with gastric tube fed, but is know that presence of a naso-gastric-tube (NGT) and the lack of the mastication may influence the flow and composition of saliva (Leibovitz et al., 2004).

The oxidative stress occurs when the production of oxygen reactive species (ROS) exceed the antioxidant defense system, thereby resulting in oxidative damage to specific biomolecules (Halliwell, 1984). ROS interaction with

polyunsaturated fatty acids in cell membranes or lipoproteins, results in lipid peroxidation (Onorato et al., 1998). The extent of oxidative damage to lipids can be determined by the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) which also provides indirect assessment of oxidative stress (Dalle-Donne et al., 2006).

Antioxidants are reducing agents which exist both intracellularly and extra-cellularly and have the capacity to react with free radicals and reactive species, minimizing their actions and thus delaying or preventing oxidative stress (Powers & Jackson, 2008). They can be divided into enzymatic and nonenzymatic. The nonenzymatic group can be synthesized in vivo or absorbed through diet. Antioxidants are presents in all body fluids including saliva.

Imbalance in levels of ROS and antioxidants in saliva may play an important role, in the onset diseases in the oral cavity. Salivary lower antioxidant capacity is associated with the periodontal disease (Sculley & Langley-Evans, 2003) and development of dental caries (Dodwad & Betigeri, 2011). The uric acid, an endogenous nonenzymatic antioxidant, represents 70% of total salivary antioxidant capacity (Miller et al., 1993; Moore et al., 1994). This molecule chelates transition metals, reacts with biological oxidants such as the hydroxyl radical and hypochlorous acid to produced relatively stable composts (Becker, 1993) and scavenges reactive nitrogen species too (Vasquez-Vivar, et al., 1996). Uric acid levels in the saliva of NGT feeding is reduced (Leibovitz et al., 2004).

Enzymatic salivary antioxidants system includes superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). SOD catalysis the dismutation of O_2^- to H_2O_2 and O_2 (Waddington et al., 2000; Fridovich, 1997), defending the cells against the hazardous effects of O_2 . SOD activity increases remarkably in irreversible pulpitis while it decreases significantly in the gingival tissue close to the deep periodontal

pocket (Akalin et al., 2005; Tulunoglu et al., 1998). Glutathione peroxidase reduces H₂O₂ and/or lipid hydrogen peroxides by the oxidation of reduced glutathione or s-nitrosoglutathione (Sies et al., 1997). Salivary GPx actives are lower in periodontitis patients (Canakci et al., 2009).

The purpose of this study was to compare markers for oxidative stress: total antioxidant capacity, uric acid, SOD, GPx, and TBARS in patients with enteral feeding and regular feeding by mouth. Because all patients of the enteral feeding group have neurological disorder, a comparison was performed with neurological patients with feeding by mouth and voluntaries with no neurological disorder or enteral feeding.

Material and Methods

Selection Patient

The study included 41 subjects from 16 to 72 years (average of 32 years). Twelve patients with neurological disorders and enteral feeding (TFG: Tube-fed group, average of 35 years) from Ritinha Prates Neurological Hospital in Araçatuba - State of São Paulo, Brazil and Casa da Criança, a nursing home care in Tupã- State of São Paulo, Brazil. The Non Tube-fed group (NTFG) consisted of 15 neurological patients with feeding by mouth, from Ritinha Prates Neurological Hospital (average of 30 years). Finally, 14 voluntaries from 21 to 54 years (average of 26 years) without neurological disorder and with regular feeding by mouth (CG: Control group).

Inclusion criteria for the TFG and NTFG were patients with neurological disorders according to the International Classification of Diseases to Neurology (ICD-10 NA, World Health Organization, 1997), they were classified by the code F70-F79 (Mental Retardation), and to the TFG the presence of enteral nutrition by

gastrostomy tube. The inclusion criteria for the CG were patients with good general and oral health and not being a smoker.

The Research Protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista (Process Reference FOA-00953/2010 of 08/04/2011).

Saliva collection

To minimize possible variations with reference to the circadian rhythm, the unstimulated whole saliva were collected between 8:00 and 10:00 a.m., after 2 hours fast and oral hygiene with water and toothbrush, without fluoridated products. To obtain the sample and evaluate the salivary flow, the salivary fluid present in the floor of the mouth was aspirated as described previously by (Chaves Neto et al., 2011) during 10 minutes. The saliva samples were centrifuged at 5,500 x g for 10 minutes, in a refrigerated centrifuge at 4°C, to remove cellular and food debris, squamous cells and undissolved contaminants. The supernatants were fractionated and stored at –70°C for later analyses.

Analysis of oxidative status

The total antioxidant capacity was measured by the ferric reducing ability of plasma (FRAP) adapted to saliva. The result was expressed in mmol/mL saliva (Benzie & Strain, 1996). Salivary uric acid was quantified by spectrophotometry, by the modified Trinder reaction (Kit Labtest Diagnostica AS, Brazil). Protein was measured using the method of Lowry et al. (1951) and bovine serum albumin was used as the standard. Superoxide dismutase was estimated by the method of Marklund (1985), based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol. The rate of inhibition of pyrogallol auto-oxidation after the addition of enzyme extract was noted. The amount of enzyme required to give 50%

inhibition of pyrogallol auto-oxidation is considered as one unit of enzyme activity. The enzyme activity was expressed as units/mg protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity, expressed as nmol of peroxide/hydroperoxide reduced min/mg of protein, was measured by following NADPH oxidation at 340 nm in a reaction medium containing 0.17 mmol/L reduced glutathione, 0.2 U/mL glutathione reductase, 0.5 mmol/L tert-butyl hydroperoxide (which reacts with both the selenium-dependent and non-selenium-dependent GPx), as described by Flohé and Gunzler (1984). To evaluate lipid peroxidation, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were analyzed. Trichloroacetic acid (10% w/v) was added to the saliva to precipitate the proteins and to acidify the sample (Buege & Aust, 1978). This mixture was then centrifuged (3 min, 1,000 x g). The protein free sample was extracted and thiobarbituric acid (0.67% w/v) was added to the reaction medium. The sample was placed in a water bath (95°C, 15 min). Absorbance was read at 535 nm on a spectrophotometer, using an appropriate molar absorption coefficient ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Statistical analysis

Data were expressed as group means with SD. Statistical differences between groups were assessed by ANOVA (Tukey's or Dunnet's *post-hoc* test).

Results

The means of flow rate (mL/min) was 0.4338 ± 0.029 for TFG group 0.3263 ± 0.041 (NTFG) and 0.4158 ± 0.029 for CG. In all groups the salivary flow rate was similar.

The total antioxidant capacity was determined using the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay. The values of FRAP for the NTFG

(4651±192.5) and TFG (4743±116.7) were significantly higher ($p<0.05$) compared with control group (1844±343.8). TFG showed no significant difference with the NTFG (Fig. 1).

The salivary uric acid in NTFG and TFG were 32.89% and 54.91% lower than CG, respectively (Fig. 2). The values of uric acid in TFG were lower than NTFG ($p<0.05$).

Activity SOD and GPx were described in table 1. There were no differences about SOD in our results. Glutathione peroxidase activity was significantly lower in the NTGF (8.242±1.093) and GTF (8.373±1.603) than CG group (15.300±2.613) respectively. In NTGF and TGF groups the GPx activity was similar (Tab. 1).

The salivary reactive uric acid in NTFG and TFG were 32.89% and 54.91% lower than CG, respectively (Fig. 2). The values of uric acid in TFG were lower than NTFG ($p<0.05$).

The values of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) which also provides indirect assessment of oxidative stress were 37.47% lower in TGF group (0.1929±0.015) than CG (0.308±0.051). When compared with NGTF (0.318±0.021) group, the value TGF group was 39.49% lower. No difference was observed between CG and NGTF groups (Fig. 3).

Discussion

Enteral nutrition is a technique very used with neurological disorders patients, who lose the ability to swallowing and chewing food. The process of mastication and contact with food can modify the salivary composition, and various salivary components known to play antioxidant activity. Salivary antioxidants are

important for oral health because oxidative stress is related to the development and progression of disease in the oral cavity. The aim of this study was investigate salivary oxidative stress parameters in enteral feeding patients with neurological disorder. Because neurological disorder can change salivary parameters, comparison was performed with neurological patients with feeding by mouth and voluntaries with no neurological disorder or enteral feeding.

Similar to that described for age patients with naso-gastric tube (Leibovitz, 2004) the unstimulated salivary flow rate was not reduced in the TFG patients. These results indicate no presence of the functional impairment on salivary gland and well hydrated state in patient. The salivary antioxidant defense systems are also complex (Battino et al., 2002) and can be divided into enzymatic and nonenzymatic. The mainly nonenzymatic antioxidant is uric acid, with lesser contributions from albumin, ascorbate and glutathione (Zappacosta et al., 1999). Since antioxidant system act in concert rather than alone, we investigated the salivary total antioxidant capacity in patients with gastric tube.

In our study FRAP in TFG patients was higher than in control subjects. When neurological group was investigated, FRAP also higher than control group. Some antioxidants (e.g. albumin, bilirubin, uric acid, vitamin A, vitamin C, vitamin E) act scavenging radicals to inhibit chain initiation and break chain propagation (Niki, 1996). The highest total antioxidant capacity in patients with GTF and NGTF observed in this study could indicate lower exposure to ROS.

ROS interaction with polyunsaturated fatty acids in cell membranes results in lipid peroxidation (Onorato et al., 1998). The process for mastication and digestion of ingested foods promotes lipid peroxidation (Terao & Nagao, 1991) and in many cases iron ion is responsible for initiating lipid peroxidation (Halliwell &

Gutteridge, 1986). The absence of mastication on enteral feeding patients results on lower production of ROS and lipid oxidative damage and therefore bigger total antioxidant capacity, observed in this study.

Although higher antioxidant activity observed in GTF and NGTF groups, uric acid, a physiological important antioxidant in saliva (Moore et al.,1994; Kondakova et al.,1999), was lower in patients with enteral nutrition and neurological patients. This find is in agreement with Leibovitz et al. (2003, 2004) at study conducted in patients with naso-gastric-fed, and the low salivary uric acid may be due to uricolysis induced by *Pseudomonas* (Leibovitz , 2003). Under resting conditions parotid saliva was the major source of uric acid, and demands of the parotid saliva as related to eating (Nagler et al., 2002). In enteral nutrition patient's parotid secretion may be modified, resulting in difference between the uric acid in patients with enteral feeding in relation to patients with neurological disorder.

High antioxidant capacity observed in this study, despite the reduction of uric acid, has already been reported for cleft lip and palate children (Aizenbud et al., 2008) and was assigned to the concurrent increased of the SOD antioxidant enzyme as well as other no be demonstrated. All GTF and NGTF patients received daily supplement rich in vitamins. Absence of significant difference in antioxidant total capacity and uric acid when comparing the values of the GTF and NTGF groups indicates these changes are not from parenteral nutrition.

We found in our study no significant change in SOD activity in saliva of either group, while the activity of GPx decreased in GTF and NGTF. The lack of change in SOD activity could be an indication of no modification in production of SOD substrate O_2^- neither SOD reaction product, H_2O_2 in this patients.

Glutathione peroxidase is important antioxidant defensive element against H₂O₂ and/or lipid hydrogen peroxides (Sies et al., 1997). The GPx expression is controlled across effects of H₂O₂ on mRNA expression (Dalton et al., 1999; Miao & St Clair, 2009). Reductions in the activity of antioxidant enzymes may result in even greater exposure to ROS. High antioxidant capacity associated with lower lipid oxidative damage and absence of change in superoxide dismutase, do not indicate a higher production of reactive oxygen species which may explain the reduction GPx enteral feeding patients and neurological patients. Parotid saliva was the major source of this enzyme (Nagler et al., 2002). The reason of lower GPx activity in saliva can be due to, we believe, modified parotid saliva secretion.

Conclusion

The equilibrium oxidant / antioxidant is fundamental to maintain oral health. Although the results is showing an increase antioxidant activity in the total saliva of patients with enteral nutrition, decreased activity of glutathione peroxidase and the concentration of uric acid, the main salivary antioxidant, these patients are predisposed vulnerability to oral disease triggered by oxidative stress, which emphasizes the importance of care in order to prevent the pathological process initiation.

References

1. Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernandez FP, Ramírez-Pérez C. Complications associated with enteral nutrition by nasogastric tube in an internal medicine unit. *J Clin Nurs.* 2001 Jul;10(4):482-90.

2. Hasnis E, Reznick AZ, Pollack S, Klein Y, Nagler RM. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lymphocytes--the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and the possible implications for oral cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 May;36(5):826-39.
3. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002 Mar;29(3):189-94.
4. 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 Aug;40(4):164-71. Epub 2010 Aug 30.
5. Karıncaoglu Y, Batcıoglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jan;34(1):7-12.
6. Leibovitz A, Nagler R, Plotnikov G, Habet B, Segal R. Biochemical, immunological and enzymatic components of saliva in prolonged naso-gastric-fed elderly patients. *Aging Clin Exp Res.* 2004 Dec;16(6):457-60.
7. Halliwell B. Oxygen is poisonous: the nature and medical importance of oxygen radicals. *Med Lab Sci.* 1984 Apr;41(2):157-71.
8. Onorato JM, Thorpe SR, Baynes JW. Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Ann NY Acad Sci.* 1998 Nov 20;854:277-90.
9. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006 Apr;52(4):601-23.
10. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243-76.

11. 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 Aug;105(2):167-72.
12. Dodwad R, Betigeri AV, Preeti BP. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent*. 2011 Jan;2(1):17-20.
13. 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 (Lond)*. 1993 Apr;84(4):407-12.
14. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res*. 1994 Nov-Dec;21(6):417-25.
15. Vásquez-Vivar J, Santos AM, Junqueira VB, Augusto O. Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem J*. 1996 Mar 15;314 (Pt 3):869-76.
16. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*. 1993 Jun;14(6):615-31.
17. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2000 May;6(3):138-51.
18. Akalin FA, Toklu E, Renda N, Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18515-7.

19. 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 Mar;32(3):238-43.
20. Tulunoglu O, Alacam A, Bastug M, Yavuzer S. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *J Clin Pediatr Dent.* 1998 Summer;22(4):341-5.
21. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27812-7.
22. 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 Apr;3(2):100-6.
23. Chaves Neto AH, Sasaki KT, Nakamune ACSM. Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG Rev Pós Grad.* 2011;18(2):90-5.
24. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 Jul 15;239(1):70-6.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
26. Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutat Res.* 1985 Jan-Feb;148(1-2):129-34.

27. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
28. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
29. Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol.* 1999 Jun;44(6):485-8.
30. Niki, E. (1996). alpha-Tocopherol. In: Cadenas, E., & Packer, L. (Ed.). *Handbook of antioxidants.* New York: Marcel Dekker, p.3-25.
31. Terao J, Nagao A. Antioxidant effect of human saliva on lipid peroxidation. *Agri Biol Chem.* 1991; 55(3), 869-872.
32. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14.
33. Kondakova I, Lissi EA, Pizarro M. Total reactive antioxidant potential in human saliva of smokers and non-smokers. *Biochem Mol Biol Int.* 1999 Jun;47(6):911-20.
34. Leibovitz A, Plotnikov G, Habet B, Rosenberg M, Segal R. Pathogenic colonization of oral flora in frail elderly patients fed by nasogastric tube or percutaneous enterogastric tube. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003 Jan;58(1):52-5.
35. Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med.* 2002 May;50(3):214-25.

36. Aizenbud D, Peri-Front Y, Nagler RM. Salivary analysis and antioxidants in cleft lip and palate children. *Arch Oral Biol.* 2008 Jun;53(6):517-22.
37. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56.
38. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:67-101.

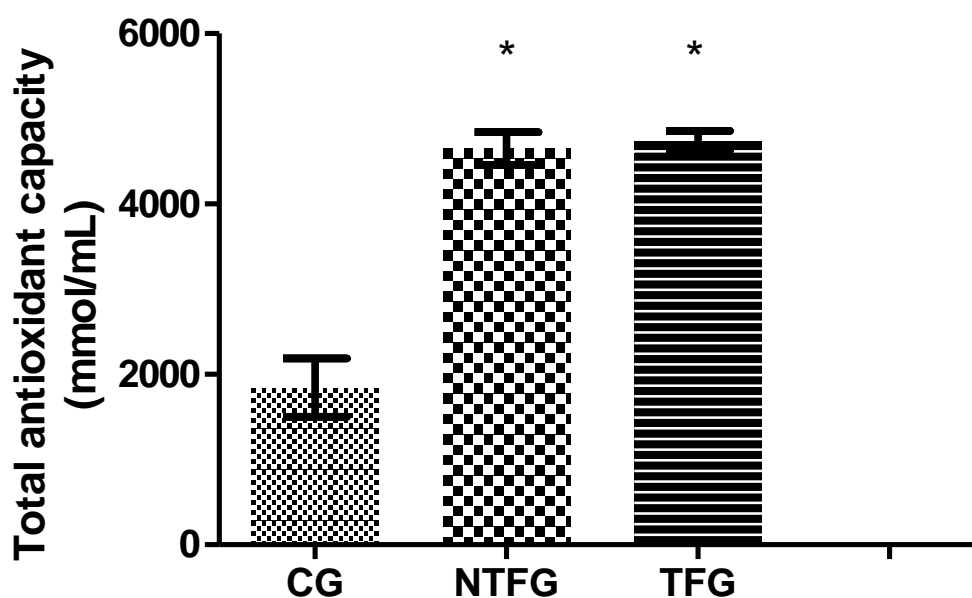


Figura 1. Total Antioxidant Capacity (FRAP) of subjects with no neurological disorders (CG: Control Group), patients with neurological disorders and non tube-feeding (NTFG: Non Tube-Fed Group) and patients with neurological disorders and tube-feeding (TFG: Tube-Fed Group). Values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey Multiple Comparison Test. * $p < 0.05$ when NTFG and TFG compared with CG.

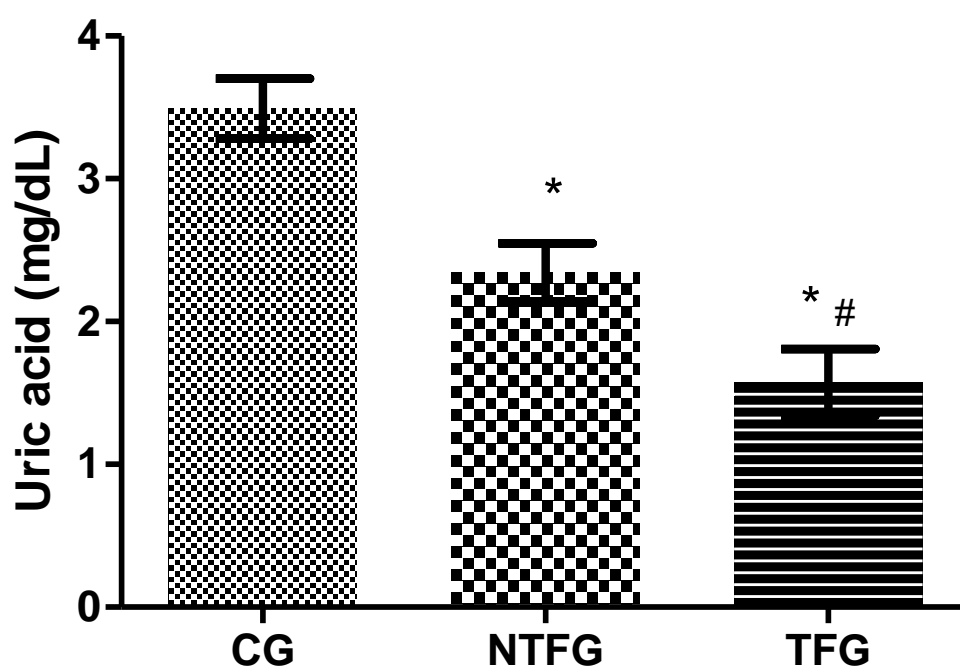


Figure 2. Uric acid of subjects with no neurological disorders (CG: Control Group), patients with neurological disorders and non tube-feeding (NTFG: Non Tube-Fed Group) and patients with neurological disorders and tube-feeding (TFG: Tube-Fed Group). Values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey Multiple Comparison Test. * $p < 0.05$ when NTFG and TFG compared with CG. # $p < 0.05$ when TFG compared with NTFG.

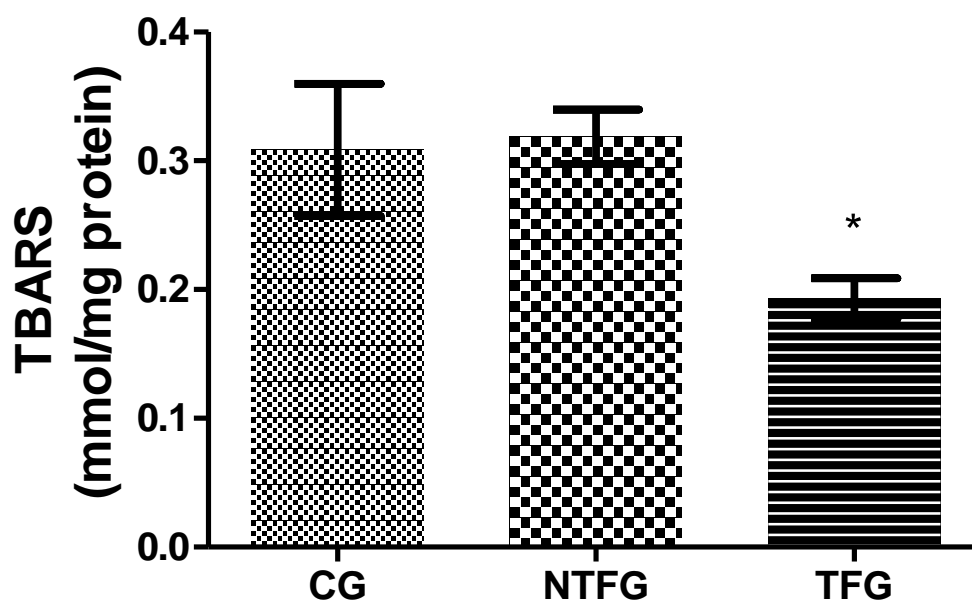


Figure 3. Thiobarbituric acid reactive substance of subjects with no neurological disorders (CG: Control Group), patients with neurological disorders and non tube-feeding (NTFG: Non Tube-Fed Group) and patients with neurological disorders and tube-feeding (TFG: Tube-Fed Group). Values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey Multiple Comparison Test. * $p < 0.05$ when NTFG and TFG compared with CG. # $p < 0.05$ when TFG compared with NTFG.

Table 1. Comparison of SOD levels (U/mg protein) and salivary GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) between subjects with no neurological disorders (CG: Control Group), patients with neurological disorders and non tube-feeding (NTFG: Non Tube-Fed Group) and patients with neurological disorders and tube-feeding (TFG: Tube-Fed Group).

	Control group (n=14)	NTFG group (n=15)	TF group (n=13)
SOD	11.14 \pm 0.192	10.98 \pm 0,040	10.80 \pm 0.030
GPx	15.30 \pm 2.613	8.24 \pm 1.093*	8.37 \pm 1.605*

Values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Dunnett's Test.

*Statistical difference found from the GPx activity when NTFG and TFG compared with CG ($p < 0.05$).

Normas da revista *Free Radical Biology & Medicine*

GUIDE FOR AUTHORS

.

INTRODUCTION

Free Radical Biology & Medicine is an international, interdisciplinary journal that publishes original contributions and reviews on a broad range of topics relating to redox biology, signaling, biological chemistry and medical implications of free radicals, reactive species, oxidants and antioxidants.

Types of paper

Full-length research articles, Review articles, Hypothesis papers, Methods articles and Letters to the Editor.

Original Articles: Original articles are the normal medium of publication. Although there is no fixed length, articles should be as concise as possible, while providing sufficient information for the work to be repeated and for the claims of the authors to be judged by the readers.

Reviews: These are contributed by scientists who are leading specialists in their field of expertise, normally at the invitation of the Editors. Authors wishing to contribute a review paper are advised first to contact the Reviews Editor, Dr. Henry Forman. Please e-mail the outline and abstract of the proposed review to frbm@elsevier.com before submission.

Letters to the Editor: Letters to the Editor are intended to stimulate discussion and debate in areas of general concern and controversy in free radical and oxidant research, and generally reflect the personal opinions of the author(s). They should be written in a continuous style and should normally not exceed two printed pages and contain no more than one figure and table.

Critical Methods: Authors wishing to contribute a Critical Methods paper are advised first to contact the Editor, Dr. Henry Forman. Please e-mail the outline and abstract of the proposed manuscript to frbm@elsevier.com before uploading the submission. These papers are contributed by scientists who are leading specialists in their field of expertise, normally at the invitation of the Editors.

Critical Methods papers must conform to a strict format. Abstract: In 200 words or less, state why

this is the appropriate method to use, the general method type (HPLC, Elisa, enzymatic assay, etc.) and the instrumentation (UV detector, Plate reader, UV spectrophotometer, etc.).

Introduction: Background of methodology. Provide example of the use of the method. If other methods are flawed, briefly explain the problem with them. **Principles:** Explain the chemical and/or biological basis of the method. Describe what the assay does and does not mean. For example, many molecular biology measurements provide relative changes rather than absolute values. Another example, is that the usual spectrofluorimetric determination of intracellular calcium concentration is an average among cells that does not indicate individual cells and does not account for gradients within cells. **Materials:** Provide a detailed list of every reagent. Include source and catalog number. **Instrumentation:** Describe the required instrument(s)? For example, for spectrophotometer, a double beam spectrophotometer and for HPLC , specific detector, gradient mixer, etc. An actual model number and the vendor, etc. should be included. **Protocol:** Describe in detail each step. This can be divided into subsections. For example, for electrophoretic mobility assays, extraction of nuclear proteins would be a section and gel electrophoresis would be another. If there are multiple buffer solutions, each could also be a separate section. Indicate the minimum (and maximum if needed) concentration of percent change that is required for the assay to produce significant results. Indicate the timing of steps including any waiting periods. Provide representative illustrations of steps where useful. If there are steps where particular care must be paid that are not obvious (for example, making sure a sample is placed into a well below the buffer using a long thin pipette) this should be in bold lettering. Precautions should also be in bold for any steps where something can easily go wrong. **Calculations and Expected Results:** Describe any post protocol calculations in detail. Provide representative results. **Caveats:** Describe any caveats that need to be considered. **Acknowledgements Section (self explanatory).** **Conflict of Interest:** State if the authors have patents or financial interests in the protocol or instruments." In light of the special structure and format of these sorts of papers, the 'Your Paper Your Way' submission option is not available for Critical Methods papers.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the Free Radical Biology & Medicine online submission system,

<http://ees.elsevier.com/frbm> For questions on the submission or reviewing process, please contact

the Editorial Office at frbm@elsevier.com AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013
www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 5

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see

<http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Animal experiments

Where animals have been used in a study, the institutional ethical or animal welfare Authority under which the work was conducted must be stated, along with the specific authorisation reference number. Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. These guidelines are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm, or the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the

submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication

elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who

must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above

and result in a corrigendum. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013
www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 6

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to

submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified

as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct

scientific English may wish to use the English Language Editing service available from

Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site

<http://support.elsevier.com> for more information.

Your Paper-Your Way

As part of the Your Paper-Your Way service, authors may submit a PDF version of their manuscript for

use in the refereeing process. This PDF file can be in any format or lay-out that can be used by referees

to evaluate your work. It should contain high enough quality figures for refereeing. References can

be in any style or format, as long as the full paper title is present. After revision, at acceptance,

source files of the paper, figures, tables and figure captions will then be required to produce the final

published version - not before. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013
www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 7

Submission in the traditional way is also still possible.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation

and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of

the article, which is used in the peer-review process (see above). Please note that even though

manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source

files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of

the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper

trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/frbm>

Referees

A minimum of four suitable potential reviewers (please provide their name, email addresses, and

institutional affiliation) should be provided. When compiling this list of potential reviewers please

consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject

area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers should be

from another country than the authors'; and they should not have recent (less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only

relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013 www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 8

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service. The Editors strongly encourage graphical abstracts and suggest that amongst the examples given <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>, that example 11 and 12 best reflect the sort of graphical abstract most suited to this field and journal.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Following the abstract, list keywords for indexing. These keywords should cover precisely the contents of the submitted paper and should give readers sufficient information as to the relevance of the paper

to their particular field.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance

or proof reading the article, etc.).
 AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013
www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 9

Nomenclature and abbreviations

Stylistic details must be kept constant. For example, electron spin resonance is abbreviated either ESR or EPR (for electron paramagnetic resonance). Either can be used, but both should be given and stated as equivalent at the first mention. (This is the recommendation of the International EPR Society.)

Formulas for radicals follow IUPAC recommendations and contain a superscripted (not centered) large

dot that precedes a charge, if any. Thus, superoxide is represented by $O_2^{\cdot -}$, not O_2^- , or some other permutation.

Other examples are HO^{\cdot} or $^{\cdot}OH$ (not OH^{\cdot}), RO^{\cdot} , ROO^{\cdot} / $^{\cdot}NO_2$, $^{\cdot}CH_2OH$, etc. In the text, names of radicals are preferred, rather than using formulas in the middle of sentences. For names of radicals, use alkoxy, peroxy, and hydroxyl and not alkoxy, peroxy, etc. (correct nomenclature requires the 'l' on the end of radicals, as in methyl, hydroxyl, etc.). Use tert, not t-, etc., for abbreviations. For example, CORRECT: tert-butoxy, sec-peroxy; INCORRECT: t-butoxy, s-peroxy.

Wherever possible, nomenclature and abbreviations should be in accordance with internationally agreed rules. When an enzyme or compound is first mentioned in the text, specification by its code number accompanied by its systematic name (as distinct from its trivial name) is requested by the Editors, but not checked for correctness.

Official names of drugs are preferred to trade names.

Standard three-letter codes for the common amino acids may be used freely and without definition, but the one-letter codes should be restricted to comparisons of long protein sequences. Similar considerations apply to nucleosides and nucleotides. Standard three-letter codes for carbohydrates and for purine and pyrimidine bases may also be used. All other abbreviations should be defined when they first appear in the text. If an extensive list of abbreviations is used, please provide an alphabetical list with definitions followed by the references at the end of the article.

Temperatures denoted by an unqualified degree symbol are assumed to be Celsius. For solution strengths, percentages should be expressed by the sign %, followed in cases of ambiguity by w/w, w/v, or v/v [e.g., 5% (w/v) means 5 g/100 ml].

All non-standard abbreviations should be defined in a footnote.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for

purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013 www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 10
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork,

please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013
www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 11

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only

need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Type references double-spaced and number them consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, not alphabetically. Cite references in the text, tables, and legends in sequential, numerical order, placing the numbers in square brackets. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first mention in the text of the particular table or figure. Journal titles are to be abbreviated according to the List of Journals Indexed in Index Medicus published by the U.S. Department of Health and Human Services.

Examples of reference style are as follows:

Journal:

[1] Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43:477-503; 2007.

Book:

[2] Van Faassen, E.; Vanin, A., eds. *Radicals For Life: the Various Forms of nitric oxide*. Amsterdam: Elsevier; 2007.

Chapter in edited book:

[3] Zuo, L.; Clanton, T. L. Detection of reactive oxygen and nitrogen species in tissues using redoxsensitive fluorescent probes. In: Sen, C. K.; Packer, L., eds. *Redox cell biology and genetics*, part A.

Methods in enzymology, volume 352. San Diego: Academic Press; 2002: 307-325.

Abstract:

[4] Freeman, B.; Aslan, M. Tissue oxidation and nitration reactions in a mouse model and humans with sickle cell disease (abstract). *Free Radic. Biol. Med.* 33:S298; 2002.

Manuscripts that have been accepted for publication may be cited as "in press" in the reference list using the estimated year of publication:

[5] Aguirre, J.; Lambeth, J.D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* In press; 2010.

Reference to a paper as "in press" implies that it has been accepted for publication. Evidence (e.g., a photocopy of the note of acceptance from the journal concerned) should accompany the submitted typescript. Papers that are "in press" should be included as a number in the text. Other papers submitted before or simultaneously with the paper in question should be included as a number in the text and in the References section, stating the name of the journal. Copies of papers that are submitted elsewhere should be provided for inspection by the Editors. Omission of this information will

delay publication and may lead to redating of a submitted manuscript. Papers presented at scientific meetings that are not available in published form should not be cited as references in the References section.

Unpublished results should not be listed in the References section. In the text they are mentioned as follows: "(Tervoort MV and Glimcher J, unpublished data)". When unpublished results are cited, the data should be provided for the Editors' information when essential for proper evaluation, or if requested. AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013 www.elsevier.com/locate/freeradbiomed 12

A personal communication should be mentioned in the text as follows: "(Tervoort MV, personal communication)". Authors should not make unauthorized use of personal communications. Personal communications are not to be included in the Reference section.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body

text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be

published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Full Online Submission

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal - preferred but not essential.
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
AUTHOR INFORMATION PACK 25 Jan 2013 www.elsevier.com/locate/freeradiomed 13

- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the

journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet

with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).

Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's

'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.