MARIA DULCINEY DA SILVA

**Análise de características orgânicas, pH e fluxo de
saliva total não estimulada de recém nascido a termo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Maria Dulciney da

Análise de características orgânicas, pH e fluxo
de saliva total não estimulada de recém nascido a
termo / Maria Dulciney da Silva. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Edna Maria de Albuquerque Diniz.

Descritores: 1.Lactente 2.Recém-nascidos
3.Saliva 4.Alfa-amilases 5.Proteínas salivares
6.Ácido siálico 7.Índice de Apgar

USP/FM/DBD-502/17

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a Deus por todo carinho e cuidado com que escolhe os que estiveram, estão e estarão ao meu lado: pais, esposo, filhos, amigos, colegas, enfim todo os que de uma forma ou outra me ajudam a **crescer** para além dos limites do corpo. A eles meu amor e gratidão.

Obrigada Dra. Edna por tudo, pela confiança, atenção e amizade, aprendi a valorizar cada instante desta descoberta.

Obrigada Dra. Salete Nahás, por acreditar em mim e no meu trabalho. Professores Alyne S. Gonçalves e Fernando N. Nogueira obrigada pela disponibilidade.

Professor José Nicolau sua atenção e paciência foram fundamentais, obrigada.

Ana Carolina, Regiane, obrigada garotas.

Douglas Nesaldal, obrigada pelo tudo.

Aos amigos de jornada, estejam onde estiverem o meu muito obrigado.

*“O que agrada a Deus em minha pequena alma,
é que eu ame minha pequenez e minha pobreza.”
“É a esperança cega que tenho em sua Misericórdia”*

Santa Teresinha do Menino Jesus

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Componentes Orgânicos pH e Fluxo Salivares.....	5
1.1.1. Atividade Enzimática.....	5
1.1.2. Concentração de Ácido Siálico.....	7
1.1.3. Proteínas.....	9
1.1.4. Fluxo.....	11
1.1.5. pH.....	11
1.1.6. Volume Salivar.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. HIPÓTESE.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Geral.....	18
4.2. Específico.....	18
5. METODOLOGIA.....	19
5.1. Casuística.....	20
5.2. Critérios de Inclusão.....	20
5.3. Critérios de Exclusão.....	20
5.4. Brochura do Pesquisador.....	21
5.5. Instrumento de Coleta.....	21
5.6. Coleta de Amostras.....	22
5.7. Análise das Amostras Salivares.....	23
5.8. Metodologia Estatística.....	25
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONCLUSÃO.....	44
9. ANEXOS.....	47
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1	Características demográficas e clínicas descritivas das mães: idade, número de gestações, frequência da primeira gestação ou mais, frequência do tipo de parto, a presença de colostro antes do nascimento.....	28
Tabela 6.2	Características descritivas clínicas do RNT, ambos os sexos, mostrando: idade gestacional Capurro em semanas, peso de nascimento em gramas, comprimento em centímetros, Índice de Apgar no minuto 1 (notas 8 e 9); no minuto 5 (notas 9,10); no minuto 10 (notas 9,10).....	29
Tabela 6.3	Características da ST mostrando: volume salivar, pH, fluxo salivar , alfa amilase, proteínas totais, ácido siálico total, ligado e livre; mucina, peroxidase da ST do RNT, de ambos os sexos; não havendo diferenças estatisticamente significante entre os componentes da saliva.....	30
Tabela 6.4	Características Salivares do RNT relacionada pelo Gênero: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase. Amostra bastante semelhante; nas médias, medianas, variações. Não há diferenças estatisticamente significantes	31
Tabela 6.5	Distribuição das características salivares dos recém-nascidos de acordo com a primeira gestação ou não, maternas: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase. Não há diferenças estatisticamente significantes entre eles.....	32
Tabela 6.6	Distribuição das características salivares dos RNT de acordo com as notas 8 e 9 do Índice de Apgar no 1º minuto pós-natal: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase;mostrando diferença significativa, obtida pelo teste exato de Fisher, para AAS entre os RNT com nota 8.....	33
Tabela 6.7	Evolutiva das notas no Índice de Apgar de primeiro minuto com nota 8 e 9, para as notas do 5º e 10º minuto, onde verifica-se diferença significativa na evolução das notas do primeiro para o quinto minuto, para os de nota 8.....	34
Tabela 6.8	Características Salivares do RNT, ambos os sexos: volume de ST; pH; fluxo; alfa amilase; proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina; peroxidase, relacionando ao Índice de Apgar 5º minuto.....	35

Tabela 6.9 Distribuição das características salivares dos RNT, de acordo com as notas 9 e 10 do Índice de APGAR no décimo minuto pós-natal, ambos os sexos. Sem diferenças significativas e sim grande semelhança para pH, alfa amilase, e ácido siálico livre.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Glândulas Salivares Maiores.....	2
Figura 2	Adenômero.....	3
Figura 3	Micro Esponja Oftálmica Estéril (MOE).....	21
Figura 4	RNT em posição de Coleta de ST.....	22

Resumo

Silva MD. Análise de características orgânicas, pH e fluxo de saliva total não estimulada de recém nascido a termo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

Introdução: A saliva total (ST) além do produto das glândulas salivares estará acrescida de resíduos da descamação celular das mucosas oral, cavidade nasal, faringe; fluidos gengivais, leucócitos, bactérias, restos alimentares, hormônios, drogas e etc. Entre outras características está sua capacidade protetora e cicatrizante. **Objetivo:** Avaliar e verificar a atividade das enzimas, alfa amilase e peroxidases; ácido siálico, concentração proteica de mucinas e proteínas totais; pH e fluxo na ST não estimulada de recém nascido a termo (RNT) em aleitamento materno exclusivo. **Casuística e Metodologia:** As amostras salivares foram colhidas de 22 RNT em aleitamento materno exclusivo; do alojamento conjunto, do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), no período de setembro a outubro de 2017, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis. Critérios de Inclusão: RNT saudáveis, em aleitamento materno exclusivo, com peso adequado para idade gestacional (AIG). Critérios de Exclusão: Portadores de doença sistêmica, Malformação Congênita, Doenças Neurológicas, Sepses neonatal, Distúrbios metabólicos de difícil correção (hipoglicemia refratária), Distúrbios hidroeletrólíticos, Distúrbios ácido/básicos, Doenças hemolíticas, Infecções Congênitas do grupo ZTORCHS. **Resultados:** Verificamos a presença de todos os componentes do estudo (alfa amilase, peroxidases; ácido siálico, concentração proteica de mucinas e proteínas totais, pH e fluxo), em quantidade pequena, justificada pela imaturidade funcional das glândulas salivares, sem diferenças estatísticas entre elas. Verificamos para esta amostra diferenças estatisticamente significante quanto à: idade das mães de primeira gestação; a evolução das notas do índice Apgar de primeiro minuto para as notas do quinto minuto de vida extrauterina; como elemento mais significativo dos resultados, está a quantidade aumentada de alfa amilase para os recém nascidos de nota oito na índice de Apgar do primeiro minuto. **Conclusão:** A saliva total embora sofra modificações quantitativas e qualitativas com o crescimento desenvolvimento da criança, neste precoce período neonatal reflete não só seu caráter protetor e indiretamente imunológico; o funcionamento glandular; assim como através da quantidade aumentada de alfa amilase nos recém nascidos com nota oito do índice de Apgar, mostrando a ação do Sistema Nervoso Simpático e Parassimpático, uma vez que as glândulas salivares reagem de forma direta a seus estímulos.

Descritores: lactantes; recém nascidos; saliva; alfa-amilases; proteínas salivares; ácido siálico; índice de Apgar.

Abstract

Silva MD. *Analysis of organic characteristics, pH and total unstimulated saliva flow of full-term newborns* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: The total saliva (TS) in addition to the salivary gland product will be increased by residues of the cellular desquamation of the oral mucosa, nasal cavity, pharynx; gingival fluids, leukocytes, bacteria, food debris, hormones, drugs, and so on. Among other characteristics is its protective and healing capacity. **Objective:** To evaluate and verify the activity of the enzymes, alpha amylase and peroxidases; sialic acid, protein concentration of mucins and total proteins; pH and flow in the unstimulated ST of term newborn (TNF) in exclusive breastfeeding. **Casuistry and Methodology:** Salivary samples were collected from 22 TNF in exclusive breastfeeding; of the University Hospital of the University of São Paulo (HU-USP), from September to October 2017, after signing an informed consent form. Inclusion Criteria: RNT healthy, exclusively breastfed, with adequate weight for gestational age (AIG). Exclusion Criteria: Systemic disease carriers, Congenital malformation, Neurological diseases, Neonatal sepsis, Metabolic disorders of difficult correction (hypoglycemia refractory), Hydroelectrolytic disorders, Acid / basic disorders, Hemolytic diseases, Congenital infections of the ZTORCHS group. **Results:** We verified the presence of all components of the study (alpha amylase, peroxidases, sialic acid, protein concentration of mucins and total proteins, pH and flow), in a small amount, justified by the functional immaturity of the salivary glands, without statistical differences between them. We verified for this sample statistically significant differences as to: the age of the mothers of first gestation; the evolution of the first-minute Apgar score notes to the fifth-minute notes of extrauterine life; as the most significant element of the results is the increased amount of alpha amylase for infants of note eight in the first minute Apgar score. **Conclusion:** Although total saliva undergoes quantitative and qualitative changes with the child's growth development, in this early neonatal period it reflects not only its protective and indirectly immunological nature; glandular functioning; as well as through the increased amount of alpha amylase in newborns with an eight note Apgar score, showing the action of the Sympathetic and Parasympathetic Nervous System, since the salivary glands react directly to their stimuli

Descriptors: infant; infant, newborn; saliva; alpha-amylases; salivary proteins; sialic acid; Apgar score

1. INTRODUÇÃO

A saliva é produto das glândulas salivares, no homem, três pares de glândulas salivares maiores: Parótidas, Submandibulares, Sublinguais (Fig.1), e de várias glândulas salivares menores distribuídas nas mucosas jugais, labiais internas, bordo lateral da língua e palato mole.

As glândulas salivares são sustentadas por um estroma conjuntivo e abastecidas por um suprimento vâsculo-nervoso especializado.

<http://slideplayer.com.br/1778648/7/images/Glandulas.jpg>

Figura 1- Glândulas Salivares Maiores

A saliva contém aproximadamente 99% de água e 1% de conteúdo sólido (componentes orgânicos e inorgânicos).

Entre suas ações primordiais está a lubrificação dos tecidos orais, e remoção de microrganismos por suas propriedades excretoras, o tamponamento ácido/base que reequilibra e protege a da mucosa oral.

Participa ativamente do processo digestivo desde o início, favorece a qualidade gustativa; a deglutição e ao banhar a superfície dental é veículo de remineralização do esmalte dentário.

A saliva é resultante da modificação dos líquidos intersticiais, originários dos capilares sanguíneos próximos, à unidade morfofuncional da glândula salivar, o adenômero (Fig. 2).

<https://image.slidesharecdn.com/secreosalivar-qualificao-120731114135-phpapp02/95/secreo-salivar-11-728.jpg>

Figura 2 - Adenômero

No adenômero estão contidos os ácinos, que se arranjam formando uma luz, cuja porção final resulta no sistema ramificado de ductos.

A histologia do ácino qualifica a glândula salivar em mucosa, serosa e mista. Estas diferentes histologias liberam conteúdo glicoproteico em proporções diferentes também na composição final.

O produto do ácino seroso é mais aquoso, enquanto o do ácino mucoso é mais viscoso e rico em proteínas, entre elas a mucina.

A secreção salivar deve ser compreendida como um “MOVIMENTO UNIDIRECIONAL DE LÍQUIDO, ELETRÓLITOS E MACROMOLÉCULAS PARA DENTRO DA SALIVA”, dito por Edgar M. et al (2010).

A entrada de líquidos intersticiais originários de capilares sanguíneos próximos ao adenômero ocorre por via trans ou para celular (ácino salivar).

Em resposta a estímulos neurais, desencadeiam-se processos químicos no interior dos ácinos, levando à secreção de macromoléculas, líquidos e trocas eletrolíticas.

Por biofeedback ocorre a liberação da secreção produzida no interior do ácino, ou não.

Esta quantidade de líquidos, eletrólitos, macromoléculas liberados na luz dos ácinos é a saliva primária.

A saliva primária se move pelos ductos intercalados (Fig.2), que funcionam de modo semelhante ao ácino salivar, por secretarem bicarbonato e líquidos embora sua produção proteica seja menor que a acinar. No ducto estriado ocorre a reabsorção do bicarbonato, como um dos eletrólitos do interior da saliva.

A saliva como produto das glândulas salivares, acrescida de resíduos da descamação da mucosa oral, da mucosa nasal, faringe, fluidos gengivais, leucócitos, bactérias, drogas e restos alimentares compõe a Saliva Total (ST).

Refletindo condição local ou sistêmica, patológica ou não. (Slavkin HC, 1998).

Na pesquisa da Síndrome de Sjögren, o sintoma prevalente é a sensação de boca seca, Hu S Wang, J et al em 2007, relata alterações na gênese proteica no interior da glândula salivar.

Kadashetti V et al, em 2015, mostraram a efetividade e acurácia da ST como recurso de monitoramento da glicose sistêmica, em adultos e crianças.

Além de sua utilização pela nanotecnologia, como fonte de pesquisa preventiva e diagnóstica de doenças sistêmicas (Amado F et al, 2010).

A cavidade oral é sabidamente porta de entrada de microrganismos, sendo que a colonização dos microrganismos comensais que farão parte da flora local, ocorre quase imediatamente ao nascimento.

Para que haja equilíbrio na ocupação dos microrganismos é necessário o funcionamento perfeito do sistema de proteção das mucosas orais, capacitando o RNT a adaptar-se à colonização.

Embora o RNT apresente seu sistema de resposta imunológica ainda em amadurecimento, ele conta com barreiras naturais como a pele e seus bacteriostáticos, enzimas digestivas (Ceccon, MEJ et al, 1997), além das barreiras químicas como os ácidos graxos, e o sistema de proteção das membranas mucosas.

1.1. Componentes Orgânicos pH e Fluxo Salivares

1.1.1. Atividade Enzimática

Alfa Amilase

A amilase pode ser do tipo alfa e beta, quando encontramos o tipo beta na cavidade oral é de origem bacteriana (Nicolau J, 2008).

A alfa amilase salivar (AAS) é objeto de pesquisa desde o século XIX (Zakowski JJ; Bruns DE, 1985), é uma endo-enzima digestiva secretada pela Glândula Parótida (Fig.1), cálcio dependente.

Atua sobre o amido, quebrando as ligações carbônicas pela adição de água (Bernefeld P, 1955; Fisher EH and Stein EA, 1960), produzindo maltose, glicose, e oligossacarídeos.

A digestão promovida pela enzima no ambiente bucal é parcial, ela se completa no intestino pela atuação da amilase pancreática, embora evidências científicas mostrem que um terço do amido ingerido sofre a ação da AAS no ambiente estomacal (Nicolau J, 2008).

Na presença do Cloro, AAS aumenta sua afinidade ao Cálcio, conferindo maior resistência à sua estrutura. Vários autores relatam a presença de AAS no ambiente estomacal do RNPT alimentado com fórmula acrescida de glicose (Hodge C et al, 1983).

Tem ação antimicrobiana, AAS liga-se à membrana celular bacteriana sem perder sua função.

A glândula Parótida secretora da AAS é bastante solicitada durante a amamentação e mastigação, sugerindo que ambas as funções estimulem a produção salivar no adulto, e a maturação glandular no RN (Proctor G.B., Capenter G.H. 2007).

Mudanças na atividade AAS são observadas com a idade.

Desde níveis indetectáveis no período neonatal precoce, até níveis próximos ao do adulto por volta dos seis a doze meses de idade.

Quando da introdução de novas fontes alimentares (Dezan et al 2002), voltando a diminuir depois desta fase.

Existem relatos de divergências nas respostas dos níveis de atividade da alfa amilase salivares, na ST estimulada por meios mecânicos.

Estas diferenças podem estar ligadas a agrupamentos mistos das faixas etárias nas comparações pesquisadas, origens genéticas, étnicas, ou ainda ao alto teor de amido nas dietas nutricionais (Yang Z-M et al, 2015).

Nos estudos literários realizados por Bellavia et al em 1979; que realizaram sua pesquisa com ST de 25 RN entre o 3º e 15º dias de vida, estimulada por cristais de sacarose; citam que há também baixa atividade da alfa amilase nos fluidos digestivos, nível baixo no fluído corporal, e também na urina do recém-nascido.

Na inflamação da glândula Parótida (Caxumba), ocorre um aumento da amilase nos fluídos corporais, e conseqüentemente na urina.

. Nesta última década AAS vem sendo relacionada ao funcionamento do Sistema Simpático e Parassimpático, uma vez que as glândulas salivares são influenciadas em seu funcionamento por estes sistemas. (Bosch J.A., Veerman ECI, Geus E J, Proctor GB, 2011).

Assim, o sAA tem sido proposto como um potencial biomarcador não invasivo para a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) (Nater e Rohleder, 2009).

Vários trabalhos apontam a apontam também como marcador de estresse, por responder prontamente a estímulos biopsicossociais estressores.

Peroxidase

A peroxidase é uma enzima óxido-redutora classificada em duas grandes famílias:

1ª - derivada de plantas, fungos, bactérias

2ª - derivada dos tecidos de mamíferos

A peroxidase salivar (PS) é responsável pela catalisação do tiocianato para hipocianato, na presença do peróxido de hidrogênio. É produto das glândulas Submandibular e Parótida.

Inúmeras doenças da cavidade bucal são inibidas pela oxidação do sistema peroxidase. Sua atividade sofre a influência estimuladora de fatores como frio e stress (Banerjee&Datta,1986).

Esta enzima é encontrada também na série leucocitária, com o nome de mieloperoxidase quando no polimorfonuclear neutrófilo, eosinofiloperoxidase nos eosinófilos.

Encontra-se também na glândula tireoide (tireoideperoxidase). No do leite humano (lactoperoxidase).

Está presente também na saliva, lágrima e fluido vaginal. A peroxidase é uma glicoproteína simples exercendo função antimicrobiana na cavidade oral além de proteger as células glandulares (Nicolau, J. 2008).

1.1.2. Concentração de Ácido Siálico

Ácido Siálico

O ácido siálico (AS) é componente estrutural das glicoproteínas, que aparecem naturalmente no final das cadeias de açúcares, anexam se a superfícies celulares e proteínas solúveis, segundo Wang et al, 2003.

Está presente no trato respiratório, digestivo, urogenital, e no cérebro. Onde faz parte estrutural dos gangliosídeos cerebrais na sinaptogênese e na transmissão neural.

Em experimentos de cultura celular do Sistema Nervoso Central na qual se acrescenta AS ocorre um aumento dos gangliosídeos e regeneração neuronal (Carlson S. 1985; Corfield AP, Schaur R., 1982), sendo ainda associado em estudos com animais à habilidade de aprender.

Quando observado em experimentos laboratoriais um decréscimo na concentração de AS no cérebro do animal, houve atraso do desenvolvimento do mesmo, caracterizado por distúrbio comportamental.

O AS no organismo humano encontra-se na forma de ácido N-acetilneuramínico (NANA).

Ácido Siálico Livre

O ácido siálico livre (AS-li) é um chamariz bacteriano, atraindo a membrana bacteriana ao seu ligante carbônico; propiciando a aglutinação bacteriana.

Em 2010, Pannunzio E et al, constataram na ST estimulada de crianças com idades entre 7-10 anos, obesas, e em sobrepeso; um aumento de AS livre e proteínas totais; e decréscimo na atividade da peroxidase e fosfato, colocando-as em um grupo de risco para cárie dental.

Também em adultos epiléticos, com higiene oral precária; verifica-se uma quantidade considerável de AS livre. Justificando seu caráter protetor da cavidade bucal (A. V. Nieuw Amerongen et al.1994).

Ácido Siálico Total

O AS nas apresentações AS-li, ácido siálico total (AS-t) e ácido siálico ligado (AS-lig); tem ação antimicrobiana, protetora, e lubrificante dos tecidos moles.

Em 1997 Tram TH, constatou na ST de crianças no 5º mês de vida, em aleitamento materno, diferença significativamente maior da concentração de AS-t e AS-li, quando comparadas às concentrações encontradas destes

componentes, na saliva de crianças da mesma faixa etária alimentadas por fórmulas.

A concentração de AS-t na ST de crianças em aleitamento materno era até 50% maior, enquanto a concentração de AS-li foi o dobro daquela encontrada nas alimentadas com fórmulas, sugerindo ser o leite materno uma fonte rica deste açúcar.

Ainda neste estudo, verificou-se que apesar das diferenças, algumas sobreposições nos resultados entre os grupos alimentados com fórmulas e em aleitamento materno, sugerem que as crianças nesta faixa etária (cinco meses) tenham capacidade variável de sintetizar seu próprio AS, ou incapacidade de absorvê-lo das suas fontes nutricionais.

Wang et al. em 2003, analisaram o córtex frontal de crianças que sofreram Síndrome de Morte Súbita, verificando maior concentração de AS e maiores gangliosídeos cerebrais nos RN em aleitamento materno desde o período neonatal, comparados aos alimentados por fórmulas.

Os autores sugeriram um aumento da sinaptogênese, bem como do desenvolvimento neuropsicomotor na presença do ácido siálico.

Ácido Siálico Ligado ou Combinado

Na ST o ácido siálico ligado (AS-lig), quando unido às cadeias de mucinas tem caráter lubrificante.

Esta capacidade de liga/ desliga, do AS, é primordial para a estabilidade de sua estrutura modular, reconhecimento do processo celular, e o seu processo de comunicação.

1.1.3. Proteínas

Mucinas

As mucinas são glicoproteínas, primárias na formação da viscoelasticidade do muco, regulam as agressões ambientais, impedem o

ressecamento das superfícies epiteliais, controlam a permeabilidade da superfície da mucosa, limitam a penetração de potenciais irritantes e toxinas nas células mucosas, protegem as membranas das células mucosas contra as proteases geradas por bactérias nas placas bacterianas, ao redor dos dentes, e regulam a colonização da cavidade oral por bactérias e vírus.

Sua estrutura química é específica para o local de atuação. Sua porção terminal tem estruturas glicana, que facilitam sua união a outras estruturas, e são solúveis.

A mucina salivar protege as camadas epiteliais subjacentes, sendo abrigo para a microbiota saprófita oral, ainda assim, prevenindo doenças bucais específicas (Frenkel ES, Ribbeck K, 2015).

Ela é produto das glândulas Submandibulares e Sublinguais (Fig.1), estruturalmente diferentes; com quantidades substanciais de AS.

Proteínas Totais

A cavidade oral compreende um mosaico proteico de grande importância pela função biológica desempenhada:

- Defesa imune e homeostasia de biofilme;
- Decomposição de nutrientes e remineralização de tecidos duros dentários.

O proteoma salivar é muito complexo, além de regulador iônico de sinalizadores solúveis, locais e sistêmicos. As atuais investigações científicas nanotecnológicas, nos seus diversos proteomas vem nos esclarecendo mais e mais. As incursões neste universo, pela nanotecnologia utilizando a ST como fonte de pesquisa, diagnóstico e prevenção de doenças sistêmicas (Amado F et al, 2010), tem propiciado um conhecimento mais amplo das proteínas locais (Schweigel H, Wicht M, Schwendicke F, 2016).

1.1.4. Fluxo

O fluxo salivar fornece a medida temporal da produção salivar.

Tem influência quantitativa inversa na composição orgânica e inorgânica salivar.

Ele varia significativamente entre indivíduos, e no mesmo indivíduo sob condições diferentes, tais como estímulo, medicações, horário, etc.

Influi diretamente no processo de diluição, eliminação de substrato bacteriano, açúcares este processo também é conhecido como “clearance”. Quanto maior o fluxo mais rápido será a eliminação do substrato, enquanto sua diminuição traz irritação à mucosa bucal, dificuldade de fala e deglutição redução de paladar, é estímulo a processos de cárie.(Dawes et al, 2010).

1.1.5. pH

O pH de uma solução é o logaritmo do inverso da concentração de hidrogênio.

A concentração de íons hidrogênio $[H^+]$ na água pura será exatamente igual à dos íons hidroxila $[OH^-]$, $H_2O \rightleftharpoons [H^+] + [OH^-]$ (Nicolau,J, 2008).

O pH permite a comparação de diferentes soluções, relaciona-se ao aumento, diminuição e equilíbrio hidrogeniônico frente às alterações químicas, que ocorrem constantemente na cavidade bucal, interferindo nos reagentes de uma para outra solução, tendo em vista a preservação dos tecidos bucais (Pinheiro, CE, 1982).

O pH da ST no repouso é por volta de 6,7.(Dawes et al, 2010).

1.1.6. Volume Salivar

Baseando-nos em trabalhos realizados em adultos, o volume e a composição salivar podem variar na cavidade oral de acordo com a

glândula; o horário; a presença ou não de estímulo e sua intensidade, por exemplo, o estímulo olfativo, próximo às refeições.

Na pesquisa salivar, pode-se coleta-la de forma estimulada ou não.

Na coleta estimulada, cujo estímulo pode ser químico gustativo, ou mecânico.

No químico gustativo contribuirão para o volume salivar as glândulas Parótida e Submandibular de forma semelhante, enquanto no estímulo mecânico sem sabor, a contribuição glandular é maior da Parótida.

Na coleta estimulada, o volume de 1 mL de ST é alcançado relacionado ao tempo, com facilidade.

Vale lembrar que $1\text{mL} = 1000\ \mu\text{l}$.

Na coleta de ST não estimulada será de grande interferência o grau de hidratação do indivíduo, a exposição à luz, e a posição corporal, que deve ser a mais relaxada e confortável possível.

A velocidade de produção e excreção salivar, lenta na coleta não estimulada, permite o enriquecimento da saliva pelos ductos salivares dos terminais glandulares (Fig.2).

2. JUSTIFICATIVA

As características dos componentes orgânicos salivares revisitados no capítulo anterior, a escassez de ensaios e pesquisas na ST não estimulada do recém-nascido, além da mínima invasividade de coleta.

Estimulou-nos a verificar a presença ou não, destes componentes orgânicos, pH e fluxo de saliva total não estimulada de recém-nascido a termo, alimentados com leite materno exclusivamente, no segundo dia de vida pós-natal.

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que possamos esboçar o perfil dos componentes orgânicos, pH e Fluxo da Saliva Total não estimulada dos RNT alimentados com leite materno, no segundo dia de vida pós-natal.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar a presença e quantificar atividade das enzimas, alfa amilase e peroxidases; ácidos siálicos, concentração proteica de mucinas e proteínas totais, pH e fluxo na ST não estimulada de recém-nascido de termo (RNT) em aleitamento materno exclusivo, no segundo dia de vida pós-natal.

4.2. Específico

Verificar se estes componentes orgânicos, pH e fluxo da ST não estimulada de RNT em aleitamento materno exclusivo, no segundo dia de vida pós-natal, sofrem a influência do Índice de Apgar, primeira gestação ou não, gênero.

5. METODOLOGIA

5.1. Casuística

As amostras salivares foram coletadas de 22 RN a termo em aleitamento materno exclusivo; no alojamento conjunto, da Unidade Neonatal do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), durante o período de setembro/ outubro 2017. A coleta foi realizada após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecida (TCLE) pelos responsáveis dos RNT.

Projeto de Pesquisa Aprovado:

* CAAE 24825813.4.3001.0076

** Registro CEP-HU/USP: 1356/14

5.2. Critérios de Inclusão

- RN de Termo de ≥ 37 semanas até ≤ 41 e 6/7 semana pelo método Capurro, saudável, em aleitamento materno exclusivo.
- Peso adequado para a idade gestacional (AIG), método de Capurro
- Em alojamento conjunto.

5.3. Critérios de Exclusão

- Portadores de doença sistêmica
(Por exemplo, as causadas por Citomegalovírus na gravidez)
- Malformação Congênita Craniofacial
- Doenças Neurológicas
- Sepses neonatal
- Distúrbios metabólicos de difícil correção (hipoglicemia refratária)
- Distúrbios hidroeletrólíticos
- Distúrbios acidobásicos
- Doenças hemolíticas
- Sofrimento Respiratório
- Incompatibilidade materna fetal

- Infecções Congênitas do grupo TORCHS
- Síndromes genéticas e cromossomopatias
- Fototerapia

5.4. Brochura do Pesquisador

Para todo par mãe/RNT, foi preenchido um formulário constando dados pessoais, identidade de Registro Geral, gênero, idade.

Os antecedentes maternos obstétricos e pessoais; neonatal do RNT e clínico hospitalar de ambos, foram anotados do prontuário de atendimento realizado pelas equipes técnicas e médicas durante o período Pré, e Pós-Parto Imediato do HU-USP.

5.5. Instrumento de Coleta

Figura 3 - Micro Esponja Oftálmica Estéril (MOE)

Para cumprir o quesito de saliva “**não estimulada**”, proposta, este estudo utilizou como coletor salivar no RNT, a micro esponja oftálmica estéril (Fig.3).

5.6. Coleta das Amostras

As amostras salivares foram coletadas do RNT, no alojamento conjunto da Unidade Neonatal, sendo necessário que o mesmo estivesse em intervalo de mamada entre trinta e quarenta minutos no mínimo.

A coleta tinha início após o intervalo de cinco minutos da realização da limpeza da boca do RNT, com gaze umedecida com água destilada.

O RNT permanecia em seus berços, com a cabeça ligeiramente mais alta que os pés, deitados lateralmente. (Fig.4).

Figura. 4 - RNT em posição de Coleta de ST

As Microesponjas oftálmicas foram colocadas na região de fundo de saco esquerdo e/ou direito por períodos de 8 a 10 minutos, sendo então removidas para esvaziamento das mesmas, em tubos de coleta (ependorfes), e acondicionados em caixas térmicas com gelo. O procedimento se repetiu até que se completasse o volume salivar mínimo de cento e oitenta microlitros (180 μ L), necessário para as análises laboratoriais.

O intervalo máximo para coleta ficou entre 20 e 40 minutos conforme o fluxo salivar do RNT; na presença da mãe, no alojamento conjunto.

As amostras coletadas foram identificadas em sequencia numérica, de acordo com a coleta, e encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo(LBO/Odonto USP). Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises, sob a coordenação do Prof. Fernando Neves Nogueira e da Dra. Alyne Simões Gonçalves.

5.7. Análise das Amostras Salivares

Nossos experimentos laboratoriais foram lidos no espectrofotômetro, que nos informa sobre a qualidade e a quantidade do elemento pesquisado.

Em nossa pesquisa usamos a faixa de 400 a 800 nanômetros (luz visível), para leitura dos resultados da alfa amilase, da peroxidase, ácido siálico e proteínas totais.

A leitura é possível pela excitação das moléculas do componente analisado.

Nesta pesquisa da ST do RNT alimentado com leite materno, no segundo dia de vida pós-natal, foi necessário a diluição da saliva coletada, para atingir os níveis da curva padrão do protocolo do LBO/Odonto USP para cada componente da ST coletada, de acordo com nossa pesquisa.

Alfa Amilase Salivar

A atividade da amilase foi determinada pelo método de Fisher e Stein (1961) modificado por Bellavia (1979). As amostras foram incubadas em solução tampão de amido1%, e tamponadas por em fosfato de sódio por 5 minutos a 37°C, sendo a reação interrompida com solução alcalina de ácido de dinitrosalicílico. A absorbância será lida em 530nm.

A ST foi diluída para a realização do experimento na proporção 1: 50

Peroxidase Salivar

A peroxidase salivar foi determinada pela alteração da absorbância a 460nm segundo técnica de Anderson, LC (1986) e Chandra, T. (1977), após tamponamento com fosfato de sódio, ocorreu a coloração reacional pela ação do o-dianisidina dissolvida em metanol.

Leitura realizada em 460nm

Não houve diluição para realização do experimento, usamos 30µl.

Ácido Siálico

O ácido siálico foi medido por combinação modificada dos métodos de Aminoff (1961) e de Skoza e Mohos (1976), usando como padrão o NANA na forma livre. Para determinação do AStotal usamos o padrão anteriormente citado, com hidrólise da amostra com ácido sulfúrico.

A porção combinada foi obtida por subtração dos resultados.

Leitura realizada a 549 nm, e a diluição salivar para realização do experimento foi de 1:100.

Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al, 1961), numa referência estabelecida com a solução de padrão de albumina (albumina+cobre) e reativo de Folin. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 660nm, ST diluída a 1:50.

pH

Foi medido no momento da coleta, com papel pH 0-14,0 Merck.

Fluxo Salivar

É a razão entre:
$$\frac{\text{o volume total coletado}}{\text{pelo tempo de coleta}}$$

Observação: todas as diluições da ST coletada, foram consideradas na obtenção dos resultados.

5.8. Metodologia Estatística

O calculo amostral foi baseado nas estimativas de ácido siálico salivar livre em RNT16mg/l obtido por Tram,TH et al, em1997 e, supondo desvio padrão = 2,1; probabilidade de erro alfa de 0,05; poder estatístico de 95%, seriam necessários 11 indivíduos na pesquisa. Optamos por este trabalho por considerar a “coleta de ST não estimulada” do autor; bem como a escassez de pesquisa na faixa etária deste trabalho.

Foram usadas como variáveis numéricas:

- *Materna:* Idade; Nº de gestações; Colostro antes do nascimento;
- *RNT:* Volume ST do RNT; Fluxo; Alfa amilase; Proteínas totais; AS Total; AS Ligado; AS Livre; Peroxidase; Mucina; Idade Gestacional Capurro; Peso nascimento; Peso coleta salivar Comprimento.

Como variáveis categóricas usou-se

- Tipo de parto;
- Primeira gestação ou não;
- Índice de apgar: 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos.

Para comparar as variáveis categóricas em relação a variáveis numéricas aplicou se o teste t de Student; teste exato de Fisher, o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, na verificação da normalidade das variáveis numéricas o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos

* STATA Corp. 2007. Stata Statistical Software: Release 10.0. College Station, Texas: Stata Corporation.

6. RESULTADOS

Os resultados podem ser observados nas tabelas de 6.1; 6.2; 6.3; 6.4; 6.5; 6.6; 6.7; 6.8; 6.9..

Tabela 6.1 observa-se as características demográficas e clínicas das mães.

A Tabela 6.2 referente às características clínicas dos RNT, alimentados com leite materno, no segundo dia pós-natal de ambos os sexos.

Na Tabela 6.3, observamos os valores do volume salivar, pH, Fluxo, Alfa Amilase, Proteínas Totais, Ácido Siálico nas formas totais, ligado e livre, Mucina e Peroxidase, do RNT alimentados com leite materno, no segundo dia pós-natal de ambos os sexos. A amostra não demonstram diferenças significativas entre seus componentes.

Na Tabela 6.4, observamos os mesmos parâmetros salivares analisados na tabela anterior (6.3), contudo os RNT estão distribuídos de acordo com o gênero.

A Tabela 6.5, mostra os parâmetros salivares volume salivar, pH, Fluxo, Alfa Amilase, Proteínas Totais, Ácido Siálico nas formas totais, ligado,e livre, Mucina e Peroxidase, para ambos os sexos; distribuídos de acordo com a primeira gestação ou não.

Na Tabela 6.6, os valores do volume salivar, pH, Fluxo, Alfa Amilase, Proteínas Totais, Ácido Siálico nas formas totais, ligado,e livre, Mucina e Peroxidase, do RNT alimentados com leite materno, cujas amostras foram colhidas no segundo dia pós-natal, em ambos os sexos; foram distribuídos de acordo com as notas 8 e 9 do Índice de Apgar de primeiro minuto pós-natal.

A tabela 6.7 discrimina a evolução das notas do Índice de Apgar a partir do primeiro minuto de vida pós- natal.

A Tabela 6.8, mostra os parâmetros da saliva total do RNT tabela anterior, na mesma condição de coleta, porém distribuídos de acordo com as notas do Índice de Apgar no quinto minuto de vida pós-natal.

Na Tabela 6.9, características da saliva total, pH, Fluxo, do RNT alimentados com leite materno, cujas amostras foram colhidas no segundo

dia pós-natal, em ambos os sexos; relacionando-os com as notas do Índice de Apgar do décimo minuto.

Tabela 6.1 - Características demográficas e clínicas descritivas das mães: idade, número de gestações, frequência da primeira gestação ou mais, frequência do tipo de parto, a presença de colostro antes do nascimento

Variável	Categoria/Medidas	Freq.(%)/ Medidas
Idade da mãe (anos)	n	22
	Variação	17 - 39
	Mediana	26,5
	Média (DP)	26,2 (6,3)
Número de gestações	n	22
	Variação	1 - 8
	Mediana	2
	Média (DP)	2,3 (1,6)
Gestações	1	31,8%
	1+	68,2%
Parto	Normal	54,6%
	Fórceps	13,6%
	Cesariana	31,8%
Colostro antes do nascimento (semanas)	n	18
	Variação	1 – 20
	Mediana	8
	Média (DP)	8,5 (5,7)

DP = Desvio padrão; Freq. = Frequência; n = Número de casos analisados; variação, mediana, média, desvio padrão

Tabela 6.2 - Características descritivas clínicas do RNT, ambos os sexos, mostrando: idade gestacional Capurro em semanas, peso de nascimento em gramas, comprimento em centímetros, Índice de Apgar no minuto 1 (notas 8 e 9); no minuto 5 (notas 9,10); no minuto 10 (notas 9,10)

Variável	Categoria/Medidas	Freq. (%) / Medidas
IG. Capurro (semanas)	N	22
	Variação	38 2/7 - 41 1/7
	Mediana	40
	Média (DP)	39 2/7 (6/7)
Peso nascimento (gramas)	N	22
	Variação	2650 – 4055
	Mediana	3480
	Média (DP)	3390 (359,8)
Comprimento (cm)	N	16
	Variação	46 – 53
	Mediana	49,7
	Média (DP)	49,7 (1,6)
Escala de Apgar 1'	8	12 (54,5)
	9	10 (45,5)
Escala de Apgar 5'	9	17 (77,3)
	10	5 (22,7)
Escala de Apgar 10'	9	4 (18,2)
	10	18 (81,8)

(') = minuto; DP = Desvio padrão; Freq. = Frequência; IG = Idade gestacional; n= Número de casos, variação, mediana, média e desvio padrão

Tabela 6.3 - Características da ST mostrando: volume salivar, pH, fluxo salivar, alfa amilase, proteínas totais, ácido siálico total, ligado e livre; mucina, peroxidase da ST do RNT, de ambos os sexos; não havendo diferenças estatisticamente significante entre os componentes da saliva

Variável	Categoria/Medidas	Freq. (%) / Medidas
Volume ST do RN (mL)	N	18
	Variação	0,01 - 0,25
	Mediana	0,135
	Média (DP)	0,13 (0,082)
pH	6	4 (30,8)
	7	9 (69,2)
Fluxo (mL/minuto)	N	13
	Variação	0,0005 - 0,06
	Mediana	0,005
	Média (DP)	0,0121 (0,0195)
Alfa amilase (mg Maltose/mL)	N	17
	Variação	5,0 - 122,7
	Mediana	26,6
	Média (DP)	33,1 (28,3)
Proteínas totais (µg/mL)	N	19
	Variação	140 – 15080
	Mediana	2485
	Média (DP)	3859,6 (4070,5)
Ácido siálico total (µM/mL)	n	19
	Variação	1,98 - 780,95
	Mediana	198,41
	Média (DP)	228,00 (200,38)
Ácido siálico ligado (µM/mL)	n	17
	Variação	2,38 - 626,99
	Mediana	80,15
	Média (DP)	110,50 (151,14)
Ácido siálico livre (µM/mL)	n	18
	Variação	0,24 - 353,96
	Mediana	123,80
	Média (DP)	136,10 (96,01)
Mucina (µg NANA/µg proteína)	n	17
	Variação	0,0007 - 0,8787
	Mediana	0,0257
	Média (DP)	0,1146 (0,2224)
Peroxidase (µg/mL)	n	17
	Variação	38,75- 348,83
	Mediana	84,0
	Média (DP)	123,03 (96,30)

Freq. = Frequência; RN = Recém-nascido; ST = Saliva total

Tabela 6.4 - Características Salivares do RNT relacionada pelo Gênero: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase. Amostra bastante semelhante; nas médias, medianas, variações. Não há diferenças estatisticamente significantes

Variável	Categoria/Medidas	Gênero		p-valor
		Feminino	Masculino	
Volume ST RNT (mL)	n	8	10	0,888
	Variação	0,01 - 0,25	0,01 - 0,25	
	Mediana	0,15	0,135	
	Média (DP)	0,14 (0,08)	0,13 (0,08)	
pH	6	1 (16,7)	3 (42,9)	0,559
	7	5 (83,3)	4 (57,1)	
Fluxo (mL)	n	6	7	0,390
	Variação	0,0005 - 0,06	0,0005 - 0,0125	
	Mediana	0,0063	0,0025	
	Média (DP)	0,0208 (0,027)	0,0046 (0,004)	
Alfa amilase (mg matose/mL)	n	6	11	0,999
	Variação	12,4 - 69,2	5,0 - 122,7	
	Mediana	23,1	28,2	
	Média (DP)	31,4 (22,2)	34,0 (32,2)	
Proteínas totais (µg/mL)	n	6	13	0,430
	Variação	140 - 15080	220 - 11350	
	Mediana	3390	2339	
	Média (DP)	5335,0 (5498,5)	3178,7 (3265,9)	
AS total(µM/mL)	n	6	13	0,236
	Variação	113,5 - 780,9	1,98 - 556,3	
	Mediana	220,2	196,8	
	Média (DP)	314,1 (250,8)	188,2 (169,1)	
AS ligado (µM/mL)	n	6	11	0,159
	Variação	20,6 - 627,0	2,4 - 261,1	
	Mediana	111,9	66,7	
	Média (DP)	173,4 (226,5)	76,2 (85,0)	
AS livre (µM/mL)	n	6	12	0,890
	Variação	73,0 - 307,1	0,24 - 353,96	
	Mediana	113,1	134,9	
	Média (DP)	140,7 (86,4)	133,8 (104,1)	
Mucina (µg NaNa/µg Proteína)	n	6	11	0,763
	Variação	0,0053 - 0,8787	0,0007 - 0,3968	
	Mediana	0,0286	0,0257	
	Média (DP)	0,1687 (0,3484)	0,0851 (0,1254)	
Peroxidase (µg/mL)	n	6	11	0,392
	Variação	38,75- 122,73	38,75 - 348,83	
	Mediana	88,20	84,00	
	Média (DP)	81,07 (33,58)	145,92 (112,43)	

Considerando diferença estatística significativa quando $p < 0,05$ Ac. = ácido; DP = Desvio padrão; RNT = Recém-Nascido Termo; ST = Saliva total

Tabela 6.5- Distribuição das características salivares dos recém-nascidos de acordo com a primeira gestação ou não, maternas: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase. Não há diferenças estatisticamente significantes entre eles

Variável	Categoria/Medidas	Primeira gestação		p-valor
		Sim	Não	
Volume ST RN	N	5	13	0,205
	Variação	0,10 - 0,20	0,01 - 0,25	
	Mediana	0,20	0,10	
	Média (DP)	0,18 (0,04)	0,12 (0,09)	
pH	6	0 (0,0)	4 (50,0)	0,105 *
	7	5 (100,0)	4 (50,0)	
Volume do fluxo (mL)	N	4	4	0,439 **
	Variação	0,0025 - 0,009	0,0005 - 0,06	
	Mediana	0,0063	0,0016	
	Média (DP)	0,0060 (0,0027)	0,0148 (0,0232)	
Alfa amilase (mg/mL)	N	5	12	0,342 **
	Variação	8,7 - 37,5	5,0 - 122,7	
	Mediana	24,0	28,2	
	Média (DP)	22,2 (11,3)	37,7 (32,3)	
Proteínas totais (µg/mL)	N	6	13	0,726 *
	Variação	220 - 8240	140 - 15080	
	Mediana	2412	2890	
	Média (DP)	2934,0 (2941,4)	4286,8 (4541,2)	
AS total (µM/mL)	N	6	13	0,203 **
	Variação	3,90 - 233,33	1,98 - 780,95	
	Mediana	153,17	207,14	
	Média (DP)	126,15 (99,08)	275,01 (220,36)	
AS ligado (µM/mL)	N	5	12	0,292 *
	Variação	3,65 - 128,57	2,38 - 626,99	
	Mediana	20,64	85,71	
	Média (DP)	48,51 (54,39)	136,33 (172,27)	
AS livre (µM/mL)	N	5	13	0,361
	Variação	0,24 - 155,55	4,44 - 353,96	
	Mediana	121,42	143,65	
	Média (DP)	101,63 (59,56)	149,35 (105,79)	
Mucina (µgNaNa/µgProteína)	N	5	12	0,461
	Variação	0,0016 - 0,1882	0,0007 - 0,8787	
	Mediana	0,0156	0,0336	
	Média (DP)	0,0500 (0,0786)	0,1415 (0,2588)	
Peroxidase (µg/mL)	N	6	11	0,724
	Variação	45,21- 348,83	38,75- 277,77	
	Mediana	84,97	84,0	
	Média (DP)	153,71 (134,37)	106,29 (70,26)	

** p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; *p-valor obtido pelo teste exato de Fisher; p-valor obtido pelo teste t de Student Ac. = ácido; DP = Desvio padrão; Freq. = Frequência; RN = Recém-nascido; ST = Saliva total

Tabela 6.6 - Distribuição das características salivares dos RNT de acordo com as notas 8 e 9 do Índice de Apgar no 1º minuto pós-natal: volume ST coletado, pH, fluxo, alfa amilase, proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina e peroxidase;mostrando diferença significativa, obtida pelo teste exato de Fisher, para AAS entre os RNT com nota 8

Variável	Categoria/Medidas	APGAR 1ª		p-valor
		8	9	
Volume ST RN	N	9	9	0,346
	Variação	0,04 - 0,25	0,01 - 0,25	
	Mediana	0,15	0,10	
	Média (DP)	0,15 (0,07)	0,12 (0,09)	
pH	6	2 (40,0)	2 (25,0)	0,999 *
	7	3 (60,0)	6 (75,0)	
fluxo (mL)	N	6	7	0,099 **
	Variação	0,0016 - 0,06	0,0005 - 0,05	
	Mediana	0,0075	0,0016	
	Média (DP)	0,0157 (0,022)	0,009 (0,018)	
A. Amilase (mg/mL)	N	10	7	0,045 **
	Variação	5,0 - 122,7	8,7 - 28,2	
	Mediana	39,4	22,3	
	Média (DP)	43,1 (33,3)	18,8 (8,3)	
Proteína total (mg/mL)	N	12	7	0,554 **
	Variação	140 - 11350	220 - 15080	
	Mediana	2185	2890	
	Média (DP)	3307,8 (3435,3)	4805,6 (5139,9)	
Ac. siálico total	N	12	7	0,554 *
	Variação	1,98 - 407,9	3,9 - 780,9	
	Mediana	202,8	164,3	
	Média (DP)	174,8 (113,0)	319,1 (285,8)	
Ac. siálico ligado	N	10	7	0,770 **
	Variação	2,4 - 128,6	3,6 - 627,0	
	Mediana	80,5	40,5	
	Média (DP)	71,4 (44,3)	166,3 (227,6)	
Ac. siálico livre	N	11	7	0,571
	Variação	4,44 - 307,14	0,24 - 353,96	
	Mediana	107,14	153,96	
	Média (DP)	125,43 (88,83)	152,86 (111,50)	
Mucina	N	10	7	0,626
	Variação	0,0007-0,8787	0,0016 0,1934	
	Mediana	0,0367	0,0257	
	Média (DP)	0,1627 (0,2805)	0,0459(0,067)	
Peroxidase	N	10	7	0,557
	Variação	38,75 - 277,77	38,75 - 348,83	
	Mediana	77,5	98,9	
	Média (DP)	105,29 (72,72)	148,37 (124,59)	

Tabela 6.7 - Evolutiva das notas no Índice de Apgar de primeiro minuto com nota 8 e 9, para as notas do 5º e 10º minuto, onde verifica-se diferença significativa na evolução das notas do primeiro para o quinto minuto, para os de nota 8

Variável	Categoria/Medidas	APGAR 1ª		p
		8	9	
Escala de Apgar (5ª)	9	12 (100,0)	5 (50,0)	0,010**
	10	0 (0,0)	5 (50,0)	
Escala de Apgar (10ª)	9	3 (25,0)	1 (10,0)	0,594 **
	10	9 (75,0)	9 (90,0)	

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher; (DP) = Desvio padrão

Tabela 6.8 - Características Salivares do RNT, ambos os sexos: volume de ST; pH; fluxo; alfa amilase; proteínas totais; ácido siálico total, ligado e livre; mucina; peroxidase, relacionando ao Índice de Apgar 5º minuto

Variável	Categoria/Medidas	APGAR 5		p-valor
		9	10	
Volume ST RNT	n	14	4	0,129
	Variação	0,04 - 0,25	0,01 - 0,2	
	Média (DP)	0,15 (0,07)	0,08 (0,09)	
pH	6	3 (33,3)	1 (25,0)	0,099
	7	6 (66,7)	3 (75,0)	
Fluxo (mL/')	n	9	4	0,122
	Variação	0,0016 - 0,06	0,0005 - 0,05	
	Média (DP)	0,0157 (0,022)	0,009 (0,018)	
Alfa amilase (mg Maltose/mL)	n	15	2	0,296
	Variação	5,0 - 122,7	8,7 - 26,6	
	Média (DP)	35,2 (29,4)	17,6 (12,7)	
Proteínas totais (µg/mL)	n	17	2	0,232
	Variação	140 - 15080	220 - 2339	
	Média (DP)	4163,2 (4191,7)	1279,5 (1498,3)	
Ac. siálico total (µg/mL)	n	17	2	0,184
	Variação	1,98 - 780,9	3,9 - 164,3	
	Média (DP)	244,9 (203,6)	84,1 (113,4)	
Ac. siálico ligado (µg NaNa/mL)	n	15	2	0,074
	Variação	2,4 - 627,0	3,6 - 8,7	
	Média (DP)	124,4 (156,0)	6,2 (3,6)	
Ac. siálico livre	n	16	2	0,379
	Variação	4,44 - 353,96	0,24 - 155,5	
	Média (DP)	143,4 (95,6)	77,9 (109,8)	
Mucina (µgNaNa /µg proteína)	n	15	2	0,456
	Variação	0,0007 - 0,8787	0,0016 - 0,0397	
	Média (DP)	0,1271 (0,2346)	0,0206 (0,0269)	
Peroxidase (µg/mL)	n	15	2	0,025*
	Variação	38,75 - 277,77	300,18 - 348,83	
	Média (DP)	96,16 (62,79)	324,50 (34,40)	

(*) = $p < 0,05$ para o teste U de Mann-Whitney; Ac. = ácido; Freq. = Frequência; n = Número de amostras; NaNa = ácido N-acetilneuramínico; RNT = Recém-nascido a termo; ST = Saliva total

Tabela 6.9 – Distribuição das características salivares dos RNT, de acordo com as notas 9 e 10 do Índice de APGAR no décimo minuto pós-natal, ambos os sexos. Sem diferenças significativas e sim grande semelhança para pH, alfa amilase, e ácido siálico livre

Variável	Categoria/Medidas	APGAR 10'		p-valor
		9	10	
	n	4	14	
Volume ST RNT (mL)	Variação	0,045 - 0,25	0,01 - 0,25	0,358
	Mediana	0,19	0,11	
	Média (DP)	0,17 (0,08)	0,13 (0,08)	
pH	6	1 (33,3)	3 (30,0)	0,999
	7	2 (66,7)	7 (70,0)	
	n	4	9	
Fluxo (mL/')	Variação	0,0016 - 0,0125	0,0005 - 0,06	0,395
	Mediana	0,0075	0,0025	
	Média (DP)	0,0073 (0,0462)	0,0142 (0,0233)	
Alfa amilase (mg Maltose/mL)	n	4	13	0,999
	Variação	13,9 - 41,3	5,0 - 122,7	
	Mediana	29,9	26,6	
Proteínas totais (µg/mL)	Média (DP)	28,7 (12,8)	34,4 (31,9)	0,617
	n	4	15	
	Variação	430 - 15080	140 - 11350	
Ac. sialico total (µg/mL)	Mediana	4635	2485	0,080 **
	Média (DP)	6195,0 (6905,0)	3236,8 (3018,7)	
	n	4	15	
Ac. sialico ligado (µg/mL)	Variação	207,1 - 780,9	1,98 - 556,3	0,141
	Mediana	221,8	164,3	
	Média (DP)	357,9 (282,2)	193,3 (168,6)	
Ac.sialico livre (µg/mL)	n	4	13	0,929
	Variação	66,7 - 627,0	2,4 - 261,1	
	Mediana	104,8	40,5	
Mucina (µg NaNa/µg proteína)	Média (DP)	225,8 (268,8)	75,0 (81,3)	0,308
	n	4	14	
	Variação	104,8 - 153,96	0,24 - 353,96	
Peroxidase	Mediana	134,9	114,3	0,865
	Média (DP)	132,1 (21,5)	137,2 (109,3)	
	n	4	13	
	Variação	0,0156 - 0,1882	0,0007 - 0,8787	0,308
	Mediana	0,0531	0,0164	
	Média (DP)	0,0775 (0,0765)	0,1260 (0,2527)	
	n	4	13	0,865
	Variação	45,21- 135,65	38,75- 348,83	
	Mediana	96,89	84,0	
	Média (DP)	93,66 (42,69)	132,06 (107,39)	

Ac. = ácido; DP = Desvio padrão; RNT = Recém-nascido a termo

7. DISCUSSÃO

Com o objetivo de pontuar características do par mãe/RNT em aleitamento materno exclusivo, no segundo dia de vida pós-natal Tabela 6.1 descritiva das mães mostra que em relação à idade as mães primigestas, têm em média entre $20 \pm (4,3)$ anos, o que as colocam ainda na fase adolescente tardia (12 a 18 anos incompletos).

Sendo também indicativo de início precoce da vida sexual feminina. Taborda JA et al, 2014, concluem que a situação socioeconômica e cultural, influencia de forma inversamente proporcional à conclusão da gravidez e a sequência de vida.

Em termos salivares acontecem alterações próprias da adolescência relacionadas às mudanças hormonais, como a mudança na quantidade de Cortisol circulante, relacionado ao desenvolvimento humano e às mudanças de humor.

Nas mães secunde gestas e multíparas as médias etária foram $28,6 \pm (5,6)$ anos, $p = 0,005$.

Com relação ao tipo de parto, 54,6% foram de parto normal, sendo também a preferência da maioria das mulheres pela precocidade da recuperação corporal, relatada pelas mesmas, quando se comparavam a companheiras de quarto, submetidas à cesarianas.

O colostro, definido como o primeiro leite produzido, teve sua presença foi comentada antes do parto por muitas mães.

A referência era: “aquela aguinha que até molhava minha roupa, antes ou muito antes do bebê nascer”. Pelos relatos das mães, sua presença ocorreu antes do parto, em média até $8,5 \pm 5,7$ semanas.

Palmeira, P e Carneiro Sampaio, M em 2016 afirmam ser o colostro um importante mediador neste período precoce pós-natal. Ele é um complemento compensatório à da imaturidade imunológica do RN.

O colostro é a primeira herança materna de anticorpos, contra patógenos com os quais ela já tenha entrado em contato.

Ao observarmos a Tabela 6.2 verificamos que todos os RNT estão dentro do protocolo de inclusão da pesquisa, quanto à idade gestacional e peso de nascimento pelo método Capurro.

Houve perda na anotação do comprimento de alguns RNT por não ter sido encontrado no prontuário disponibilizado durante a mesma.

As características da ST não estimulada dos RNT no segundo dia de vida pós-natal, para ambos os sexos podem ser observadas na Tabela 6.3. Apresentam grande variação, confirmando as afirmações de Yang et al, 2015 que relatam que a genética e a etnia, bem como a ancestralidade do sujeito da pesquisa, podem trazer estas variações, considerando ser o Brasil um país multirracial e heterogêneo.

Devemos considerar também que o RN tenha a glândula salivar histologicamente completa ao nascer, porém com imaturidade fisiológica.

A análise de coletas salivares feitas em períodos diferentes de um dia, num mesmo RN, segundo Gothefors e Marklund em 1975, resultou em diferentes valores de atividade da peroxidase quantificada; não ocorrendo o mesmo em indivíduos adultos conforme observados neste estudo realizado pelos autores.

As perdas hídricas decorrentes do nascimento (Bizzarri/ Pedicelli/ Cappa/ Cianfarani; 2016), independente do tipo de parto e da adaptação fisiológica funcional do RNT ao meio ambiente, são comuns neste período neonatal.

Devemos considerar também o período adaptativo de algumas mães quanto à amamentação, e na falta de habilidade no posicionamento do RNT, embora seja o HU-USP, um “Hospital Amigo da Criança”, onde os cuidados neste sentido são evidentes.

O fluxo salivar, ainda na Tabela 6.3, ajuda nos entendemos o que Lowry (1984) mencionou em seus estudos, ao relatar ter levado 1 ½ horas para a coleta com sonda sugadora, de 3 ml de saliva em recém-nascido.

Estabelecemos através de ensaios preliminares realizados por nós, que o período máximo de 40 minutos para coleta dos 180 µl de ST não estimulada, seria suficiente ou muito próximo para o desenvolvimento do estudo, contando com as diluições salivares a ser realizadas.

É importante relatar que não houve dificuldade no ato da coleta, provocadas pelas esponjas oftálmicas estéreis e inócuas.

O mínimo transtorno ao recém-nascido era separação labial. Sempre após a higienização da cavidade oral com água destilada.

A coleta salivar foi realizada após a higiene e espera posterior de no mínimo cinco minutos.

A quantificação dos componentes orgânicos além de pH e Fluxo foi conferida na ST não estimulada, da maioria dos RNT no segundo dia de vida.

Nesta amostra quanto ao gênero, não constatamos diferenças significativas entre os componentes, e sim semelhanças, próxima de 1 para igualdade. O p- valor para diferença significativa igual a $p < 0,05$.

Situação encontrada para volume saliva coletada, AAS, e AS-livre. Nesta amostra AS-total (Tram, TH, 1999).na tabela para ambos os sexos se apresenta com médias dobradas em relação ao AS-Ligado, sugerindo a influência do aleitamento materno (colostró) sobre o AS-Total, embora tenhamos realizado a limpeza da cavidade oral antes da coleta salivar.

A maior quantidade de Proteínas Totais deste estudo, embora não apresente diferenças significativas relacionada aos outros componentes salivares, seja provável pela semelhança biológica e temporal dos sujeitos da pesquisa.

Clinicamente, esta presença proteica resulte na alta viscosidade salivar observada durante a coleta. Justificando o elevado número de tentativas para a melhor diluição salivar, para permitir a leitura das análises laboratoriais dentro das curvas padrão do espectrofotômetro, nas diversas análises laboratoriais.

As medidas do pH foram verificadas com papel pH 0-14 da Merck, sempre pelo mesmo operador, permitindo nos dizer que a média do pH encontrada na ST dos RNT deste estudo, está bem próxima da exatidão, mesmo sendo subjetiva.

A variação do fluxo salivar em nossa amostra independente do gênero, e diferenças estatísticas, confirma as situações clínicas.

Alguns RNT apresentavam ST abundante permitindo a coleta da quantia necessária para análise laboratorial em pouquíssimo tempo; em outros RNT o fluxo era tão escasso que impediu até a medida do pH salivar.

Apesar destas variações, ao compararmos o perfil salivar desta amostra não estimulada, com a pesquisa de Dezan et al em 2002, na ST estimulada de crianças aos 18 meses, verificamos nesta ultima fluxo bem maior e menor quantidade proteica.

Confirmando apesar das mudanças salivares que ocorrem com a idade que fluxos menores apresentam quantidades proteicas maiores.

Os autores em seus estudos de 2002 compararam os resultados quantitativamente de fluxo e proteínas salivares, também aos 18, 30 e 42 meses, verificando mudanças entre estes períodos.

Seidel et al em 2001 nos relatam que: “a taxa do fluxo de saliva deve ser considerada ao avaliar a função e relevância biológica do sistema imune da mucosa oral do recém-nascido logo após o nascimento.”

Considerando as mudanças de crescimento e desenvolvimento, até mesmo das glândulas salivares em progresso nos recém-nascidos de nosso estudo, devemos considerar o paralelismo com a afirmação de Seidel que refere ser no início da vida, necessário um fluxo salivar menor, para garantir a fixação dos componentes salivares advindos da pequena produção das células das glândulas salivares, aproveitando ao máximo os componentes proteicos e imunológicos vindos da mãe.

A alfa amilase sabidamente tem baixa concentração no recém-nascido.

Os ácinos salivares, produzem e armazenam a alfa amilase nos ácinos salivares, até o momento de sua liberação, respondendo a estímulos nervosos.

A enervação Simpática e Parassimpática atua nas glândulas salivares como mediadora funcional das glândulas salivares, relacionadas aos estímulos de produção e liberação salivar (Kyle V. Holmberg and Matthew P. Hoffman,2015).

A quantidade de alfa amilase produzida responde a estímulos da atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS). Enquanto a concentração liberada da alfa amilase é dependente do fluxo salivar, que é assistido pelo Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). O SNP também atua sobre a liberação das proteínas salivares (Bosch et al, 2010)

Nossos resultados nos mostram que embora as glândulas salivares estejam em início de funcionalidade, a alfa amilase está presente, bem como os outros componentes orgânicos salivares propostos neste estudo.

Não se igualando aos relatos de O'Donnell, M. D., and Miller, N. J. 1980 quanto à ausência da alfa amilase na cavidade oral neste período de vida.

Explorando nossos objetivos um pouco mais, podemos afirmar que a presença da alfa amilase neste precoce período neonatal, bem como o envolvimento dos dois Sistemas Nervoso Simpático e Nervoso Parassimpático deva ser considerada como parte do desenvolvimento pós-natal da enervação das glândulas salivares, como refere Knox and Hoffman (2008).

Na brochura do pesquisador deste estudo constava o Índice de Apgar, por fazer parte das informações do prontuário do RNT, colocado para que se avalie a adaptação do RNT aos seus primeiros minutos de vida, embora não seja considerado isoladamente.

“Existem inúmeros fatores que podem influenciar o escore de Apgar, incluindo sedação materna ou anestesia, malformações congênitas, idade gestacional, trauma e variabilidade Inter observador. Além disso, o distúrbio bioquímico deve ser significativo antes que o escore seja afetado. Elementos da pontuação como tom, cor e irritabilidade reflexa, podem ser subjetivos e dependerem parcialmente da maturidade fisiológica da criança. A pontuação também pode ser afetada por variações na transição normal”. The Apgar Score¹

¹ The Apgar Score

Considerando as afirmações acima é importante sinalizar que embora a nota do primeiro minuto sofra todas estas influências, encontramos em nosso estudo, embora pequena a quantidade de alfa amilase salivar na ST. Nos RNT com nota 8 no índice de Apgar no primeiro minuto de vida, no dia da coleta apresentavam na comparação com os de nota 9, no mesmo período (2º dia de vida pós-natal), uma média de AAS mais alta (Tabela 6.4).

Provavelmente pela quantificação da AAS se tratar de um teste bioquímico, tenha captado esta resposta mais intensa do Sistema Nervoso Simpático, ainda presente.

Na tabela 6.7 verificamos uma evolução adaptativa de todos os de nota 8 no primeiro minuto do Índice de Apgar, evoluindo para notas mais altas, para os minutos 5 e 10 deste índice.

Poderíamos também supor que tenha sido reposta reacional, ao mínimo estímulo dado pela microesponja oftálmica, mas segundo Davis e Granger, 2009. O aumento da AAS para o exame de inoculação em bebês foi evidente aos 6 e 12 meses, mas não aos 2 ou 24 meses de idade.

Ainda pudemos constatar uma diferença significativa de Peroxidase ainda relacionado ao Índice de Apgar, variação menor e média menor nos RNT com nota dez no 5º minuto de vida do Índice de Apgar que talvez seja mais correto considerar como já relatado quanto à apresentação deste componente variando num mesmo dia.

Mulder et al em 2014, afirma ser necessário pesquisas com recém-nascidos Saudáveis, para avaliarmos as relações entre fluidos recebidos no útero, perda de peso ao nascer e hidratação, nos primeiros 2 dias de vida pós-natal.

8. CONCLUSÃO

Neste estudo da Análise de características orgânicas, pH e fluxo de saliva total não estimulada de recém-nascido a termo no segundo dia de vida pós-natal, em aleitamento materno verificamos a presença de todos os componentes propostos no estudo :

- Alfa Amilase, Peroxidase;
- AS nas suas várias formas: ligado, total e livre;
- Concentrações proteicas de mucinas e proteínas totais;
- pH e fluxo salivar, não medidos em todos os RNT, pelo pouco volume de salivar em alguns casos.

Variações Estatísticas, e desvios padrões:

- Com grande intervalo

Quanto ao Gênero:

- Maior número de amostras masculinas
- Volume salivar semelhante em ambos os gêneros;
- Médias para fluxo, proteínas totais, ácido siálico em suas três apresentações maior no feminino, bem como a média para mucina (0,169/0,085 µg de nana/µg de proteína to

Quanto aos RNT com nota 8 no Índice Apgar de 1º minuto:

- quantidade média de Alfa Amilase Salivar maior nestes, que nos nascidos com nota nove

A média de Proteínas Totais encontrada neste grupo estudado colabora para a justificar a alta viscosidade de saliva coletada.

As mucinas salivares presentes embora em quantidade pequena, e com afinidade com o ácido siálico, foram proporcionadas à proteína total que informa a liberação da mesma produzidas no interior do ácino salivar.

O colostro foi o único aporte hídrico deste grupo estudado.

Na clínica, aqueles cujas mães apresentaram colostro mais precocemente, o volume de saliva para os experimentos foi atingido em menor tempo.

A presença precoce do colostro antes do nascimento é variável bem como a variabilidade volumétrica de saliva.

Houve evolução de todos os RNT com nota 8 no primeiro minuto para uma nota mais alta no minuto 5 do Índice de Apgar.

Mesmo com a limpeza da cavidade oral com água destilada antes da coleta da ST não estimulada, mantêm-se os achado preliminares da quantidade aumentada de AS-total para os RNT alimentados com leite da mãe.

- As quantias verificadas dos componentes orgânicos salivares asseguram o funcionamento das glândulas salivares dos RNT no segundo dia de vida pós- natal, nesta amostra estudada;
- Amostra bastante homogênea.

Anexo 1 – Aprovação do CEP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/12/2013, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 493/13 intitulado: “ANÁLISE DOS COMPONENTES ORGÂNICOS DA SALIVA TOTAL NÃO ESTIMULADA EM RECÉM NASCIDOS DE TERMO E PRÉ - TERMO TARDIO” apresentado pelo Departamento de PEDIATRIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Edna Maria de Albuquerque Diniz

Pesquisador (a) Executante: Maria Dulciney da Silva

CEP-FMUSP, 19 de Dezembro de 2013.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 –Brochura do Pesquisador

Brochura do Pesquisador
Análise dos Componentes Orgânicos da Saliva Total
em Recém Nascidos Termo e Pré - termo Tardio

IDENTIFICAÇÃO

Nome/Cód.: _____ Pront.:RG _____
 Endereço: _____ nº: _____ ap
 to: _____ Bairro: _____
 Cel.:() _____ Tel.:() _____ Cep.: _____
 Nome da mãe e/ou responsável: _____

ANTECEDENTES**a) Materno e Obstétrico:**

Idade: _____ Data de admissão: / /
 Gesta: _____ Para: _____ Aborto: _____ Idade Gest.: _____
 Hora Natal: _____
 Pré Natal: () S () N nº consultas: _____ Interc.: () S () N
 Qual? _____
 Parto Tipo: Normal () Cesar.Eletiva () Cesar.Emergencial () F () Interc.: () Sim () Não Tipo: DHEG ()
 Problemas Neurológicos: () S () N Hipertensão art. Crônica: () S () N Diabetes Gestacional: () S () N
 Diabetes pré-gestacional: () S () N Patologias placentárias: () S () N
 Doença Materna Crônica: () S () N Qual? _____
 Medicação Contínua: N () S () Qual? _____ Medicamentos no pré-natal: () N () S Qual? _____
 Uso de corticóide antenatal: S () N () Tempo antes do parto: ____ dias
 Soro fisiológico: S () N () Outra medicação: N () S () Qual? _____
 Estresse gestacional: () S () N Estresse neonatal: () S () N
 Você quer amamentar? S () N ()
 Porquê? _____
 Colostro? () S () N Está amamentando? () S () N

b) Recém Nascido

RNT () RNPTT () Sexo: M () F ()
 Data de nascimento: __/__/__ Horário: _____
 Peso: _____ Estatura: _____ PIG () AIG () GIG ()
 Idade Gestacional: _____ Índice de Apgar: 1º minuto _____ 5º minuto _____ 10º minuto _____
 Alojamento Conjunto: () S () N Incubadora: () S () N
 Fototerapia: () S () N
 Amamentação materna: () S () N Leite Humano: () S () N Sonda Orográfica: () S () N
 Uso de medicação? () S () N VO () VE () IM ()
 Qual? _____ Horário: _____

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Termo de Consentimento Livre Esclarecido**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU**
RESPONSÁVEL LEGALNOME:.....DOCUMENTO DE
IDENTIDADE Nº.:..... SEXO; M () F () DATA DE NASCIMENTO:.....
/...../.....

ENDEREÇO

.....Nº.:.....APTO:.....BAIRR
O:......CIDADE.....CEP:.....TELEFONE
:.DDD (.....).....**DADOS SOBRE A PESQUISA****TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:****Composição Orgânica da saliva total de recém nascidos de Termo e Pré-Termo**
TardioPesquisador responsável: Prof.^aDra. Edna Maria de Albuquerque Diniz

Cargo/Função: Livre Docente do Departamento de Pediatria da FMUSP.

Inscrição no Conselho Regional de Medicina (CREMESP) : 19327- SP

Justificativa e objetivos da Pesquisa:

Mãe, seu filho esta sendo cuidado e acompanhado no Berçário do Hospital Universitário – USP nestes seus primeiros dias de vida, e junto com isto estarei desenvolvendo um estudo para avaliar alguns componentes da saliva no segundo dia de vida. Para isto necessito colher a saliva do seu filho 1 hora antes da mamada. A coleta é indolor e simples de realizar, não gerando desconforto, porque colheremos a saliva com um aparelho que não machuca, e se necessário fotografaremos a coleta. Várias outras crianças da mesma idade da sua poderão ser beneficiadas com os resultados do estudo, pois médicos e dentistas poderão ter um recurso auxiliar a mais para diagnósticos clínicos.

A saliva será coletada através de sugador adaptado para a boquinha de seu(ua) filho(a), com o propósito de analisar os componentes orgânicos que fazem parte deste líquido. As análises laboratoriais serão feitas no Laboratório de Bioquímica Oral da USP. Você poderá ter acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas. Acrescento que não haverá despesas pessoais incluindo exames e consultas, não havendo também compensação financeira relacionada á sua participação. Se existir qualquer despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Se houver alguma intercorrência de saúde, com o seu filho participante, decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário).

Mãe, você tem liberdade de retirar o consentimento e, portanto, deixar de participar do estudo a qualquer momento.

As informações obtidas na pesquisa são confidenciais e asseguram o sigilo sobre a participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar identificação do paciente.

Rubrica do sujeito de Pesquisa(Responsável)

Rubrica do Pesquisador

Esta Pesquisa terá a duração de 24 meses. Os pesquisadores responsáveis são Prof^a. Dr.^a Edna Maria de Albuquerque Diniz e Dr^a. Maria Dulciney da Silva

Se você tiver alguma consideração ou dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CEP-HU-USP) no endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-000 – São Paulo – SP - Telefone: 3091-9457 – Fax: 3091-9452 - E-mail: cep@hu.usp.br .

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente projeto de estudo, Composição Orgânica da saliva total de Recém Nascido de termo e pré-termo tardio, além de autorizar a realização de fotografias ou imagens com finalidade científica, desde que resguardada a privacidade do menor.

Assinatura do paciente/Representante legal

Data...../...../.....

Assinatura da testemunha

Data...../...../.....

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data...../...../.....

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amado F, Calheiros Lobo M J, Domingues P, Duarte J A & Vitorino R. Salivary peptidomics Expert Review of Proteomics Vol. 7 , Iss. 5, 2010.

Aminoff D.* Methods for the Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids Biochem. J. (1961) 81, 384.

Barros MD, et al. Papel do leite materno na defesa do lactente contra infecções. Pediat. São Paulo, 1982; 4:88-102.

Ben-Aryeh, H., Lapid S., Szargel R., Benderly A. and Gutman D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. Archs oral Bid. 1984;29(5)357-62.

Bjerkedal T., Bakketeig L, Lehmann E H . Percentiles of birth weight of single, live birth at different gestation periods. Acta Paediat Scand 1973;62:449-57.

Bernfeld, P. Amylases, alpha and beta. Methods in enzymology . Vol. I. Colowick. S.P. and Kaplan. N. O, Eds.. Academic Press. New York. 1955. p.149.

Bizzarri/Pedicelli/Cappa/Cianfaran. Water Balance and ‘Salt Wasting’ in the First Year of Life: The Role of Aldosterone-Signaling Defects. Horm Res Paediatr 2016;86:143–153 DOI: 10.1159/000449057

Bosch J.A., Veerman E.C.I., Geus, E.J., Proctor G.B. a-Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! Psychoneuroendocrinology.(2011);36, 44-453.

The Consortium on Safe Labor. Hibbard JU et al .Respiratory morbidity in late preterm births. JAMA 2010; 304(4):419-25.

Castro M, Elias PCL, Martinelli Jr. CE., Antonini SRR., Santiago L. and Moreira AC. Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(10):1171-1175.

Carlson S. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am J Clin Nutr* 1985;41:720-6.

Corfield AP, Schaur R. Sialic acids: chemistry, metabolism and function. New York: Springer Verlag, 1982 p.196-200.

Davis, E. P., and Granger, D. A. (2009). Developmental differences in infant salivary alpha-amylase and cortisol responses to stress. *Psychoneuroendocrinology* 34, 795–804. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.02.001

Dezan, C. C., Nicolau, J., Souza, D. N., and Walter, L. R. (2002). Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch. Oral Biol.* 47, 423–427. doi: 10.1016/S0003-9969(02)00032-8

Dimitriou G, Fouzas S, Georgakis V, Vervenioti A, Papadopoulos VG, Decavalas G, Mantagos S. Determinants of morbidity in late preterm infants. *Early Hum Dev* 2010;86(9): 587-91.

Denny P, Hagen F K, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, Bassilian S, Bedi G S., Boontheung P, Cociorva D., Delahunty C M, Denny T, Dunsmore J, Faull K F, Gilligan J, Gonzalez-Begne M, Halg F., Hall S C, Han X, Henson B, Hewel J, Hu S, Jeffrey S, Jiang J, Loo J A., Ogorzalek Loo R, Malamud D., Melvin J E, Miroschnyenko O, Navazesh M, Niles R, Park S K, Prakobphol A, Ramachandran P, Richert M, Robinson S, Sondej M, Souda P, Sullivan M A., Takashima J, Than S W, Wang

J,WhiteleggeJP,WitkowskaHE,WolinskyL,XieY,XuT,YuW,YtterbergJ,Wong DT.,Yate III J R., and. Fisher S.The Proteomes of human parotid andsubmandibular/sublingualglandsalivas collected as the ductal secretions. J.Proteome Res. 2008;7(5): 1994-2006.

Drobitch RK, Svensson CK. Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. Clin Pharmacokinet 1992;23(5):365–79.

Engle WA, Kominiarek MA. Late preterm infants, early term infants, and timing of elective deliveries. Clin Perinatol 2008; 35: 325 - 341.

Forde MD, Koka S, Ecker S, Carr AB, Wong DT. Systemic assessments utilizing saliva, part I: General considerations and current assessments. Int J Prosthodontics 2006;19(1):43–52.

Fischer, E. H. Stein, E. A., Alpha Amylases. The Enzymes . 2nd ed.. Boyer. P. O.. Ed.. Academic Press, New York. 1960. 313. v 4.

Frenkel ES, Ribbeck K. 2015.Salivary mucins in host defense and disease prevention. Journal of Oral Microbiology.;7:10.3402/jom.v7.29759. doi:10.3402/jom.v7.2975

Granger D.A., Davis EPDevelopmental differences in infant salivary alpha-amylase and cortisol responses to stress. Psychoneuroendocrinology. 2009 July;34(6):795–804

Grassi MS, et al. Fatores imunológicos do leite humano. Pediatria (São Paulo) 2001;23(3):258-63.ab

Gothefors L., Marklund S. Lactoperoxidase. Activity in Human Milk and in Saliva of Newborn Infants. INFECTION AND IMMUNITY, June 1975, p. 1210-1215 Vol. 11, No. 6

Hassaneen M and Maron JL (2017) Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations. *Front. Public Health* 5:83.

Holmberg K V and Hoffman P M .Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. *Monogr Oral Sci.* 2014;24:1–13.

Hu S, Wang J, Meijer J, Leong S, Xie YM, Yu T, Zhou H, Henry S, Vissink A, Pijpe J, Kallenberg C Elashoff D, Loo JA, Wong DT. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3588–600.

Hsiu, J., Fischer, E. H., and Stein, E.A., Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. II. Calcium and the catalytic activity. *Biochemistry* 1964;3:61-6.

Iwata O, Okamura H, Saitsu H, Saikusa M, Kanda H, Eshima N, Iwata S, Maeno Y, and Matsuishi T.Diurnal Cortisol Changes in Newborn Infants Suggesting Entrainment of Peripheral Circadian Clock in Utero and Birth *J Clin Endocrinol Metab* 2013.98(1): E25–32.

Jones A, Beda A, Ward AM, Osmond C, Phillips DI, Moore VM, Simpson DM. Size at birth and autonomic function during psychological stress. *Hypertension* 2007;49(3): 548–555.

Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. 1993 Sep 20;694:36-47.

Jurfest Ceccon M E, Albuquerque Diniz E M, Costa Vaz F A, Araújo Ramos J L. Imunidade do feto e do recém-nascido.*Pediatria (São Paulo)*, 19(1) : 9-23, 1997.

Kadashetti V, Baad R, Malik N, Shivakumar KM, Vibhute N, Belgaumi U, et al. Glucose level estimation in diabetes mellitus by saliva: a bloodless revolution. *Rom J Intern Med* (2015) 53:248–52. doi:10.1515/rjim- 2015-0032 79.

Kinney HC. The near term (late - preterm) human brain and risk for periventricular leukomalacia: A review. *Clin Perinatol* 2006;30(2):81.

Koka S. et al. The preferences of adult outpatients in medical or dental care settings for giving saliva, urine or blood for clinical testing. *JADA* 2008;139(6):735-740.

Kollmann M, Aldrian L, Scheuchenegger A, Mautner E, Herzog SA, Urlesberger B, et al. (2017) Early skin-to-skin contact after cesarean section: A randomized clinical pilot study. *PLoS ONE*12(2): e0168783

Knox SM et al. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis S.M. *Science*. Author manuscript; available in PMC 2012 June 18.

Mally PV, Bailey S, Hendricks Muñoz KD. Clinical issues in the management of late preterm infants. *CCurr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2010; 40(9): 218-33.

MargottoPR. Intrauterine growth curves: study of 4413 single live births of normal pregnancies. *J de Pediatr* 1995;71 (1) 11- 21.

Marshall, J. J. and Miwa, I. Kinetic difference between hydrolyses of gamma-cyclodextrin by human salivary and pancreatic alpha amylase. *Biophys Acta*. 1981;661(1), 142-7.

Morgan BL, Winick M. The subcellular localization of administered N-acetylneuraminic acid in the brains of well-fed and protein restricted rats. 1981;46(2):231-8.

Nicolau, J. Fundamentos de Odontologia. Fundamentos de Bioquímica Oral. 2008

Nieuw Amerongen A. V., Strooker H.; Henskens Y. M. C., Ligtenberg A. J. M., AND Veerman E. C. Biochemical Changes in (glyco)proteins of Saliva of Epileptic Patients. Ann N Y Acad. of Sci. 1993;694:283-5.

Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk Review Article Rev Assoc Med Bras 2016; 62(6):584-593.

Pannunzio, E. et al. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. Rev Assoc Med Bras 2010;56(1):32-6.

Pinheiro C.E. Curso Bioquímica da cárie dental I Bioquímica da Saliva. Revista Paulista de Odontologia. 1982;40-7.

Radtke JV. The paradox of breastfeeding-associated morbidity among late preterm infants. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. 2011; 87 (4):9-24.

Seidel BM1, Schubert S, Schulze B, Borte M Secretory IgA, free secretory component and IgD in saliva of newborn infants. Early Hum Dev. 2001 May;62(2):159-64.

Silva Marques DN da, et al .Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow in patients with Sjogren's syndrome: a randomized controlled trial. J. Oral Pathol Med. 2011;40(10):75-92.

Slavkin HC. Toward molecular based diagnostics for the oral cavity. Journal of the American Dental Association 1998;129(8):1138-43.

Skoza L. and Mohos S. Stable Thiobarbituric Acid Chromophore with Dimethyl Sulphoxide Application to Sialic Acid Assay in Analytical De-O-Acetylation. Biochem. J. (1976) 159,457-462

Schweigel H, Wicht M, Schwendicke F, 2016. Salivary and pellicle proteome: A data mining analysis. Scientific Reports.;6:38882. doi:10.1038/srep38882.

Stiefel DJ, Keller PJ. Preparation and some properties of human pancreatic amylase Including a comparison with human parotid amylase. Biochim Biophys Acta. 23 1973; 302(2):345-61.

Taborda J A, da Silva FC, Ulbricht L, Neves EB Consequências da gravidez na adolescência para as meninas considerando-se as diferenças socioeconômicas entre elas. Cad. Saúde Colet., 2014, Rio de Janeiro, 22 (1): 16-24.

Tanner JM. Standards for birth weight or intra uterine growth. Pediatrics. 1970;46(1):1-6.

Tomashek KM et al. Early discharge among late preterm and term newborns and risk of neonatal morbidity. Semin Perinatol. 2006;30(2):61-8.

Valim, Valéria et al . Recomendações para o tratamento da síndrome de Sjögren. Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 55, n. 5, p. 446-457, Oct. 2015.

Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near-term infant Pediatrics. 2004; 114(2):372-6.

Ward AM et al. Size at birth and cardiovascular responses to psychological stressors: evidence for prenatal programming in women. *J Hypertens.* 2004;22(12);2295-301.

Wang B et al. A longitudinal study of salivary sialic acid in preterm infants: Comparison of human milk fed versus formula-fed infants. *J Pediatr.* 2001; 138(6):914-6.

Zanardo V et al. Psychological distress and early lactation performance in mothers of late preterm infants. *Early Hum. Dev.* 2011;87(4):321-3.

Zakowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit. Rev.Clin. Lab Sci.* 1985;21(4): 283-322.