CALEB DAVID WILLY MOREIRA SHITSUKA

**Avaliação do sistema antioxidante e estresse oxidativo de saliva em
crianças de 4 a 6 anos de idade que apresentam erosão dentária**

São Paulo
2015

CALEB DAVID WILLY MOREIRA SHITSUKA

**Avaliação do sistema antioxidante e estresse oxidativo de saliva em
crianças de 4 a 6 anos de idade que apresentam erosão dentária**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de São Paulo, para obter o
título de doutor, pelo programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José
Strazzeri Bönecker

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Shitsuka, Caleb David Willy Moreira.

Avaliação do sistema antioxidante e estresse oxidativo de saliva em crianças de 4 a 6 anos de idade que apresentam erosão dentária / Caleb David Willy Moreira Shitsuka ; orientador Marcelo José Strazzeri Bönecker. -- São Paulo, 2015.

71 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Estresse oxidativo. 2. Saliva. 3. Crianças em idade pré-escolar. 4. Erosão de dente. I. Bönecker, Marcelo José Strazzeri. II. Título.

Shitsuka CDWM. Avaliação do sistema antioxidante e estresse oxidativo de saliva em crianças de 4 a 6 anos de idade que apresentam erosão dentária. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Ele seja dada toda honra, glória e louvor!

Aos meus pais Ricardo e Dorlivete por serem exemplos para mim e pelo incentivo e apoio em tudo.

A minha irmã Rabbith pelo apoio e amizade.

Aos meus avós Clitâneo, Joana e Alícia.

A minha namorada Andressa pelo apoio que tem me dado e também a sua família, o pastor Fernando a Márcia pelo incentivo e preocupação. A Samara e o futuro piloto Dedé pela parceria.

Ao professor Marcelo, meu orientador que me acolheu de maneira tão generosa, também sempre foi atencioso e teve muita paciência comigo. Além de ser essa pessoa brilhante no trabalho é um exemplo e fonte de inspiração.

Ao professor Fernando, pela orientação e incentivo que sempre me forneceu. Já faz alguns anos que vem me ensinando e sempre está disponível e disposto a ajudar.

A professora Salete, por ser essa pessoa tão especial e maravilhosa, que desde o início esteve comigo me ajudando. Com certeza tudo o que a senhora fez por mim é o que uma mãe faria pelo filho. Obrigado por tudo.

Aos professores do programa pelo carinho e momentos compartilhado nesse período. Professor Fausto que sempre esteve me ajudando e apoiando, você tem uma mente brilhante e é uma pessoa excelente! Professora Dani Raggio que sempre me deu palavras de motivação e sempre esteve disposta a ajudar. A Professora Mariana, saiba que você é um exemplo de dedicação e profissionalismo para todos nós! Ao Professor Imparato que sempre me

ensinou e ajudou nessa caminhada. A Professora Ana Estela pela atenção e apoio durante o curso. A Professora Ana Lúcia que sempre tão animada me motivou e a Professora Márcia pelos ensinamentos. Também aos Professores Guedes “in memoriam”, Issao “in memoriam” e a Professora Célia “in memoriam” que nunca serão esquecidos na Odontopediatria.

Aos professores que fazem parte da minha vida pelos ensinamentos e incentivo. Professor Danilo que sempre me apoiou e me deu conselhos, obrigado. A professora Kátia Lumi que desde a graduação tem me apoiado e incentivado nos estudos. A professora Mariana Leite pelos ensinamentos e orientação.

Ao programa da CAPES que me ajudou de diversas maneiras.

Aos funcionários da disciplina de Odontopediatria que sempre tão capacitados me deram todo um suporte. Julio, Antônio, Fátima, Anne e Marize obrigado pelas risadas e amizade.

Ao meu grande amigo e irmãozinho Juan Sebastián Lara, como você mesmo disse Deus age de maneira misteriosa, mas sempre com um propósito. E com certeza eu pude aprender muito com você, posso falar sem erro que você é uma das pessoas raras que existem nesse Mundo! Obrigado pelas risadas e pelas brigas, você sempre vai fazer parte da minha vida. Como já dizia o velho DF “Um irmão pode ser um amigo, mas um amigo sempre será um irmão”, agradeço a sua família também pelo carinho, a Consuelo ao Julián e ao Doutor Javier! E vamos ter muitas histórias pra viver e pra contar, gosto muito de você Sebas =]

A minha querida amiga Renatinha, pelas boas conversas sempre! Muito atenciosa e disposta a ajudar, só tenho coisas boas a falar de você. Que essa sintonia entre a gente permaneça sempre! =*

Sim, a você Gustavo! Acho que pude aprender muito com você nesses anos e peço desculpas por ter sido duro em alguns momentos! Desejo muito sucesso pra você nessa vida! Um grande abraço do seu amigo mais legal ;)

Ao Muri meu “parça”, obrigado pela amizade! “Tamo junto irmão =)”

A Gabizinha minha irmãzinha, sempre esteve comigo, não sei se isso é um privilégio ou fardo, mas obrigado por ter agüentado “minhas loucuras hahaha”.

A minha amiga e “parça” Aline, que nossas loucuras continuem para sempre =*

A Flávia Ibuki que me ajudou e me ensinou muitas coisas! Obrigado pela atenção e que essa nossa amizade e parceria continue =)

Ao Diego que está começando na vida científica, desejo muito sucesso!

Ao Douglas que me ajudou e ensinou no laboratório.

As crianças e suas respectivas famílias que participaram desse trabalho.

Aos meus amigos e doutores Thiego Cajubá e Henrique Segna... ;)

Aos meus amigos e colegas que fizeram parte da minha vida nesses anos de estudo! Tamara, quanta bagunça a gente já fez! Levy te considero muito, continue sendo essa pessoa rapaz! Carol ou prima, obrigado pela companhia! Edu, muito sucesso, estou na torcida! Cássio, Tati Novaes e Aninha, obrigado pelos ensinamentos desde a época do estágio prático! Jenny, você é ótima que Deus continue te abençoando! JuKimura, muito sucesso, gosto muito de você! Tathi Lenzi, pelas boas risadas! Ana Flávia, obrigado e continue com esse sucesso! Ale, só falta marcar o O'Maleys pra comemorar rss! Dani Hesse, minha parceira nos laboratórios, muito bom trabalhar contigo! Thatá, você é um exemplo de dedicação, obrigado por me ajudar desde o início! Rafa, sua roupa térmica me salvou haha! Thais C, desde os tempos na clínica de

odontopediatria da graduação juntos, muito sucesso! Heleninha, obrigado pelos conselhos! Evelyn, obrigado pelo carinho! Isa, Jú Mattos, Pati, Camilinha, Chaia, Dani Bittar, Janaína, Karlinha, Nádia, Paula, Tuca, Vanessinha, Chris, Bel, Camilla, Carmela, Daise, Fernanda, Ivonne, Laysa, Luciana, Nathalia, Taciana. Obrigado a todos pelos momentos que passamos juntos, boa sorte e sucesso!

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho!

"Respondeu-lhe, pois, Simão Pedro: Senhor, para quem iremos nós? Tu tens as palavras de vida eterna."

João 6:68

RESUMO

Shitsuka CDWM. Avaliação do sistema antioxidante e estresse oxidativo de saliva em crianças de 4 a 6 anos de idade que apresentam erosão dentária [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A erosão dentária é um problema de saúde bucal e seu processo ocorre em uma condição multifatorial. Dentre seus principais fatores, a saliva desempenha importantes funções protetoras contra o desenvolvimento deste problema que afeta principalmente as crianças e jovens. O objetivo do presente estudo foi avaliar o sistema antioxidante e o estresse oxidativo da saliva de crianças de 4 a 6 anos de idade que possuíam erosão dentária comparando com crianças que não apresentavam esse problema de saúde bucal. Um único examinador treinado e calibrado para o diagnóstico de erosão dentária segundo o índice de BEWE (Basic Erosive Wear Examination), selecionou 40 crianças de 4 a 6 anos de idade que freqüentavam a Clínica de Prevenção de Odontopediatria da Universidade de São Paulo, formando 2 grupos, de crianças com erosão ($n=22$) e crianças sem erosão ($n=18$). A quantidade do biofilme dental foi obtida utilizando o índice de higiene oral simplificado (IHO-S) e foi feita a coleta de saliva não estimulada para as análises bioquímicas. O fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva, o pH salivar e a proteína total da saliva foram avaliados. Também foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), o ácido úrico, o valor do malodialdeído (MDA) para determinação do estresse oxidativo e o total antioxidante (TAS). A proteína total foi menor no grupo de crianças com erosão dentária ($p=0,03$) e a quantidade de biofilme também foi menor nas crianças com erosão dentária média (desvio padrão) de 0,76 (0,25) comparadas com as crianças sem erosão dentária 1,18 (0,28). Não houve diferença estatística no sistema antioxidante e no estresse oxidativo da saliva de crianças com erosão dentária. A ação do sistema antioxidante e do estresse oxidativo na saliva, não influenciou na erosão dentária, quando ainda se encontrava em estágios mais iniciais deste problema de saúde bucal.

Palavras-Chave: Erosão dentária. Sistema antioxidante. Saliva.

ABSTRACT

Shitsuka CDWM. The antioxidant system and oxidative stress evaluation of saliva of children between 4-6 years who had dental erosion [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Revised Version.

Dental erosion is a problem of oral health and its process occurs in multifactorial conditions. Among its principal factors, saliva plays an important protection role against the development of this problem, which affects children and youngsters mostly. The goal of this study was assessing the antioxidant system and oxidative stress in the saliva of children between the age of four and six who had dental erosion, comparing it to children who did not present this problem of oral health. One single examiner who was trained and prepared for diagnosing dental erosion according to the BEWE (Basic Erosive Wear Examination) index has selected forty children between the age of four and six who went to the Clinic of Prevention of Pediatric Dentistry of the University of São Paulo. Two groups were formed, one of children with dental erosion (n=22), and another with no dental erosion (n=18). The quantity of dental biofilm was verified using the simplified index of oral hygiene (OHI-S) and unstimulated saliva was collected for biochemical analyses. The salivary flow, the buffering capacity of saliva, salivary pH and the total amount protein in it were assessed. The activity of superoxide dismutase and catalase enzymes was also identified, and so were the uric acid and the amount of malodialdehyde (MDA) for determining oxidative stress and total antioxidant status (TAS). There was less total protein in the group of children with dental erosion ($p=0,03$) and the quantity of biofilm was also smaller in children with dental erosion (standard deviation) of an average of 0,76 (0,25), comparing with children with no dental erosion 1,18 (0,28). There was no statistic difference as far as the antioxidant system and oxidative stress are concerned in the saliva of children with dental erosion. The activity of the antioxidant system and oxidative stress in saliva have not influenced the dental erosion process while it was still in its early stages.

Keywords: Dental erosion. Antioxidant system. Saliva

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Aplicação do evidenciador para quantificar o biofilme dental.....	32
Figura 4.2 - Profilaxia das superfícies dentais.	33
Figura 4.3 - Isolamento relativo para diagnóstico de erosão dentária.	34
Figura 4.4 - Coleta de saliva não estimulada.	37
Figura 4.5 - Materiais para coleta salivar.....	37
Figura 4.6 - Placa com o radical (coloração verde-azulado) para determinação do total antioxidante.	40
Figura 5.1 - Distribuição da quantidade de crianças para os escores do índice de BEWE de erosão dentária.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Análise entre os possíveis fatores relacionados com a erosão dentária em crianças. 46

Tabela 5.2 - Análise do sistema antioxidante e estresse oxidativo relacionados com a erosão dentária em crianças. 46

Tabela 5.3 - Análise do sistema antioxidante e estresse oxidativo relacionados com a erosão dentária em crianças. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEWE	basic erosive wear examination
CAT	catalase
HCl	ácido clorídrico
IHO-S	índice de higiene oral simplificado
MDA	malodialdeído
NADPH	nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Erosão dentária.....	16
2.2 Saliva	18
2.2.1 Fluxo salivar.....	20
2.2.2 pH salivar.....	21
2.2.3 Capacidade tampão da saliva	22
2.2.4 Proteína salivar	23
2.3 Sistema antioxidante e estresse oxidativo na saliva.....	23
2.3.1 Superóxido dismutase.....	25
2.3.2 Catalase.....	26
2.3.3 Ácido úrico	27
2.3.4 Estresse oxidativo.....	27
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa	30
4.2 Sujeitos.....	30
4.3 Coleta de dados	31
4.3.1 Avaliação da quantidade do biofilme dental e profilaxia	31
4.3.2 Diagnóstico de erosão dentária.....	33
4.4 Coleta salivar.....	36
4.5 Avaliação do fluxo salivar	38
4.6 Avaliação do pH salivar	38
4.7 Avaliação da capacidade tampão da saliva	38
4.8 Análise salivar.....	39
4.8.1 Determinação do total antioxidante	40
4.8.2 Determinação da atividade da enzima SOD.....	41
4.8.3 Determinação da enzima CAT	41
4.8.4 Ácido úrico	42
4.8.5 Proteína total.....	43
4.8.6 Estresse oxidativo.....	43
4.9 Análise estatística.....	44
5 RESULTADOS	45

6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	66
ANEXO	70

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é um problema de saúde bucal que afeta principalmente as crianças e adolescentes pelas recentes mudanças no estilo de vida, devido ao alto consumo de alimentos e bebidas ácidas (Jaeggi; Lussi, 2014). Ela é ocasionada por um processo químico de perda irreversível da estrutura mineral e superficial dos dentes, decorrentes de uma agressão ácida sem o envolvimento bacteriano (Lussi; Jaeggi, 2008).

Nos últimos anos a erosão dentária tem estado em evidência, principalmente devido a sua alta e crescente prevalência. Este problema tem se tornado uma preocupação para os pacientes, especialmente quando ela alcança um estágio mais avançado podendo causar perda na função e estética como também gerar desconforto. Nesses casos o tratamento se torna um desafio para os profissionais da saúde (Schlueter et al., 2012)

Para evitar o agravamento desse problema, os cirurgiões dentistas podem utilizar medidas preventivas como uso terapêutico de fluoretos e orientação da dieta alimentar. O próprio organismo apresenta uma importante forma de proteção natural presente no meio bucal que é o fluido salivar (Doods et al., 2005).

A saliva age de diversas maneiras no processo de proteção dos dentes contra a erosão dentária, pois possui diversas propriedades físico-químicas que desempenham funções específicas de proteção da estrutura dentária como a diluição de substâncias ácidas erosivas na cavidade bucal através do fluxo salivar, neutralização e tamponamento dos ácidos por meio do pH e também o fornecimento de íons de cálcio e fosfato (Buzalaf et al., 2012a; Hara; Zero, 2014).

Uma importante função protetora presente na saliva e ainda pouco estudada é o sistema antioxidante. Esse sistema é responsável por controlar os danos oxidativos, pois é considerado como sendo a primeira linha de defesa para o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo acontece quando ocorre um desequilíbrio entre os pró-oxidantes (radicais livres) e o sistema antioxidante (enzimático e não

enzimático), o que pode causar danos e levar até mesmo a morte celular (Finkel; Holbrook, 2000).

Quando o estresse oxidativo está presente no meio bucal, os danos celulares serão maiores, ocasionando uma alteração na formação e uma possível diminuição na quantidade do biofilme dental, que é considerado um fator de proteção contra a erosão dentária, pois age como uma barreira mecânica. A diminuição na quantidade de biofilme dental ocasionará uma menor proteção contra a agressão ácida nos dentes, o que pode ser um agravante para este problema de saúde bucal (Honório et al., 2010).

Além dessa alteração que o estresse oxidativo pode causar no biofilme, também possivelmente poderá atuar após a desmineralização da superfície dental quando a dentina está exposta, promovendo a oxidação das proteínas da matriz extracelular da dentina, podendo então ocorrer à progressão da perda mineral do dente.

Este estresse oxidativo tem sido apontado como importante contribuinte para diversas doenças inflamatórias, crônicas e degenerativas, incluindo patologias orais como as doenças cárie e periodontal. Apesar destas informações, pouco se conhece sobre a atividade do sistema antioxidante em crianças com erosão dentária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erosão dentária

A erosão dentária e o processo como este problema de saúde bucal ocorre, vem sendo objeto de estudos e descritos na Odontologia a séculos (Hunter, 1728; Black, 1914), porém nos últimos anos a prevalência da erosão dentária está crescendo, tornando este agravo de saúde uma realidade e preocupação para os profissionais da saúde. Tal moléstia se torna um dos principais problemas de saúde bucal em crianças, adolescentes e adultos jovens (Deshpande; Hugar, 2004; Zero; Lussi, 2005; Lussi et al., 2007; Corrêa et al., 2011; Huysmans et al., 2011, Schlueter et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Jaeggi; Lussi, 2014).

A prevalência da erosão dentária é alta (Salas et al., 2015), muitos estudos epidemiológicos mostram que em crianças de até 6 anos de idade ela pode ser superior a 50% da população (O'Brien, 1994; Millward et al., 1994; Al Malik et al., 2001; Harding et al., 2003; Deshpande; Hugar, 2004; Murakami et al., 2011; Mantonanaki et al., 2013), essa alta prevalência também pode ser observada em crianças de 12 anos de idade (Dugmore; Rock, 2004; Peres et al., 2005; Hou et al., 2009; Huew et al., 2011) e na dentição decídua a prevalência tende a aumentar com a idade da criança (Kreulen et al., 2010; Carica; Caprioglio, 2014; Jaeggi; Lussi, 2014).

Este problema de saúde bucal está se tornando uma preocupação e realidade principalmente para os cirurgiões-dentistas odontopediatras e pesquisadores, que nos últimos anos tentam entender mais sobre este processo, por meio de pesquisas, para melhorias no diagnóstico, prevenção e tratamento da erosão dentária (O'Sullivan; Curzon, 2000; Sánchez; Preliasco, 2003; Deshpande; Hugar, 2004; Zero; Lussi 2005; Corrêa et al., 2011).

A erosão dentária pode ser definida como sendo um problema de saúde bucal, que atinge os tecidos duros dos dentes (World Health Organization, 2010), ocasionada por um processo químico de perda irreversível da estrutura mineral e superficial dos dentes, decorrente da agressão ácida, sem o

envolvimento de bactérias (Bartlett 2005; Zero; Lussi, 2005; Ganss, 2008; Salas et al., 2015).

Sua etiologia é complexa e multifatorial, sendo os ácidos que chegam à cavidade bucal, responsáveis pela agressão das superfícies dentais, podendo ser de origem intrínseca ou extrínseca (Nunn et al., 2003; Bartlett, 2005; Lussi; Jaeggi, 2008; Huysmans et al., 2011; Lussi et al., 2011; Carvalho et al., 2014; Hellwig; Lussi, 2014; Alvarez et al., 2015).

Devido a complexidade para o surgimento deste problema, é importante levar em consideração todos os fatores que podem afetar seu desenvolvimento. Podem-se citar principalmente os seguintes fatores: os comportamentais (tipos de alimentação, ocupação, uso de drogas, hábitos de higiene, hábitos alimentares), os biológicos (anatomia do dente, biofilme, movimento dos tecidos moles da boca) e os químicos (concentração de cálcio e fosfato na saliva, capacidade tampão da saliva, pH salivar), sendo que a saliva está presente em todos os momentos e pode conter elementos cujas influencias podem ser estudadas (Lussi; Jaeggi, 2008).

Os fatores intrínsecos da erosão dentária estão relacionados quando o dente sofre o dano causado por diversos ácidos oriundos do aparelho digestivo que alcançam à cavidade bucal. Este acontecimento é decorrente de distúrbios gastrointestinais, que podem ocasionar o vômito, regurgitação e refluxo (Linnett; Seow, 2001; Zero; Lussi, 2005).

Também existem os fatores extrínsecos que causam erosão dentária, que ocorrem quando substâncias ácidas encontradas no meio externo entram em contato com a cavidade bucal, alcançando a superfície dental, ocasionando a dissolução da estrutura dental (Sánchez; Preliasco, 2003). Estas substâncias estão, principalmente, ligadas à dieta do indivíduo, presentes em bebidas ácidas, alimentos ácidos (Ganss, 2008; Waterhouse et al., 2008) e também alguns tipos de medicamentos e drogas (Hellwig; Lussi, 2014).

Clinicamente os pacientes com erosão dentária apresentam inicialmente a superfície dos dentes lisa e brilhante com um aspecto sedoso e vítreo. Quando o desgaste dental persiste, ocorrem algumas mudanças morfológicas como, por exemplo: as superfícies lisas desenvolvem cavidades e áreas convexas onde sua profundidade fica menor que sua largura. Estas lesões são localizadas da porção coronária à junção cimento-esmalte do dente, porém as

porções de esmalte localizadas próximas à margem gengival permanecem intactas, possivelmente devido ao biofilme acumulado na região que pode agir como uma barreira mecânica possibilitando uma proteção ao desafio ácido (Cheung et al., 2005; Lussi et al., 2007; Ganss, 2008; Honório et al., 2010; Lussi et al., 2011; Young; Tenuta, 2011; Salas et al., 2015; Shitsuka et al., 2015). Na superfície oclusal, ocorre um arredondamento com a escavação e desgaste das cúspides juntamente com o desaparecimento dos sulcos (Ganss, 2008). A região palatina dos incisivos superiores também é acometida por estes desgastes, sendo possível muitas vezes uma visualização da auréola no esmalte em torno da lesão (Bartlett, 2005).

A progressão do problema leva ao surgimento de novas lesões juntamente com a dissolução do esmalte e à exposição da dentina, havendo a possibilidade da destruição completa da coroa do dente e comprometimento pulpar (Lussi et al., 2011).

Este processo erosivo nos dentes faz com que na dentina a camada mais superficial seja de uma matriz orgânica desmineralizada (Kinney et al., 1995; Comar et al., 2015), atuando possivelmente como uma camada protetora contra a progressão da perda mineral (Kato et al., 2012). Embora seja uma camada resistente a forças mecânicas, ela pode ser degradada por interações bioquímicas presentes na saliva.

2.2 Saliva

Atualmente a saliva é reconhecida como um espelho para saúde do corpo humano, pois ela contém proteínas, hormônios, anticorpos e outras moléculas que servem para monitorar a saúde e doença (Hegde et al., 2009, Kumar et al., 2011).

A saliva é um complexo fluido protetor presente no meio bucal que tem importantes funções para a saúde do organismo (Edgar 1992; Edgar et al., 1994; Dodds et al., 2005; Leite et al., 2012). Ela é secretada pelo par de glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e pelas glândulas salivares menores dispersas pela mucosa oral (Schenkels et al.,

1995; Battino et al., 2002; Dodds et al., 2005; Baum et al., 2011). Nos seres humanos, as glândulas salivares são classificadas de acordo com a natureza de sua secreção, podendo ser: serosa, mucosa ou mista. A secreção serosa é aquosa fina, rica em enzimas, já as secreções mucosas são viscosas, mais densas e por fim as secreções mistas variam de espesso a fino, dependendo da proporção de células mucosas e serosas dentro da glândula (Schenkels et al., 1995; Thylstrup; Fejerskov, 2001).

A composição do fluido salivar é de aproximadamente 99% de água e 1% de materiais inorgânicos e orgânicos. Além da composição de elementos sintetizados e secretados pela porção glandular (ácinos e ductos), outros elementos podem ser encontrados na composição da saliva tais como: bactérias, leucócitos, células epiteliais descamadas e outros fluidos vindos da mucosa nasal, faríngea e sulco gengival (Edgar, 1992; Tulunoglu et al., 2006; Baum et al., 2011). A composição salivar é muito variada e também podem ser incluídos os íons como fosfato, cálcio, bicarbonato, fluoreto, sódio e potássio, substâncias orgânicas como é o caso de glicoproteínas, enzimas digestivas, glicose, uréia, além de restos alimentares, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, células que descamam do epitélio bucal, muco da cavidade nasal e faringe, fluido transudato da mucosa e exsudato dos sulcos gengivais (Schenkels et al., 1995; Schutzemberger, 2007).

Este fluido de origem glandular recobre as superfícies bucais e possui diversas propriedades físico-químicas extremamente variadas (Schutzemberger, 2007; Baum et al., 2011). Ele mantém a saúde dos dentes e tecidos moles na cavidade bucal, desempenhando funções fundamentais como é o caso da lubrificação, formação do bolo alimentar, hidratação, *clearance* salivar, participação no processo de desmineralização e remineralização, ação antimicrobiana e tamponamento contra agressões ácidas (Edgar et al., 1994; Battino et al., 2002; Samarawickrama, 2002; Nicolau et al., 2003).

A saliva desempenha funções específicas de proteção da estrutura dentária, sendo que suas principais funções que protegem dentes contra processos erosivos incluem: a diluição de substâncias erosivas na cavidade bucal, neutralização e tamponamento dos ácidos pelos íons bicarbonato, fornecimento de cálcio e fosfato, possivelmente fluoretos necessários para a remineralização e manutenção de um estado supersaturado perto da superfície

dental devido à presença de cálcio e fosfato na saliva e na formação do biofilme que protege os dentes contra a agressão ácida (Zero; Lussi, 2005; Lussi; Jaeggi, 2008; Buzalaf et al., 2012a).

Além dessas funções, a saliva constitui a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, por meio do sistema antioxidante (Kondakova et al., 1999; Battino et al., 2002; Kumar et al., 2011). A saliva é um fluido de extrema importância e fundamental para a homeostasia da cavidade bucal devido a sua capacidade de regular, monitorar e manter a integridade dos tecidos moles e duros, porém seu potencial ainda não está totalmente esclarecido (Nicolau et al., 2003).

2.2.1 Fluxo salivar

O fluxo salivar é considerado um dos mais importantes parâmetros salivares relacionados à saúde bucal, tendo também uma relação direta com a composição da saliva (Humphrey; Williamson, 2001; Nicolau et al., 2003).

A diluição de substâncias introduzidas na cavidade bucal é um processo fisiológico conhecido como *clearance* salivar. Estas substâncias podem ser de grande interesse para os cirurgiões-dentistas por terem relações com alguns problemas de saúde bucal, como é o caso de: fluoretos, sacarose e ácidos (Thylstrup; Fejerskov, 2001). Dentre todas as variáveis para que ocorra o *clearance* salivar, o fluxo salivar e o volume de saliva antes e após a deglutição são considerados como sendo os mais importantes deles. O maior fluxo salivar resultará em uma rápida diluição das substâncias presentes na cavidade bucal se comparado com o menor fluxo salivar (Thylstrup; Fejerskov, 2001).

Em média a taxa do fluxo da saliva não estimulada é de 0,3 ml/min na população em geral (Humphrey; Williamson, 2001). Em crianças o fluxo salivar tende a ser menor, pois existe uma relação da taxa aumentar juntamente com a idade (Soderling et al., 1993).

Diversos fatores externos ou internos podem modificar o fluxo salivar, como, por exemplo, o estado emocional, doenças sistêmicas, sensação de fome, dieta alimentar, idade e ritmo circadiano (Brawley, 1935; Kavanagh;

Svehla, 1998). Para evitar alterações do ritmo circadiano, coletar a saliva no mesmo hora do dia se torna essencial.

O fluxo salivar em crianças com a dentição decídua é menor do que as crianças com a dentição permanente, não havendo diferenças entre o sexo masculino e feminino (Santos; Long, 1994).

Um estudo realizado com a saliva não estimulada de jovens, mostrou que a média do fluxo salivar dos que tinham lesões de erosão dentária (0,50 ml/min) foi menor do que aqueles que não apresentavam este problema de saúde (0,68 ml/min) (Zwier et al., 2013). Outros estudos não mostraram haver relação entre o fluxo salivar de indivíduos com erosão dentária (Jarvinen et al., 1991; O'Sullivan; Curzon, 2000; Johansson et al., 2002; El Aidi et al., 2011; Wang et al., 2011; Bardow et al., 2014; Frese et al., 2014).

2.2.2 pH salivar

O dente possui uma estrutura mineralizada que interage constantemente com o meio bucal, em um processo onde ocorre a troca de minerais. Nele pode ocorrer o ganho ou a perda de minerais, variando de acordo com a disponibilidade de minerais na saliva (cálcio, fosfato e flúor) e do valor de pH salivar (Wei, 1967; Barbour et al., 2003).

Indicando o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução, o pH é expresso em uma escala que varia de 0 a 14, no qual o valor 7 representa uma solução neutra, abaixo de 7 indica uma solução ácida e acima de 7 uma solução alcalina (Tolentino, 2009).

O pH da saliva varia entre 6,8 a 7,2 podendo correr alterações no decorrer do dia. Algumas condições podem influenciar na mudança do pH salivar como a dieta alimentar, hábitos de higiene bucal e fluxo salivar (Tolentino, 2009).

Quando o valor do pH do meio bucal está abaixo de 5,5 ocorre a desmineralização da estrutura mineralizada do dente (Wei, 1967; Jarvinen et al., 1991).

Alguns estudos mostram não haver diferença nos valores de pH em sujeitos com erosão dentária comparadas com os que não apresentam esse

problema de saúde bucal (Jarvinen et al., 1991; Wang et al., 2011; Zwier et al., 2013; Bardow et al., 2014; Frese et al., 2014).

2.2.3 Capacidade tampão da saliva

A capacidade tampão da saliva possui uma das funções específicas de proteção dos tecidos minerais dos dentes, por isso é de extrema importância na saúde bucal dos indivíduos. Sua função é equilibrar o pH do meio bucal, sendo capaz de modificar em poucos minutos a acidez, evitando a desmineralização dos dentes (Kavanagh; Svehla, 1998; Bartlett 2005; Hara; Zero, 2014).

Com a capacidade de resistir às mudanças de pH do meio bucal, a capacidade tampão da saliva apresenta três principais sistemas que são o carbonato/bicarbonato, fosfato e proteínas (Edgar, 1992; Nicolau et al., 2003). Cada sistema tampão atua de diferentes formas em cada faixa de pH.

O principal sistema tampão da saliva é o carbonato/bicarbonato. Este atua quando a saliva se encontra com um pH próximo ao 7, na presença de um estímulo salivar sua capacidade aumenta, sendo responsável por cerca de 90% da capacidade tampão da saliva (Edgar 1992; Thylstrup; Fejerskov, 2001; Jenkins, 1978).

Quando não ocorre um estímulo salivar o sistema tampão fosfato contribui para o equilíbrio do pH no meio bucal (Siqueira Junior, 2005).

Já o sistema tampão de proteínas salivares atuam quando o pH do meio bucal está muito baixo entre (Cheaib; Lussi, 2013).

Alguns estudos não acharam diferença estatística na comparação da capacidade tampão em indivíduos que apresentavam erosão dentária comparados com os que não apresentavam esse problema de saúde bucal (Jarvinen et al., 1991; Wang et al., 2011; Zwier et al., 2013)

2.2.4 Proteína salivar

A saliva é composta por aproximadamente 99% de água e 1% de materiais inorgânicos e orgânicos. (Edgar, 1992; Baum et al., 2011). Os principais componentes orgânicos da saliva são as proteínas, sendo que quase todas estas proteínas contêm uma quantidade de carboidratos ligados ao seu núcleo protéico, tornando-as glicoproteínas (Siqueira Junior, 2005).

As proteínas presentes na saliva apresentam algumas funções protetoras, sendo antimicrobiana, bactericida, bacteriostática e mantendo a cavidade bucal em equilíbrio com a flora bucal (Edgar, 1992; Siqueira Junior, 2005).

A disponibilidade das proteínas na saliva pode influenciar na formação do biofilme dental (Marsh; Bradshaw, 1995; Zwier et al., 2013). Este é considerado como sendo uma proteção natural da superfície mineralizada do dente contra a erosão, que impede a saída de cálcio e fosfato e também atua como uma barreira seletiva (Larsen; Ravholt, 1994).

Alguns estudos não mostram diferença entre a proteína total presente na saliva de sujeitos com erosão dentária (Zwier et al., 2013; Bardow et al., 2014).

2.3 Sistema antioxidante e estresse oxidativo na saliva

O sistema antioxidante é considerado a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, controlando e modulando os danos oxidativos no interior da cavidade bucal (Kondakova et al., 1999; Battino et al., 2002).

O oxigênio pode ser considerado essencial para a vida. Todos os organismos multicelulares complexos usam o oxigênio para oxidar, ou seja, metabolizar nutrientes e assim produzir diferentes formas de energia necessária para a vida (Battino et al., 2002; Halliwell; Gutteridge, 2007; Padmanabhan et al., 2010).

A redução da molécula de oxigênio (O_2) em água que ocorre durante o processo de respiração celular, é acompanhada por uma liberação de energia livre, o que pode então gerar os radicais livres (Battino et al., 2002; Halliwell;

Gutteridge, 2007; Hegde et al., 2009; Padmanabhan et al., 2010; Kumar et al., 2011). Os radicais livres podem causar danos celulares e levar até a morte da célula (Finkel; Holbrook, 2000; Nogueira, 2004; Ergun et al., 2011).

O radical livre é uma espécie química, que contém um número não pareado ou ímpar de elétrons na sua última camada, o que lhe confere alta reatividade (Ferreira; Matsubara, 1997).

Sabe-se que os radicais livres, tais como ânion superóxido, e o radical hidroxila, são moléculas altamente reativas e normalmente são geradas durante a respiração. Em excesso estes podem contribuir para uma condição patológica por danificar as moléculas extracelulares e intracelulares, e causar danos ao DNA, desnaturação da proteína, e a oxidação de lipídios (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Para prevenir os danos celulares causados pelos radicais livres, o organismo possui sistema de defesa chamado de sistema antioxidante (Kondakova et al., 1999; Finkel; Holbrook, 2000; Kumar et al., 2011), que está presente em todos os fluidos e tecidos corporais (Kumar et al., 2011) e pode ser dividido em sistema enzimático e sistema não enzimático (Nogueira, 2004; Halliwell; Gutteridge, 2007; Leite et al., 2012). Antioxidante pode ser considerado qualquer substância capaz de atrasar ou inibir de maneira eficiente a ação do substrato oxidativo (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Nas células se encontram as enzimas que fazem parte do sistema antioxidante enzimático, este é formado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (Ibuki, 2010; Wang et al., 2015).

Também, existem componentes do sistema antioxidante não enzimático (ácido úrico, vitamina E, capacidade redutora de ferro, ácido ascórbico, coenzima Q e outros) que previnem os danos oxidativos (Halliwell, Gutteridge, 2007; Leite et al., 2012), sendo o ácido úrico é a principal molécula antioxidante presente na saliva humana, e representa aproximadamente 85% da capacidade antioxidante total, sendo derivado principalmente da dieta alimentar (Battino et al., 2002; Tulunoglu et al., 2006; Kumar et al., 2011).

O desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidantes (radicais livres) é conhecido como estresse oxidativo (Brock et al., 2004; Wei et al., 2004; Ozturk et al., 2008; Hegde et al., 2009; Ergun et al., 2011; Giebultowicz

et al., 2011; Kumar et al., 2011). Este desequilíbrio tem sido apontado como sendo um importante contribuinte para a ocorrência de diversas doenças inflamatórias, crônicas e degenerativas, incluindo patologias orais, sendo que a saliva pode ser considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (Battino et al., 2002; Wei et al., 2004; Ozturk et al., 2008; Hegde et al., 2009; Livnat et al., 2010; Padmanabhan et al., 2010; Ergun et al., 2011; Kumar et al., 2011). O estresse oxidativo pode agir de várias formas no organismo, tanto pela peroxidação lipídica como também pela oxidação da proteína (Nogueira, 2004).

Alguns estudos demonstraram que o estresse oxidativo tem relação com problemas de saúde como: artrite, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson (Wei et al., 2004), líquen plano (Ergun et al., 2011), fibrose cística (Livnat et al., 2010,) diabetes (Reznick et al., 2006) e HIV (Padmanabhan et al., 2010).

O sistema antioxidante é importante na regulação e formação do biofilme dental, através da sua interação com diversos microrganismos e bactérias que formam e estão presentes no biofilme (Battino et al., 2002; Honma et al., 2009; Bitoun et al., 2011). Devido a essas propriedades, o desequilíbrio neste sistema pode gerar algumas doenças relacionadas com o biofilme presente na superfície dental, como é o caso de doenças periodontais (Brock et al., 2004; Wei et al., 2004; Honma et al., 2009; Kim et al., 2010; Tonguç et al., 2011), cárie (Tulunoglu et al., 2006; Hegde et al., 2009; Bitoun et al., 2011; Kumar et al., 2011) e possivelmente erosão dentária.

2.3.1 Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na eliminação do ânion superóxido e foi descoberta em 1968 por McCord e Fridovich (McCord; Fridovich, 1969; McCord; Fridovich, 1988) e é responsável por catalisar a reação de dismutação de duas moléculas de O_2^- em peróxido de hidrogênio e oxigênio. A SOD foi a primeira enzima, capaz de metabolizar radicais livres, e está presente no citoplasma e na mitocôndria em diferentes isoformas (McCord; Fridovich, 1969; Betteridge, 2000).

A SOD age por meio de uma reação química em duas etapas, na qual em sua forma oxidada se liga ao ânion superóxido, adquirindo um próton e liberando oxigênio molecular. Na seqüência a forma reduzida da enzima se liga a um segundo ânion superóxido e um próton liberando H_2O_2 e voltando ao seu estado oxidado (Johnson; Giulivi, 2005).

Esta enzima participa ativamente no processo de eliminação dos radicais livres, convertendo o O_2^- em H_2O_2 , sendo ligada aos íons cobre e zinco que se apresenta no citoplasma das células e ligada aos íons de manganês nas mitocôndrias das células e também pode ser encontrada no meio extracelular (Nogueira, 2004).

No fluido salivar a enzima superóxido dismutase está presente e pode ser determinada, podendo então se fazer relações com diversas condições bucais (Belce et al., 2000; Cavas et al., 2005; Reznick et al., 2006; Baharvand et al., 2010; Hegde et al., 2014; Trivedi et al., 2015).

2.3.2 Catalase

Nos peroxissomos também ocorre o processo de metabolização de O_2 , porém não há produção de ATP neste processo, ocasionando uma liberação de energia livre em forma de calor que contribui para a formação de H_2O_2 , tornando-o um produtor de radical livre (Betteridge, 2000; Schrader; Fahimi, 2008). Para manter um equilíbrio nesse processo, a enzima Catalase (CAT) que está presente em todas as células, tem como função converter H_2O_2 em H_2O e O_2 (Nogueira, 2004).

A catalase contém íons de ferro (Fe^{3+}) em sua molécula. Ela reduz a primeira molécula de peróxido à água, formando um intermediário iônico por meio da oxidação do Fe^{3+} para Fe^{4+} pelo átomo de oxigênio retirado do peróxido. Em seguida, esse intermediário reage com outra molécula de peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio, restaurando a enzima ao seu estado inicial (Ghosh et al., 2008).

Esta enzima contém moléculas de NADPH (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato) ligadas, a qual é essencial para prevenir a sua inativação. Além disso, a catalase libera NADPH quando em estresse oxidativo,

o que proporcionará maior remoção de peróxido de hidrogênio pelo sistema glutathiona redutase/peroxidase (Kirkman; Gaetani, 2007).

A catalase pode ser encontrada principalmente nos fluidos corporais, no sangue, na medula óssea, na mucosa, rins e fígado e ela previne a oxidação e as lesões oxidativas do DNA (Scott et al., 1991). Esta enzima também pode ser encontrada no fluido salivar (Cavas et al., 2005; Trivedi et al., 2015).

2.3.3 Ácido úrico

Como produto final do catabolismo das purinas (guanina e adenina) no organismo, o ácido úrico é um composto orgânico que pode ser encontrado nos fluidos biológicos (Brajer-Toth et al., 1981; Simic; Jovanovic, 1989). Este ácido pode ser encontrado na saliva e vem sendo utilizado como um marcador biológico para diferentes tipos de doenças (De Sousa et al., 2015, Totan et al., 2015).

A capacidade antioxidante do ácido úrico ocorre pela sua propriedade de doar elétrons devido às duplas ligações presentes em sua estrutura, dessa maneira pode reagir com os radicais livres evitando o dano celular (De Oliveira; Burini, 2012).

O ácido úrico é a principal molécula antioxidante presente na saliva humana representando aproximadamente 85% da capacidade antioxidante total, sendo derivada principalmente da dieta alimentar (Miller et al., 1993; Moore et al., 1994; Battino et al., 2002; Tulunoglu et al., 2006; Kumar et al., 2011).

2.3.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo, fruto do desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes, é importante na contribuição de diversas doenças como: artrite, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias, síndrome da imunodeficiência adquirida, doença de Alzheimer, doença de Parkinson (Wei et al., 2004), fibrose cística (Livnat et al., 2010), HIV

(Padmanabhan et al., 2010) e diversas outras doenças bucais como: doença cárie (Tulunoglu et al., 2006; Hegde et al., 2009; Bitoun et al., 2011; Kumar et al., 2011), doenças periodontais (Brock et al., 2004; Wei et al., 2004; Honma et al., 2009), líquen plano (Ergun et al., 2011) e alguns tipos de cânceres bucais como é o caso dos cistos odontogênicos (Giebultowicz et al., 2011).

Este pode agir de diferentes maneiras no organismo humano, tanto pela peroxidação lipídica como também pela oxidação da proteína (Nogueira, 2004).

Um importante marcador que é utilizado para determinação do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica é o malodialdeído (MDA) (Ferreira; Matsubara, 1997; Del Rio et al., 2005; Ho et al., 2013).

No fluido salivar também é possível determinar o estresse oxidativo através do MDA como mostram alguns estudos (Ho et al., 2013; Totan et al., 2015; Trivedi et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

Devido a alta prevalência da erosão dentária decorrente de recentes mudanças no estilo de vida, principalmente em crianças, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o sistema antioxidante, o estresse oxidativo, algumas propriedades bioquímicas salivares e a quantidade de biofilme dental em crianças de 4 a 6 anos de idade que possuíam erosão dentária comparando com crianças que não apresentavam esse problema de saúde bucal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (FOUSP), parecer 944.751 (Anexo A).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) foi fornecido para o consentimento dos responsáveis de todos os sujeitos da pesquisa, as crianças receberam instruções simples sobre a razão dos exames realizados.

4.2 Sujeitos

O estudo foi composto por uma amostra de 40 crianças na faixa etária de 4 a 6 anos de idade que passavam em atendimento pela Clínica de Odontopediatria e Prevenção da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo nos anos de 2013 e 2014.

A amostra foi dividida em 2 grupos, sendo o primeiro grupo (n=18) para crianças sem erosão dentária e o segundo grupo (n=22) para crianças diagnosticadas com a erosão dentária.

Foram incluídas neste trabalho crianças de ambos os sexos, na faixa etária de 4 a 6 anos de idade, com a dentição decídua e uma condição sistêmica de saúde normal.

Foram excluídas as crianças que apresentaram lesões de cárie dentária e/ou doença periodontal.

4.3 Coleta de dados

De acordo com os critérios estabelecidos, as crianças e respectivos responsáveis que freqüentavam a Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria da FOUSP foram convidados a participar do presente estudo. Caso o responsável aceitasse o convite, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido era preenchido e assinado pelo mesmo.

Os procedimentos realizados foram: profilaxia, exame de diagnóstico de erosão dentária e coleta salivar.

4.3.1 Avaliação da quantidade do biofilme dental e profilaxia

Para realizar um acurado exame clínico de diagnóstico da erosão dentária foi necessária uma realização prévia da profilaxia, no entanto, antes de realizar a profilaxia, foi feito a quantificação do biofilme dental.

A quantidade do biofilme dental foi feita utilizando o índice de higiene oral simplificado (IHO-S). O exame clínico foi realizado com auxílio de um evidenciador de placa (fucsina 3%), aplicado sobre as superfícies dentais com um cotonete (Figura 4.1). Os resultados encontrados foram anotados em uma ficha clínica (Apêndice B).

O índice de higiene oral simplificado avalia a superfície de alguns dentes. Para o presente trabalho, foram avaliadas a superfície vestibular dos dentes 55, 51, 65, e 71 e a superfície lingual dos dentes 75 e 85, ou na ausência de algum desses dentes a utilização de um dente vizinho como referência.

Figura 4.1 - Aplicação do evidenciador para quantificar o biofilme dental

A quantidade de biofilme em cada superfície avaliada recebe um código que varia de 0 a 3. O código 0 significa ausência de biofilme, código 1 o biofilme não cobre mais de 1/3 da superfície examinada, código 2 o biofilme cobrindo mais de 1/3 e código 3 o biofilme cobrindo mais de 3/3 da superfície dental. A soma de todas as superfícies avaliadas é dividida pelo número de dentes examinados, chegando a uma média que representa o índice de higiene oral do paciente (Greene; Vermillion, 1964).

Na sequência foi feito a profilaxia das superfícies dentais com pasta profilática, escova de Robson e micro-motor (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Profilaxia das superfícies dentais

4.3.2 Diagnóstico de erosão dentária

O diagnóstico de erosão dentária foi realizado por um único examinador, previamente treinado e calibrado. O examinador foi submetido a duas sessões de 4 horas cada, de treinamento e calibração com exercícios de diagnóstico de erosão dentária, utilizando 20 imagens de fotos clínicas e 20 dentes extraídos e concedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, com diferentes graus de desgaste.

As sessões de treinamento foram realizadas por um cirurgião-dentista com experiência no diagnóstico de erosão dentária. O valor do teste Kappa para confiabilidade intra-examinador foi de 0,89.

Para realizar o exame clínico de diagnóstico da erosão, foi utilizado o isolamento relativo (Figura 4.3) com roletes de algodão e secagem com jato de ar, espelho clínico número 5 e iluminação pelo refletor.

O índice utilizado para registro das lesões de erosão presentes foi o índice de BEWE (Basic Erosive Wear Examination) (Bartlett et al., 2008).

Figura 4.3 - Isolamento relativo para diagnóstico de erosão dentária

Este índice divide a boca em sextantes e todas as superfícies dentais (para o presente estudo foram avaliados os dentes decíduos) são analisadas, porém apenas o valor mais alto do sextante é registrado. Os escores para esta análise variam de 0 a 3, sendo o escore 0 para o dente sem desgaste erosivo e o escore 3 para o dente com perda de tecido duro maior ou igual a 50% da área superficial (Quadro 4.1)

Escore	
0	Dente sem desgaste erosivo.
1	Perda inicial de textura superficial do dente.
2*	Defeito distinto, perda de tecido duro < 50% da superfície do dente.
3*	Perda de tecido duro $\geq$ 50% da superfície do dente.

*nos escores 2 e 3 a dentina freqüentemente está afetada.

1 sextante (55-54)	2 sextante (53-63)	3 sextante (64-65)	Soma dos escores
Maior escore	Maior escore	Maior escore	
4 sextante (85-84)	5 sextante (83-73)	6 sextante (74-75)	
Maior escore	Maior escore	Maior escore	

Quadro 4.1 – Baseado no índice BEWE, proposto por Bartlett, Ganss e Lussi em 2008.

O índice de BEWE indica o risco desse problema de saúde bucal, sendo que quando a soma dos maiores escores do sextante for menor que 2, é considerado como nenhum risco, quando a soma resultar entre 3 e 8 é considerado como baixo risco, quando os resultados ficam entre 9 e 13 pode-se considerar o médio risco, já quando o resultado for maior que 14 é considerado como de alto risco (Bartlett et al., 2008).

Clinicamente os pacientes que apresentam um baixo risco são aqueles com lesões iniciais de erosão dentária, lesões encontradas tipicamente no esmalte dentário. Os pacientes com um médio risco já tem lesões mais desenvolvidas acometendo a dentina em algumas regiões. Para os que apresentam um alto risco, as lesões são mais severas acometendo freqüentemente o esmalte dentário e podendo até ocorrer a perda da anatomia dental devido à gravidade desse problema.

4.4 Coleta salivar

Após os exames clínicos iniciais terem sido realizados, as crianças foram convidadas para voltar outro dia para a coleta de amostras de saliva.

As coletas das amostras de saliva foram padronizadas para que não ocorressem alterações com relação ao conteúdo e ritmo circadiano. Todas as crianças foram orientadas previamente a não fazer a higiene bucal como também a estarem em dieta por pelo menos 2 horas antes da saliva ser coletada.

Realizou-se a coleta da amostra salivar não estimulada sempre no período entre 14 às 16 horas. Antes da coleta propriamente dita, foi dado a cada criança um copo com água destilada para fazer um bochecho por 30 segundos e cuspir. Posteriormente cada criança foi orientada a acumular a saliva no assoalho da boca e foi instruída para deixar escorrer, gotejando-a em um tubo de plástico graduado (Figura 4.4) por um período inicial de 10 minutos que foi controlado por meio de um cronômetro digital. Porém quando não era atingido uma quantidade mínima de 3ml de saliva (quantidade mínima necessária para se fazer as demais avaliações bioquímicas), a criança era orientada a continuar salivando até que se atingisse essa quantidade mínima de saliva.

A avaliação do fluxo salivar, da capacidade tampão da saliva e do pH salivar foi feita logo após a coleta de saliva e anotado na ficha de coleta salivar (Apêndice C).

Figura 4.4 - Coleta de saliva não estimulada

Imediatamente após as amostras de saliva ser coletadas, elas foram mantidas em gelo e em seguida armazenadas sob baixas temperaturas -80°C para não perder suas propriedades químicas (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Materiais para coleta salivar

4.5 Avaliação do fluxo salivar

Durante a coleta da amostra de saliva, a velocidade do fluxo salivar foi determinada pela relação entre o volume coletado durante o tempo de 10 minutos. Assim, a velocidade do fluxo salivar foi demonstrada em mililitros por minuto (ml/min).

4.6 Avaliação do pH salivar

Em seguida utilizou-se uma pipeta de vidro graduada para coletar 1ml da saliva contida no tubo de plástico graduado. Esse fragmento de 1ml de saliva coletado foi colocado em outro tubo de plástico graduado que também estava mantido em gelo com baixas temperaturas.

Para estimar o pH inicial da saliva utilizou-se o PHmetro portátil digital UltraBASIC UB-10 (denverinstrument), que foi calibrado por meio de imersão do eletrodo em duas soluções diferentes, seguindo instruções do fabricante com valores conhecidos de pH.

4.7 Avaliação da capacidade tampão da saliva

A capacidade tampão foi determinada por titulação com solução de HCl 0,01N, imediatamente após a coleta da amostra salivar e avaliações de fluxo salivar e pH inicial.

Utilizando o 1ml de fragmento de saliva selecionado no tubo de plástico graduado, foi adicionado com o auxílio de uma pipeta de vidro, 0,2ml de HCl 0,01N. A ponta do medidor de pH (eletrodo) foi lavada com água destilada e seco com papel absorvente para que fosse feita uma nova medição, agora com o ácido adicionado à amostra salivar. Esse processo foi repetido sempre com a adição de 0,2ml de HCl e o valor de pH anotado na ficha clínica até que o valor do pH fosse igual ou inferior a 5,5.

Com isso conseguimos obter dados relativos à capacidade tampão total, e representou-se os 3 principais tampões com valores da escala do pH até 7, pH entre 6,9 e 6 e por fim pH entre 5,9 e 5,5.

Armazenou-se a quantidade remanescente das amostras salivares a -80°C para posteriormente serem avaliadas no laboratório.

4.8 Análise salivar

Todas as análises salivares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Foram realizadas as seguintes análises:

- Determinação do valor do total antioxidante (TAS).
- Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD).
- Atividade da enzima Catalase (CAT).
- Determinação da concentração de ácido úrico.
- Determinação da concentração de proteína total.
- Determinação do estresse oxidativo pelo MDA.

Inicialmente para facilitar o entendimento da metodologia vamos mostrar um quadro para exemplificar cada análise (Quadro 4.2).

Análise	Método	Coloração	Comprimento de onda	Aparelho
TAS	Kit Randox		600nm	Espectrofotômetro
SOD	Kit Randox		505nm	Espectrofotômetro
CAT	Aebi 1984		240nm	Espectrofotômetro
Ácido úrico	Kit Randox		546nm	Espectrofotômetro
Proteína total	Lowry 1951		660nm	Espectrofotômetro
Estresse Oxidativo	Karatas et al., 2002		254nm	HPLC

Quadro 4.2 – Métodos para as análises salivares.

4.8.1 Determinação do total antioxidante

O Total antioxidante foi determinado de acordo com as orientações contidas no Kit TAS (Randox UK). Neste método o reagente ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) é incubado com a peroxidase (metamioglobina) e com o peróxido de hidrogênio para produzir o radical ABTS. Este radical tem uma coloração estável verde-azulada (Figura 4.6) a qual pode ser medida a 600nm.

Figura 4.6 - Placa com o radical (coloração verde-azulado) para determinação do total antioxidante

Os antioxidantes presentes na saliva impedem a formação dessa coloração verde-azulada, a diminuição na coloração é proporcional à concentração de antioxidantes na amostra. Para este método foram utilizadas

cubetas de plástico e a reação foi acompanhada espectrofotometricamente em duplicatas. Os cálculos foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\Delta = \frac{\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}}{\text{tempo}}$$

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{(\Delta \text{ branco} - \Delta \text{ amostra})}$$

$$\text{mmol por l de saliva} = \text{Fator} \times (\Delta \text{ branco} - \Delta \text{ amostra})$$

4.8.2 Determinação da atividade da enzima SOD

A atividade da enzima SOD foi determinada utilizando o Kit RANSOD (Randox UK).

Neste método é utilizado xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido os quais reagem com o reagente INT [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride] produzindo uma coloração rósea avermelhada, que pode ser lida a 505nm. A atividade da enzima SOD, presente a saliva, é medida através do grau de inibição desta reação. Uma unidade da enzima SOD é aquela capaz de causar 50% de inibição na taxa de redução do INT. espectrofotometricamente. As análises foram feitas em duplicata. Uma curva padrão foi realizada e utilizada para os cálculos.

4.8.3 Determinação da enzima CAT

A saliva foi homogeneizada a 10% (100mg/mL) em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e centrifugada a 1.500 x g (4000 rpm) por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de acordo com o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H₂O₂, determinada

espectrofotometricamente a 240nm durante 5 minutos, em duplicata. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\Delta = \frac{\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final}}{\text{tempo}}$$

$$\text{U de catalase por ml de homogenado} = \frac{\Delta \times \text{fator de diluição}}{0,071 \times \text{tomada de ensaio}}$$

4.8.4 Ácido úrico

A concentração do ácido úrico foi determinada utilizando o Kit Uric Acid (Randox UK).

Nesse método o 1100 µl do reagente 1 é homogeneizado com 30 µl da amostra e após 5 minutos é feita a leitura no espectrofotômetro à 546nm para se ter a absorbância inicial. Na sequência é adicionado 220µl do reagente 2 e após 90 segundos é feita a leitura da absorbância final. As análises foram feitas em duplicata.

O cálculo da concentração de ácido úrico em mg/dl foi feita de acordo com a seguinte formula:

$$\text{Ácido úrico (mg/dl)} = \text{Calibrador (mg/dl)} \times \frac{\Delta \text{ Amostra}}{\Delta \text{ Calibrador}}$$

4.8.5 Proteína total

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951). Neste método, as proteínas em meio alcalino reagem com o cobre, formando um complexo.

O Padrão foi feito com albumina de soro bovino. Este complexo reduzirá o reativo de folin-ciocalteu, resultando uma coloração azulada, que foi lida no espectrofotômetro à 660nm, em duplicata.

4.8.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi determinado por meio da peroxidação lipídica e seguiu o método descrito Karatas et al., (2002), que se baseia na determinação de malodialdeído (MDA) feita no HPLC.

O preparo da amostra é feito com a homogeneização de 0,5ml da amostra de saliva em 1,75ml de ácido perclórico 0,4M por 1 minuto. Essa mistura foi mantida no gelo por 30 minutos e na sequência foi centrifugada a 27.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e neutralizado com K_2CO_3 5M (4ul para 50ul de sobrenadante), e colocado em espera por 1 hora a -80 graus Celsius.

Para o preparo dos padrões foi diluído 5ul de tetraetoxipropano em 5ml de HCl 0,1N. Foi retirado 0,5ml dessa solução em 50ml de H^2O .

A leitura foi feita em duplicata no HPLC com leitura de 254nm com tempo total de 5 minutos.

4.9 Análise estatística

Os todos os dados (fichas clínicas e laboratoriais) foram inseridos em uma planilha do programa Microsoft Excel e conferidos posteriormente pelo próprio pesquisador. Para análise estatística, os dados foram transferidos para o software Stata versão 9.0 (Stata Corp LP, College Station, USA).

Inicialmente, para fazer a comparação entre os grupos de crianças com erosão dentária e do grupo de crianças sem erosão dentária foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade e na sequência o teste paramétrico t de Student.

Para todas as variáveis estudadas, o nível de significância foi estabelecido com 5%.

5 RESULTADOS

Um total de 40 crianças participou desse estudo, das quais 22 (55%) apresentavam erosão nos dentes e 18 (45%) não tinham esse problema de saúde bucal. Pode-se observar na Figura 5.1 a distribuição dos escores das crianças que apresentavam erosão dentária, segundo o índice de BEWE.

Figura 5.1 - Distribuição da quantidade de crianças para os escores do índice de BEWE de erosão dentária

A média (desvio padrão) de idade das crianças do grupo com erosão dentária foi de 5,50 (0,74) anos de idade e das crianças do grupo sem erosão dentária foi de 5,16 (0,85) anos de idade.

A amostra foi composta por 22 (55%) crianças do sexo feminino e 18 (45%) crianças do sexo masculino.

A análise do teste t de Student mostrou na Tabela 1 que a média do IHO-S (quantidade de biofilme) foi menor ($p < 0,0001$) nas crianças que

apresentavam erosão dentária, comparadas com as crianças que tinham lesões erosivas nos dentes.

Na tabela 5.1 observamos que a média (desvio padrão) da concentração da proteína total expressa em miligramas por mililitros de saliva (mg/ml) foi menor no grupo de crianças com erosão dentária 13,17 (6,70) comparadas com as crianças que não tinham erosão dentária 21,99 (16,89).

Tabela 5.1 - Análise entre os possíveis fatores relacionados com a erosão dentária em crianças

Variáveis	Sem erosão Média (DP)	Com erosão Média (DP)	Valor de p*
IHO-S	1,18 (0,28)	0,76 (0,25)	< 0,0001
Fluxo salivar (ml/min)	0,26 (0,09)	0,26 (0,07)	0,998
pH inicial	7,16 (0,14)	7,26 (0,23)	0,107
Proteína total (mg/ml)	21,99 (16,89)	13,17 (6,70)	0,030
Capacidade tampão total (ml HCl 0.01N)	1,12 (0,21)	1,23 (0,17)	0,071
Capacidade tampão por faixa de pH (ml HCl 0.01N)			
pHi-7.0	0,30 (0,14)	0,39 (0,20)	0,124
6.9-6.0	0,55 (0,16)	0,62 (0,18)	0,209
5.9-5.0	0,26 (0,09)	0,22 (0,07)	0,145

*Calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

DP (Desvio Padrão)

As variáveis relacionadas com o sistema antioxidante são expressas na tabela 5.2. Não houve diferença para o ácido úrico expresso em miligramas por mililitros de saliva. Também não ocorreu alteração para a atividade das enzimas SOD e CAT (unidade por mililitros de saliva). Para os valores de MDA e TAS (nM/ml) também não houveram alterações.

Tabela 5.2 - Análise do sistema antioxidante e estresse oxidativo relacionados com a erosão dentária em crianças

Variáveis	Sem erosão Média (DP)	Com erosão Média (DP)	Valor de p*
Ácido úrico (mg/ml)	5047,3 (5697,1)	2301,2 (2344,5)	0,067
SOD (U/ml)	5770,75 (1269,1)	7184,3 (2423,5)	0,631
CAT (U/ml)	40267,1 (106050,9)	55284,3 (142383,2)	0,713
MDA (nM/ml)	1427,5 (1701,0)	2895,4 (4057,6)	0,178
TAS (nM/ml)	5559,2 (5839,2)	15332,06 (35372,4)	0,255

*Calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

DP (Desvio Padrão)

Na tabela 5.3 as variáveis do sistema antioxidante e estresse oxidativo, são expressas em gramas por proteína ou decilitros. Não houve alteração na atividade das enzimas SOD, Catalase e nos valores do ácido úrico, MDA e no total antioxidante (TAS).

Tabela 5.3 - Análise do sistema antioxidante e estresse oxidativo relacionados com a erosão dentária em crianças

*Calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

Variáveis	Sem erosão Média (DP)	Com erosão Média (DP)	Valor de p*
Ácido úrico (mg/dl)	50,47 (56,97)	23,01 (23,44)	0,067
SOD (U/g proteína)	71,55 (45,07)	50,78 (54,44)	0,203
CAT (U/g proteína)	231,11 (239,20)	283,55 (323,61)	0,571
MDA (nM/g proteína)	17,46 (16,80)	22,72 (19,13)	0,400
TAS (nM/g proteína)	66,82 (54,94)	89,25 (70,95)	0,279
DP (Desvio Padrão)			

6 DISCUSSÃO

Apesar da alta prevalência de erosão dentária na população, principalmente em crianças e jovens (O'Brien, 1994; Salas et al., 2015; Murakami et al., 2011), este problema de saúde bucal se encontra em estágios iniciais, no qual as lesões geralmente são observadas geralmente no esmalte dentário na grande maioria dos casos (Vargas-Ferreira et al., 2010; Abanto et al., 2014; Murakami et al., 2015). No presente estudo, das 22 (100%) crianças diagnosticadas com erosão dentária pelo índice de BEWE, a maioria delas, sendo 19 (86%) crianças, apresentavam um baixo risco de erosão dentária.

Apontado como sendo uma proteção natural da superfície dental, o biofilme dental pode agir de maneira protetora como uma barreira física contra o desafio ácido erosivo (Cheung et al, 2005; Lussi et al., 2007; Ganss, 2008; Honório et al., 2010; Lussi et al., 2011; Young; Tenuta, 2011; Salas et al., 2015), e atuando como uma barreira seletiva impedindo a saída de cálcio e fosfato (Larsen; Ravholt, 1994). Este conhecimento está de acordo com os achados do nosso estudo, onde as crianças com erosão dentária tinham uma quantidade de biofilme dental menor ($p < 0,0001$), sendo a média (desvio padrão) de 0,76 (0,25) se comparadas com as crianças sem erosão dentária 1,18 (0,28).

A média (desvio padrão) da concentração de proteína total em crianças com erosão dentária também foi menor 13,17 mg/ml (6,70 mg/ml) quando comparadas com as crianças sem erosão dentária 21,99 mg/ml (16,89 mg/ml), diferentemente de outros estudos que não acharam essa diferença (Zwier et al., 2013; Bardow et al., 2014). Essa diferença pode ter ocorrido pelo critério no diagnóstico da erosão dentária, pois cada estudo utilizou índices de diagnóstico diferentes. Sabendo que, a disponibilidade das proteínas presentes no fluido salivar pode influenciar na formação do biofilme dental (Marsh; Bradshaw, 1995; Zwier et al., 2013), pode-se supor que a diferença na concentração de proteína total das crianças com erosão influenciou na formação do biofilme dental, atuando no processo de desenvolvimento desse problema de saúde bucal.

Existem também outras mudanças que podem ocorrer na cavidade bucal, como alterações no pH e temperatura que influenciam na microbiota bucal, podendo modificar o biofilme dental (Marsh; Devine, 2011), alterações na enzima glutathione peroxidase que faz parte do sistema antioxidante e regula alguns microrganismos e bactérias podendo também influenciar na formação do biofilme dental (Battino et al., 2002). Com relação ao pH salivar não houve alteração entre os grupos estudados, de acordo com estudos anteriores (Jarvinen et al., 1991; Wang et al., 2011; Zwier et al., 2013; Bardow et al., 2014; Frese et al., 2014). A glutathione peroxidase foi a única dentre as principais enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) do sistema antioxidante enzimático que não pode ser estudada devido a dificuldades na aquisição dos reagentes para análise, sendo que esta poderia influenciar na formação do biofilme dental.

A média do fluxo salivar para a coleta de saliva não estimulada entre as crianças com e sem erosão dentária foi de 0,26 ml/min o que condiz com a média da população em geral 0,3 ml/min (Humphrey; Williamson 2001), levando em conta que o fluxo salivar na dentição decídua é menor do que na dentição permanente (Santos; Long, 1994). Estes achados corroboram com outros estudos que mostraram não haver relação entre o fluxo salivar e a erosão dentária (Jarvinen et al., 1991; O'Sullivan; Curzon, 2000; Johansson et al., 2002; El Aidi et al., 2011; Wang et al., 2011; Bardow et al., 2014; Frese et al., 2014). Apenas um estudo mostrou que a média do fluxo salivar dos que apresentavam erosão dentária foi menor do que aqueles que não tinham esse problema de saúde (Zwier et al., 2013).

A capacidade tampão da saliva tem a função protetora de resistência do pH a uma indução ácida. Os nossos dados não mostraram haver relação entre essa capacidade de proteção e crianças com erosão dentária, estando de acordo com outros estudos (Jarvinen et al., 1991; Wang et al., 2011; Zwier et al., 2013).

A amostra do presente estudo foi composta por crianças de 4 a 6 anos de idade com a dentição decídua. Essa escolha foi feita para minimizar as alterações do sistema antioxidante frente a quadros de inflamação (Ferreira; Matsubara, 1997; Finkel; Holbrook, 2000) que poderiam existir no processo de irrompimento dos dentes.

As análises do sistema antioxidante enzimático e não enzimático e do estresse oxidativo, foram realizadas com a obtenção dos valores da concentração de ácido úrico, MDA, da atividade das enzimas SOD e CAT, porem não foi encontrada nenhuma diferença estatística na saliva não estimulada de crianças com erosão dentária. A maioria das crianças foi diagnosticada como possuindo um baixo risco de erosão, então não se sabe a atuação do sistema antioxidante e do estresse oxidativo diante um quadro de lesões mais severas em dentina.

Parece existir uma interação entre os componentes do sistema antioxidante (enzimático e não enzimático), então a avaliação de apenas um índice antioxidante pode ser enganosa, dessa forma a medição de um índice isolado pode ser menos representativo do que o conjunto total. Além disso, medir cada componente de forma isolada se torna mais difícil e caro, por esse motivo se tende a avaliar a capacidade antioxidante total da saliva (Ghiselli et al., 2000; Battino et al., 2002; Padmanabhan et al., 2010). Não foi encontrada nenhuma diferença na capacidade total antioxidante (TAS) da saliva das crianças com erosão, condizendo com os achados do sistema enzimático e não enzimático estudado.

Não foi possível fazer a relação do sistema antioxidante e estresse oxidativo na saliva de crianças com um risco severo de erosão dentária (lesões mais profundas em dentina), devido a uma limitação do estudo que adotou uma amostra de conveniência. Possivelmente em estágios mais avançados da erosão dentária, a camada mais superficial formada de uma matriz orgânica desmineralizada na dentina (Kinney et al., 1995; Comar et al., 2015) que atua como uma camada protetora contra a progressão da perda mineral (Buzalaf et al., 2012b; Kato et al., 2012), poderia sofrer influências do estresse oxidativo e do sistema antioxidante presentes na saliva.

No presente estudo, apesar da ação direta do sistema antioxidante e do estresse oxidativo não influenciarem na erosão dentária, tanto o sistema antioxidante como o estresse oxidativo presentes na saliva podem ter influenciado na formação do biofilme dental, isso é apontado em alguns estudos em que o sistema antioxidante age como regulador na formação do biofilme dental e assim apresenta relação com algumas doenças bucais devido a essa associação como ocorre nas doenças periodontais (Brock et al., 2004;

Wei et al., 2004; Honma et al., 2009) e cárie (Tulunoglu et al., 2006; Hegde et al., 2009; Bitoun et al., 2011; Kumar et al., 2011), sendo necessários futuros estudos para a compreensão dessa possível relação em pacientes com erosão dentária.

7 CONCLUSÕES

Quando analisamos e discutimos os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Não há alteração no sistema antioxidante da saliva de crianças com erosão dentária em estágios iniciais desse problema de saúde bucal.
- Não há alteração nos valores de MDA (estresse oxidativo) na saliva de crianças com erosão dentária comparadas às crianças sem erosão dentária.
- A atividade das enzimas SOD e CAT, como a concentração de ácido úrico não apresentaram diferença na saliva de crianças com erosão dentária, porém crianças com erosão dentária apresentaram uma concentração menor de proteína total comparadas com crianças sem erosão nos dentes.
- Crianças com erosão dentária tinham uma quantidade de biofilme dental menor do que as crianças sem este problema de saúde bucal.

REFERÊNCIAS¹

Abanto J, Shitsuka C, Murakami C, Ciamponi AL, Raggio DP, Bönecker M. Associated factors to erosive tooth wear and its impact on quality of life in children with cerebral palsy. *Spec Care Dentist*. 2014; 34(6):278-85.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-6.

Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R. The relationship between erosion, caries and rampant caries and dietary habits in preschool children in Saudi Arabia. *Int J Paediatr Dent*. 2001; 11(6):430-9.

Alvarez LL, Fabruccini FA, Alves LS, Alvarez Vaz R, Maltz M. Erosive Tooth Wear among 12-Year-Old Schoolchildren: A Population-Based Cross-Sectional Study in Montevideo, Uruguay. *Caries Res*. 2015; 28; 49(3):216-25.

Baharvand M, Maghami AG, Azimi S, BAsiani H, Ahmadiéh A, Taghibakhsh M. Comparison of superoxide dismutase activity in saliva of smokers and nonsmokers. *South Med J*. 2010; 103(5):425-7.

Baum BJ, Yates JR, Srivastava S, Wong DTW, Melvin JE. Scientific frontiers: emerging Technologies for salivary diagnostics. *Adv. Dent. Res*. 2011; 23(4):360-8.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range 2.30 < or = pH < or = 6.30--a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111(3):258-62.

Bardow A, Lykke AJ, Qvist V, Ekstrand K, Twetman S, Flehn NE. Saliva composition in three selected groups with normal stimulated salivary flow rates, but yet major differences in caries experience and dental erosion. *Acta Odontol Scand*. 2014; 72(6):466-73.

1. De acordo com o Estilo Vancouver.

Bartlett DW. The role of erosion in tooth wear: Aetiology, prevention and management. *Int. Dent. Jour.* 2005; 55:277-84.

Bartlett D, Ganss C, Lussi A. Basic Erosive Wear Examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. *Clin Oral Invest.* 2008;12(Suppl.1): S65-S68.

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

Belce A, Uslu E, Kucur M, Umut M, Ipbüker A, Seymen HO. Evaluation of salivary sialic acid level and Cu-Zn superoxide dismutase activity in type 1 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med.* 2000; 192(3):219-25.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2):3-8.

Bitoun JP, Nguyen AH, Fan Y, Burn RA, Wen ZT. Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 320:110-7.

Black GV. A work on operative dentistry. 2. ed. Chicago: Medico-dental; 1914.

Brajter-Toth A, Goyal RN, Wrona MZ, Lavaca T, Dryhurst G. Eletrochemical and enzymic oxidation of biological purines. *Bioelec and Bioener.* 1981; 8:413-35.

Brawley RE. Studies of the pH of normal resting saliva: variations with age and sex. *J Dent Res.* 1935;15:55-77.

Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:515-21.

Buzalaf MA, HannaS AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(5):493-502.

a

Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 2012; 24(2):72-6.

b

Carvalho TS, Lussi A, Jaeggi T, Gambon DL. Erosive tooth wear in children. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25:262-78

Cavas L, Arpinar P, Yurdakoc K. Possible interactions between antioxidant enzymes and free sialic acids in saliva: a preliminary study on elite judoists. *Int J Sports Med.* 2005; 26(10):832-5.

Cheaib Z, Lussi A. Role of amylase, mucin, IgA and albumin on salivary protein buffering capacity: a pilot study. *J Biosci.* 2013 Jun; 38(2):259-65.

Cheung A, Zid Z, Hunt D, McIntyre J. The potential for dental plaque to protect against erosion using an in vivo - in vitro model – a pilot study. *Aust Dent J* 2005; 50(4):228-34.

Comar LP, Cardoso CDE A, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MA, Magalhães AC. TiF4 and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(1):14-8.

Corica A, Caprioglio A. Meta-analysis of the prevalence of tooth wear in primary dentition. *Eur J Paediatr Dent.* 2014; 15(4):385-8.

Corrêa MSNP, Corrêa FNP, Corrêa JPNP, Murakami C, Mendes FM. Prevalence and associated factors of dental erosion in children and adolescents of a private dental practice. *Int J Paediatr Dent.* 2011:1-8.

De OliveiraEP, Burini RC. High plasma uric acid concentration: causes and consequences, *Diabetol Metab Syndr.* 2012; 4:12.

De Sousa MC, Vieira RB, DOS Santos DS, Carvalho CA, Camargo SE, Mancini MN, De Oliveira LD. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(4):600-5.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(4):316-28.

Deshpande S D, Hugar SM. Dental erosion in children: An increasing clinical problem. Jour Ind Soc Prev Dent. 2004; 22(3):118-27.

Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh C. Health benefits of saliva: a review. Jour. of Dent. 2005; 33:223-33.

Dugmore CR, Rock WP. The prevalence of tooth erosion in 12-year-old children. Br Dent J. 2004;196(5):279-82.

Edgar, W M. Saliva: its secretion composition and functions. Br Dent Jour. 1992; 8(2):239-45.

Edgar WM, Higham SM, Manning RH. Saliva stimulation and caries prevention. Adv Dent Res. 1994; 8(2):239-45.

El Aidi H, Bronkhorst EM, Huysmans MC, Truin GJ: Multifactorial analysis of factors associated with the incidence and progression of erosive tooth wear. Caries Res 2011; 45: 303-12.

Ergun S, Trosala SC, Warnakulasuriya S, Ozel S, Onal AE, Ofluoglu D, Guven Y, TAnyeri H. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2011; 40:286-93.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Bras. 1997; 43(1): 61-8.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000; 408(6809):239-47.

Frese C, Frese F, Kuhlmann S, Saure D, Reljic D, Staehle HJ, Wolff D. Effect of endurance training on dental erosion, caries, and saliva. Scand J Med Sci Sports. 2014; 25(3):319-26.

Ganss C. How valid are current diagnostic criteria for dental erosion ? Clin Oral Invest. 2008;12:41-9.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29:1106-14.

Ghosh A, Mitchell DA, Chanda A, Ryabov AD, Popescu DL, Upham EC, Collins GJ, Collins TJ. Catalase-peroxidase activity of iron(III)-TAML activators of hydrogen peroxide. J Am Chem Soc. 2008;130(45):15116-26.

Giebultowicz J, Wroczyn P, Samlczyk-Wanyura D. Comparasion of antioxidant enzymes activity and the concentration of uric acid in the saliva of patients with oral cavity cancer, odontogênico cysts and healthy subjects. J Oral Pathol. Med. 2011; 40(9):726-30.

Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. J Am Dent Assoc. 1964; 68: 7- 13.

Halliwell B, Gutteridge JMC, editor. Free radicals in biology and medicine. 4th edition ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.

Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014; 25:197-205.

Harding MA, Whelton H, O'mullane DM, Cronin M. Dental erosion in 5-year-old Irish school children and associated factors: a pilot study. Community Dent Health. 2003;20(3):165-70.

Hegde AM, Rai K, Padmanabhan V. Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries. J. Clin. Pediatr. Dent. 2009; 33(3):231-234.

Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in saliva: an in vivo study. Caries Res. 2014; 48(2):170-3.

Hellwig E, Lussi A. Oral hygiene products, medications and drugs - hidden aetiological factors for dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25:155-62.

Ho E, Karimi GK, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; 1:483-91.

Honma K, Mishima E, Inagaki S, Sharma A. The OxyR homologue in *Tannarella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation. *Microbiology.* 2009; 155:1912-22.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of dental plaque on human enamel erosion: in situ / ex vivo study. *Oral Health Prev. Dent.* 2010; 8(2):179-84.

Hou XM, Zhang Q, Chen XC, Wang JD. Prevalence of dental erosion and associated drinks in 12-year-old population of Beijing. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2009; 44(4):208-11

Huew R, Waterhouse PJ, Moynihan PJ, Kometa S, Maguire A. Dental erosion and its association with diet in Libyan schoolchildren. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011; 12(5):234-40.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85:162-9.

Hunter J. The natural history of the human teeth. 2.ed. Londres:[s.ed.], 1728.

Huysmans MCDNJM, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res.* 2011; 45(1):60-8.

Ibuki FK, Estudo do efeito da irradiação com laser em baixa intensidade no sistema antioxidante de glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25:55-73.

Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991; 70(6):942-7.

Jenkins GN. *The physiology and biochemistry of the mouth.* Toronto: Blackwell; 1978.

Jentsch H, Beetke E, Gocke R. Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis. *Clin Oral Investig.* 2004;8(3)156-60.

Johansson AK, Lingstrom P, Birkhed D: Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 204–11.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Mol Aspec Med.* 2005; 26:340-352.

Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2002; 311(1):76-9.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MAR. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dental Res.* 2012; 91(12):1119-23.

Kavanagh DA, Svehla G. Variation of salivary calcium, phosphate and buffering capacity in adolescents. *Arch Oral Biol* 1998;43:1023-7

Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planning in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010;40:164-171.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, jr Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral Distribution and dimensional changes in human dentin during desmineralization. *J Dental Res.* 1995;74:1179-1184.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(1): 44-50.

Kondakova I, Lissi EA, Pizarro M. Total reactive antioxidant potential in human saliva of smokers and non-smokers. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1999; 47(6): 911-20.

Kreulen CM, van 't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Res*. 2010; 44(2):151-9.

Kumar D, Pandey R, Agrawal D, Agrawal D, An estimation and evaluation of total antioxidant capacity of saliva in children with severe early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*. 2011; 21(6):459-64.

Larsen MJ, Ravnholt G. Dissolution of various calcium fluoride preparations in inorganic solutions and in stimulated human saliva. *Caries Res*. 1994; 28(6): 447-54.

Leite MF, Ferreira NF, Shitsuka CD, Lima AM, Masuyama MM, Sant'anna GR, Yamaguti PM, Polotow TG, Barros MP. Effect of topical application of fluoride gel NaF 2% on enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters of saliva. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(6):630-5.

Linnett v, Seow K. Dental erosion in children: A literature review. *Pediatr. Dent*. 2001; 23(1):37-43.

Livnat G, Bentur L, Kuzmishsky E, Nagler RM. Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39:16-21.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Lussi A, Shaffner M, Jaeggi T. Dental erosion – diagnosis and prevention in children and adults. *Int Dent Jour*. 2007; 57:385-98.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion - diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig*. 2008; 12 Suppl 1:S5-13

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion – An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res*. 2011; 45(1):2-12.

Mantonanaki M, Koletsi-Kounari H, Mamai-Homata E, Papaioannou W. Dental erosion prevalence and associated risk indicators among preschool children in Athens, Greece. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(2):585-93.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 1995; 15(3):169-75.

Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol*. 2011; 38(11): 28-35.

McCord JM, Fridovich I. Superoxidedismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.

McCord JM, Fridovich I. Superoxidedismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med*. 1988; (5-6):363-9.

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; 84(4):407-12.

Millward A, Shaw L, Smith AJ, Rippin JW, Harrington E. The distribution and severity of tooth wear and the relationship between erosion and dietary constituents in a group of children. *Int J Paediatr Dent*. 1994; 4(3):151-7.

Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res*. 1994; 21(6):417-25.

Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Corrêa MSNP, Haddad AE, Bönecke R M. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. *Caries Res*. 2011; 45(2): 121-9.

Murakami C, Tello G, Abanto J, Oliveira LB, Bonini GC, Bönecker M. Trends in the prevalence of erosive tooth wear in Brazilian preschool children. *Int J Paediatr Dent*. 2015

Nicolau J, Leite MF, Siqueira WLJ, Nogueira FN. Saliva na saúde e na doença. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2003; 57(4):304-8.

Nogueira FN. Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Nunn JN, Gordon PH, Morris AJ, Pine CM, Walker A. Dental erosion: changing prevalence? A review of British national childrens' surveys. *Int J Paed Dent*. 2003; 13:98-105.

O'Brien M. Children's dental health in the United Kingdom, 1993. Office of population censuses and surveys. London: Her Majesty's Stationery Office 1994; 74-6.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res*. 2000; 34:82-7.

Ozturk LK, Furuncuoglu H, Atala MH, Ulukoylu O, Akyuz S, Yarat A. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Braz J Biol Res*. 2008; 41(11):956-9.

Padmanabhan V, Rai K, Hegde AM, Shetty S. Total antioxidant capacity of saliva in children with HIV. *J Clin Pediatr Dent*. 2010; 34(4):347-50.

Peres KG, Armênio MF, Peres MA, Traebert J, DE Lacerda JT. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. *Int J Paediatr Dent*. 2005;15(4):249-55.

Reznick AZ, ShehadE N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Bio*. 2006; 51:640-8.

Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent*. 2015; 43(1):42-50.

Santos VL, Long SM. Avaliação do risco de cárie através da determinação do índice CEO-d e testes salivares (fluxo e capacidade tampão) em crianças com dentadura decídua na faixa etária de 3 a 6 anos de idade. Rev ABO Nac. 1994; 4(1): 46-52.

Samarawickrama, D. Y. Saliva substitutes: how effective and safe are they? Oral Dis. 2002; 8(4):177-9.

Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. Int J Paediatr Dent. 2003; 3: 251-7.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? Adv Dent Res. 2012; 24(2):68-71.

Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. Biochim Biophys Acta. 2006; 1763:1755-66.

Schutzemberger ME. Análise bioquímica do fluido salivar de indivíduos portadores de doenças periodontal. Rev Sul-Bras Odont. 2007; 4(1): 46-52.

Schenkels LCPM, Veerman ECI, Amerongen AVN. Biochemical Composition of Human Saliva in Relation to other Mucosal Fluids. Crit Rev Oral Biol Med. 1995; 6(2): 161-75.

Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. J Lab Clin Med. 1991; 118(1): 7-16.

Shitsuka C, Mendes FM, Corrêa MS, Leite MF. Exploring some aspects associated with dentine hypersensitivity in children. Scientific World Journal. 2015.

Simic MG, Jovanovic SV. Antioxidation Mechanisms of Uric Acid. J Am Chem Soc. 1989; 111(15):5778-5782.

Siqueira Junior WL. Estudo de alguns parâmetros salivares em indivíduos com Síndrome de Down. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2005.

Soderling E, Pienihakkinen K, Alanen ML, Hietaoja M, Alanen P. Salivary flow rate, buffer effect, sodium and amylase in adolescents: a longitudinal study. *Scand J Dent Res*. 1993; 101:98-102.

Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 3. ed. São Paulo: Ed. Santos; 2001.

Tolentino ES. Avaliação do pH da saliva e da saburra lingual antes e após a utilização de soluções enxaguantes orais e sua relação com parâmetros de halitose. [Dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, faculdade de Odontologi;. 2009.

Tonguç MO, Ozturk O, Sutçu R, Ceyhan BM, Kiliç G, Sonmez Y, Yetkin AZ, Sahin U, Baltaçioğlu E, Kirzioglu FY. The impact of smoking status on antioxidant enzyme activity and malodialdehyde levels in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011; 82(9):1320-8.

Totan A, Miricescu D, Parlatescu I, Mohora M, Greabu M. Possible salivary and serum biomarkers for oral lichen planus. *Biotech Histochem*. 2015;3:1-7.

Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Singh B, Pandey S. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2015;35(2):14-9

Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *Int J Paediatr Dent*. 2006; 16:186-91.

Vargas-Ferreira F, Piovesan C, Praetzel JR, Mendes FM, Allison PJ, Ardenghi TM. Tooth erosion with low severity does not impact child oral health-related quality of life. *Caries Res*. 2010; 44(6):531-9.

Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary Biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Free Radic Biol Med*. 2015; (15):167-7.

Wang P, Zhou Y, Zhu YH, Lin HC. Unstimulated and stimulated salivary characteristics of 12-13-year-old schoolchildren with and without dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(11):1328-32.

Waterhouse PJ, Auad SM, Nunn JH, Steen IN, Moynihan PJ. Diet and dental erosion in young people in south-east Brazil. *Int Jour Paediatric Dent.* 2008; 18: 353-60.

Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin – 1b in gengical crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J. Periodont. Res.* 2004; 39:287-293.

Wei SH. Remineralization of enamel and dentine--a review. *J Dent Child.* 1967; 34(6):444-51.

World Health Organization, ICD – International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision, Version for; 2010.

Young A, Tenuta LMA, Initialerosionmodels. *Caries Res.* 2011; 45(1):33-42.

Zero DT, Lussi A. Erosion: chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent Jour.* 2005; 55(4): 285-90.

Zwier N, Huysmans MC, Jager DH, Ruben J, Bronkhorst EM, Truin GJ. Saliva parameters and erosive wear in adolescents. *Caries Res.* 2013; 47(6):548-52.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO PAULO
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado responsável, esta pesquisa tem como título: “Avaliação do Sistema Antioxidante da Saliva de Crianças com Erosão Dentária”, está a cargo dos pesquisadores: Caleb Shitsuka e Marcelo Bönecker. O menor do qual o Sr./Sra. é responsável está convidado para participar desta pesquisa como voluntário, cabendo-lhe o direito de desistência em qualquer momento se assim desejar, sem acarretar-lhe nenhum prejuízo e/ou penalização.

1-Objetivo: Avaliar propriedades específicas e protetoras da saliva de crianças com erosão nos dentes.

2-Procedimento: Será feito o exame clínico da boca, em seguida uma amostra de saliva será coletada, para isso a criança irá inclinar sua cabeça para baixo e deixar a saliva escorrer por 10 minutos em um recipiente plástico para seu armazenamento e em seguida o paciente será dispensado. A saliva coletada será utilizada para análises no laboratório e parte da saliva que não for utilizada será descartada no lixo de material biológico.

3-Risco/Dano: São mínimos os riscos e danos previstos na realização de um exame odontológico e coleta salivar nas crianças, quando poderá existir um pequeno desconforto durante a realização dos procedimentos, aonde a criança terá que inclinar a cabeça e deixar a saliva escorrer num recipiente para ser coletada. Os pesquisadores se responsabilizam por qualquer dano decorrente do estudo, prestando assistência integral e indenização dos participantes.

4-Tempo: O exame clínico e a coleta salivar serão realizados em 20 minutos, para isso é necessário que a criança fique em jejum e não escove os dentes por 2 horas antes desses procedimentos.

5-Benefício: A partir dos dados obtidos nos exames clínicos e coleta salivar, será possível identificar as necessidades de tratamento e realizar medidas educativas e preventivas para a criança. Caso seja observada alguma

necessidade de tratamento durante o exame clínico, seu filho(a) será encaminhada para tratamento odontológico.

6-Informações adicionais: Todas as informações fornecidas serão mantidas em sigilo e de conhecimento apenas dos pesquisadores que se comprometem a manter o sigilo da identidade da criança. Não haverá benefícios financeiros ao voluntário.

Os pesquisadores se responsabilizam por qualquer dano decorrente do estudo, prestando assistência integral e indenização dos participantes, também estando à disposição para qualquer dúvida pelos contatos: telefone (11) 3091-7835.

Eu _____, certifico que tendo lido as informações contidas neste documento e tendo sido suficiente esclarecido pelos pesquisadores CalebShitsuka e Marcelo Bönecker autorizo a participação nesta pesquisa do menor _____, por qual sou responsável.

Autorizo também, que os dados obtidos através do exame clínico e das análises salivares sejam apresentados e publicados em eventos e artigos científicos.

Consto que recebi uma cópia deste documento.

São Paulo, de de_____.

Assinatura do responsável legal: RG:_____

Assinatura dos pesquisadores :	_____	_____
	CalebShitsuka	Marcelo Bönecker
	CPF: 345.023.228-22	CPF: 093.876.128-56

“Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia: Av. Lineu Prestes 2227- Cidade Universitária, CEP: 05508-000 São Paulo ou pelo e-mail cepfo@usp.br”.

APÊNDICE B– Ficha clínica**FICHA CLÍNICA**

Nome: Sexo: ()F ()M Nascimento: ____/____/____

IHO-S

Dente	Face	Código Inicial
	V	
	V	
	V	
	V	
	L	
	L	
Índice de placa		

BEWE

1 sextante (17-14)	2 sextante (13-23)	3 sextante (24-27)
4 sextante (37-34)	5 sextante (33-43)	6 sextante (44-47)

Soma dos escores

APÊNDICE C – Ficha de coleta salivar**Coleta Salivar**

Nome: _____ Sexo: ()F ()M Nascimento: ____/____/____

Saliva	Valor
Fluxo ml/min.	
pH	
Tamponamento $\leq$ pH 5.5	

Momento	pH
Inicial	
1ª adição 0,2ml de ácido	
2ª adição 0,2ml de ácido	
3ª adição 0,2ml de ácido	
4ª adição 0,2ml de ácido	
5ª adição 0,2ml de ácido	
6ª adição 0,2ml de ácido	
7ª adição 0,2ml de ácido	
8ª adição 0,2ml de ácido	
9ª adição 0,2ml de ácido	
10ª adição 0,2ml de ácido	

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Sistema Antioxidante da Saliva de Crianças com Erosão Dentária.

Pesquisador: Marcelo José Strazzeri Bónecker

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11100412.7.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 177.451

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Estudo clínico e laboratorial para avaliar o sistema antioxidante da saliva em crianças com erosão dentária. Na parte clínica do projeto é descrita a seleção de 40 crianças de 4 a 6 anos de idade sendo 20 portadoras de erosão dental e 20 sem erosão provenientes da clínica de Prevenção da Odontopediatria da FOU SP. O TCLE será aplicado aos responsáveis pelas crianças após a informação e esclarecimento quanto a pesquisa. Será preenchido um questionário relacionado a dieta alimentar da criança e após a criança será examinada quanto aos níveis e índices de higiene bucal. Será executada a profilaxia dentária e o diagnóstico da erosão será realizado segundo o índice BEWE. Na segunda consulta será realizada coleta de saliva não estimulada que será imediatamente congelada a -80°C para as análises laboratoriais. As amostras de saliva que não forem utilizadas serão descartadas em lixo de material biológico da FOU SP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o sistema antioxidante da saliva em crianças de 4 a 6 anos com erosão dentária

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimo e foram adequadamente descritos no projeto. São aqueles previstos na realização de um exame odontológico e coleta salivar nas crianças, quando poderá existir um pequeno desconforto durante a realização dos procedimentos, aonde a criança terá que inclinar a cabeça e deixar a saliva escorrer num recipiente para ser coletada. Os benefícios podem não ser diretos mas a conduta do exame clínico poderá identificar as necessidades de tratamento e realizar medidas educativas e preventivas para a criança.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP **Município:** SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto adequado sob o ponto de vista ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 196/96, itens III.1.2a e IV.1.2g. O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela Instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br