

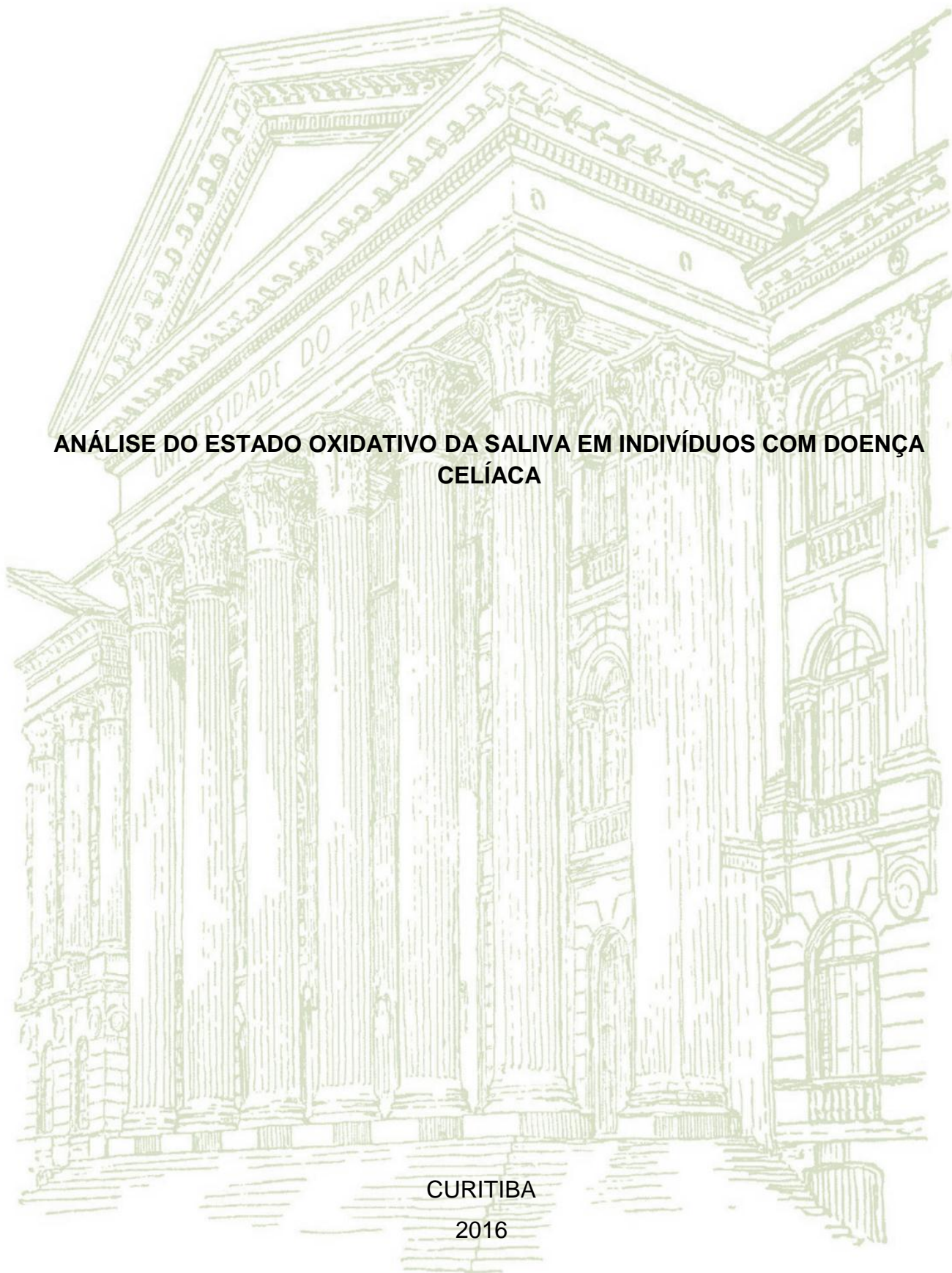
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEISY REBOUÇAS LIMA BRASIL

**ANÁLISE DO ESTADO OXIDATIVO DA SALIVA EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA
CELÍACA**

CURITIBA

2016



GEISY REBOUÇAS LIMA BRASIL

**ANÁLISE DO ESTADO OXIDATIVO DA SALIVA EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA
CELÍACA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes.

CURITIBA
2016

Brasil, Geisy Rebouças Lima

Análise do estado oxidativo da saliva em indivíduos com doença celíaca / Geisy Rebouças Lima Brasil - Curitiba, 2016.

48 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. José Miguel Amenábar Céspedes

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Doença celíaca. 2. Oxidantes. 3. Antioxidantes. 4. Estresse oxidativo. 5. Saliva. I. Amenábar Céspedes, José Miguel. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

GEISY REBOUÇAS LIMA BRASIL

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DO ESTADO OXIDATIVO DA SALIVA EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA
CELIACA

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Profa. Dra. Juliana Lucena Schussel
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Profa. Dra. Carolina Carvalho Oliveira Santos
Departamento de Odontologia Restauradora, UFPR

A Deus que me ilumina e protege em todos os momentos.

Ao meu filho, Maurilinho, e marido, Coracy Neto, que com o amor de vocês sinto-me mais forte e inspirada para conquistar meus sonhos.

A toda minha família que mesmo longe continua a me apoiar na subida de cada degrau.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar em meu caminho oportunidades incríveis e pessoas boas.

À minha família, pela torcida e apoio nos momentos em que mais precisei. Especialmente, ao meu marido, Coracy Brasil Neto, por todo amor e compreensão, e ao meu filho, Maurílio Rebouças L. Brasil, por ser um bebê afável permitiu realizar todas as etapas.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Miguel Amenábar, pela oportunidade e confiança, por todos os valiosos ensinamentos e pelo maravilhoso exemplo de como ser um bom mestre.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPR, principalmente ao Professor Dr. Cassius Torres-Pereira e secretária Ana, pela disponibilidade e atenção.

A todos os professores do Programa, pela rica contribuição nessa jornada de formação a docência.

À equipe de Estomatologia e laboratório de Bioquímica bucal, pela acolhida e pelo aprendizado diário. Em especial, a Professora Dra. Juliana Schussel, Cristina Berrocal, Brunna Boska e Izabela Taiatella, pela dedicação e companheirismo.

Aos colegas de turma, por me receberem bem e pela generosidade. Em especial, Isabela Ricon, Caroline Polli e Letícia Possagno, pela amizade e por tornarem essa caminhada leve e divertida.

À Professora Dra. Juliana Feltrin e ao Professor Dr. João Paulo Steffens, pela excelente contribuição na etapa final desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e à Universidade Federal do Paraná, por me fazer sentir em casa.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

(Dalai Lama)

RESUMO

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia sensível ao glúten, com manifestações sistêmicas e bucais que leva ao desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Diversos estudos avaliaram o estresse oxidativo em indivíduos com DC em tecidos e plasma, no entanto, não há relatos desta avaliação na saliva. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar o estado oxidativo da saliva em indivíduos com DC. Foi avaliada a saliva de 30 indivíduos de faixa etária entre 05 e 33 anos com DC confirmada através de biópsia endoscópica do intestino delgado. Foi comparada com indivíduos sem DC com idade e sexo pareados. As amostras foram analisadas por meio de métodos colorimétricos para a determinação do Estado Oxidante Total (EOT), Capacidade Antioxidante Total (CAT) e Índice do Estresse Oxidativo (IEO). Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de Mann Whitney, considerando significância quando $p < 0,05$. A CAT ($0,002 \pm 0,001$ mM) e o IEO ($0,154 \pm 0,304$) no grupo de celíacos apresentaram diferenças significativas quando comparados aos controles ($0,007 \pm 0,001$ mM e $0,012 \pm 0,013$, respectivamente). Já o valor do EOT foi semelhante em ambos os grupos, sendo os valores do grupo com DC de $2,524 \pm 0,268$ μ M e do controle $2,492 \pm 0,284$ μ M. Dentro dos limites do presente estudo pode ser concluído que os indivíduos com DC apresentam o estado oxidativo salivar aumentado decorrente de uma menor capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Doença celíaca. Oxidantes. Antioxidantes. Estresse Oxidativo. Saliva.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is a sensitive enteropathy to gluten, with systemic and oral manifestations that lead to an imbalance between oxidants and antioxidants. Several studies have assessed oxidative stress in individuals with DC in tissues and plasma but not yet in saliva. Thus, the aim of this study was to analyze the salivary oxidative status in individuals with CD. Saliva was evaluated in 30 subjects between 05 and 33 years with CD confirmed by endoscopic biopsy from the small intestine. They were compared with individuals without DC with age and sex matched. The specimens were analyzed by means of colorimetric methods to determine the Total Oxidant State (TOS), Total Antioxidant Capacity (TAC) and Oxidative Stress Index (OSI). Data obtained were tabulated and submitted the Mann Whitney test, a level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The TAC (0.002 ± 0.001 mM) and OSI (0154 ± 0304) in the celiac group showed significant differences compared to control group (0.007 ± 0.001 mM and 0.012 ± 0.013 , respectively). The value of the TOS was virtually the same in both groups, group values with CD were 2524 ± 0268 μ M and control group 2.492 ± 0.284 μ M. Within the limits of the present study can be concluded that individuals with celiac disease have salivary oxidative state altered due to a decreased antioxidant capacity.

Key-words: Celiac disease. Oxidants. Antioxidants. Oxidative Stress. Saliva.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	-	REPRESENTAÇÃO DE RADICAL LIVRE	15
FIGURA 2	-	IMAGEM ILUSTRATIVA DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES TOTAIS	39
FIGURA 3	-	IMAGEM ILUSTRATIVA DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIDANTES TOTAIS	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	CLASSIFICAÇÃO DE MARSH DE LESÕES DUODENONAIIS	.13
TABELA 2	-	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO COM DOENÇA CELÍACA 25
TABELA 3	-	NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM COMORBIDADES DO GRUPO COM DOENÇA CELÍACA 26
TABELA 4	-	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO ESTADO OXIDANTE TOTAL (EOT), DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) E DO ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO (IEO) NA SALIVA ESTIMULADA DOS GRUPOS DE ESTUDO 26

LISTA DE SIGLAS

CAT	-	Capacidade antioxidante total
DC	-	Doença celíaca
EOT	-	Estado oxidante total
ERN	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	-	Espécie reativa de oxigênio
GSH	-	Glutationa reduzida
GSH-Px	-	Glutationa peroxidase
GSSG	-	Glutationa oxidada
GST	-	Glutationa transferase
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
IEO	-	Índice de estresse oxidativo
LPO	-	Peroxidação lipídica
PBS	-	Tampão fosfato salino
REDOX	-	Oxidação-redução
RL	-	Radicais livres
SOD	-	Superóxido dismutase
TTG	-	Transglutaminase tecidual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA CELÍACA	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.2.1	Espécies Reativas	15
1.2.2	Antioxidantes	16
1.3	SALIVA E DOENÇA CELÍACA	18
2	OBJETIVO	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	ARTIGO	22
4	CONCLUSÃO	31
	REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS	32
	APÊNDICE 1 - MATERIAIS E MÉTODOS	37
	APÊNDICE 2 - FICHA DE AVALIAÇÃO	42
	ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica gastrointestinal, associada a fatores genéticos e ambientais, na qual há um componente auto-imune de sensibilidade ao glúten, ocorrendo uma reação inflamatória mediada por células T. Esta reação resulta na atrofia das vilosidades do intestino delgado, prejudicando a absorção de nutrientes (RASHID et al., 2011). O glúten é um componente proteico do trigo, presente nas sementes de muitos cereais (DEWAR; PEREIRA; CICLITIRA, 2004), dispensável a dieta e podendo ser substituído por outras proteínas. Essa enteropatia é uma das mais comuns, afetando um a cada cem indivíduos, sendo mais prevalente em caucasianos. Entretanto, estima-se que 90% dos casos ainda não foram diagnosticados. (COSTACURTA et al., 2011).

Os sinais e sintomas são diversos e podem estar associados ou isolados. São eles: dor abdominal, vômitos, diarreia e perda de peso, anemia, fraqueza extrema, baixa estatura, osteoporose, irregularidades menstruais, infertilidade, retardo do crescimento e da puberdade (RASHID et al., 2011). Em geral, estes sinais e sintomas se manifestam antes dos dois anos de idade, compatível com a introdução da dieta rica em glúten. A DC pode ser classificada em: clássica, com predomínio dos sintomas gastrointestinais; atípica, um ou dois sintomas não gastrointestinais, como baixa estatura e anemia; latente, inicialmente apresentam biópsia intestinal normal e desenvolvem posteriormente atrofia das vilosidades, sendo que com a isenção do glúten retornam ao estado de normalidade; assintomático, com apenas resultados sorológicos e histológicos alterados (POLANCO, 1995).

O diagnóstico é realizado com a associação de achados clínicos e testes sorológicos, como a transglutaminase tecidual (TTG) e teste antiendomísio. Os pacientes com qualquer um desses testes com resultado positivo devem ser encaminhados para uma biópsia endoscópica do intestino delgado para confirmação do diagnóstico. Durante a investigação e realização dos exames não se deve excluir o glúten da dieta, pois pode gerar resultado falso-negativo, dificultando o diagnóstico definitivo (COSTACURTA et al., 2011).

Estágios de evolução e gravidade foram determinados por Marsh (1992) para caracterizar a variação do tempo de instalação da sensibilidade ao glúten, de acordo com as características histológicas (TABELA 1).

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DE MARSH DE LESÕES DUODENAIS

Estágio 0	Mucosa pré-infiltrativa
Estágio I	Aumento no número de linfócitos intra-epiteliais (LIEs)
Estágio II	Aumento de LIEs. Hiperplasia de criptas
Estágio III	Atrofia parcial das vilosidades
Estágio IV	Atrofia total das vilosidades

Após confirmação, será permitido o início do tratamento que consiste na dieta livre de glúten (DEWAR; PEREIRA; CICLITIRA, 2004). A recuperação total da mucosa intestinal ocorre entre o período de um a dois anos após a dieta sem glúten. Entretanto, a educação alimentar de pacientes celíacos se torna dificultada por fatores financeiros, rótulos de alimentos não identificados, difícil acesso a alimentos sem glúten, difícil entendimento por parte das crianças a não comerem o mesmo que seus semelhantes e tempo no preparo de alimentos alternativos (KOTZE, 2006).

Quando não há adesão ao tratamento, a DC pode evoluir se associando a diversas outras doenças, como: osteoporose, distúrbios neurológicos, esterilidade, dermatite herpertiforme e diabetes mellitus (LEPERS et al., 2004). Estudos têm mostrado que a incidência global de malignidade é aumentada nos indivíduos com DC. O risco de mortalidade é ainda maior quando há associação entre adenocarcinoma intestinal, e, em seguida, com o linfoma de não-Hodgkin. (KELLY et al., 2015). Apesar de adenocarcinomas do intestino delgado serem mais incomuns em indivíduos com DC, o risco é aumentado dez vezes nesse grupo (GRAINGE; WEST; SOLAYMANI-DODAR, 2012).

Manifestações orais da DC podem ser vistas em dentes permanentes. Deficiências nutricionais no momento da formação do dente tem sido relacionadas a defeitos como: hipoplasias com cúspides intactas, defeitos de esmalte e dentina,

corrosão, perda de esmalte e atraso na erupção. A prevalência desses defeitos em dentes atingem em torno de 50% dos casos (BONAMICO et al., 2011).

Outra manifestação da DC oral são as úlceras aftosas recorrentes. Apesar da causa exata ainda ser desconhecida, tem sido sugerido que podem surgir como consequência da má absorção de nutrientes, como ferro, ácido fólico e vitamina B12 (COSTACURTA et al., 2011).

No que diz respeito a alterações salivares, a composição da saliva de indivíduos com DC parece alterada quando comparada a indivíduos sem a DC, podendo apresentar uma menor presença de amilase, IgA secretora e IgM, capacidade de tamponamento, velocidade do fluxo salivar e concentração de cálcio (ACAR et al., 2012).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Quando há desestabilização entre agentes oxidantes e antioxidantes nos tecidos esse processo é denominado como estresse oxidativo. Há uma interferência no controle de oxidação-redução (REDOX) e na sinalização celular, levando ao dano molecular (FINK, 2007). As concentrações dos agentes envolvidos e a velocidade das reações vão determinar a intensidade e patogenicidade desse desequilíbrio (GOW; ISCHIROPOULOS, 2001). A alteração desse equilíbrio pode ser por trauma, estresse, exercício, nutrição, doenças degenerativas, distúrbios imunológicos e desequilíbrio hormonal, acelerando a formação de radicais livres (COFTA et al., 2008). Os radicais livres tem efeito citotóxico e podem estar relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MONTEZANO; TOUYZ, 2014), doenças neurodegenerativas (GANDHI; ABRAMOV, 2012), câncer (GUPTA; PATEL; SHAH, 2014) e processo de envelhecimento (MERKSAMER et al., 2013).

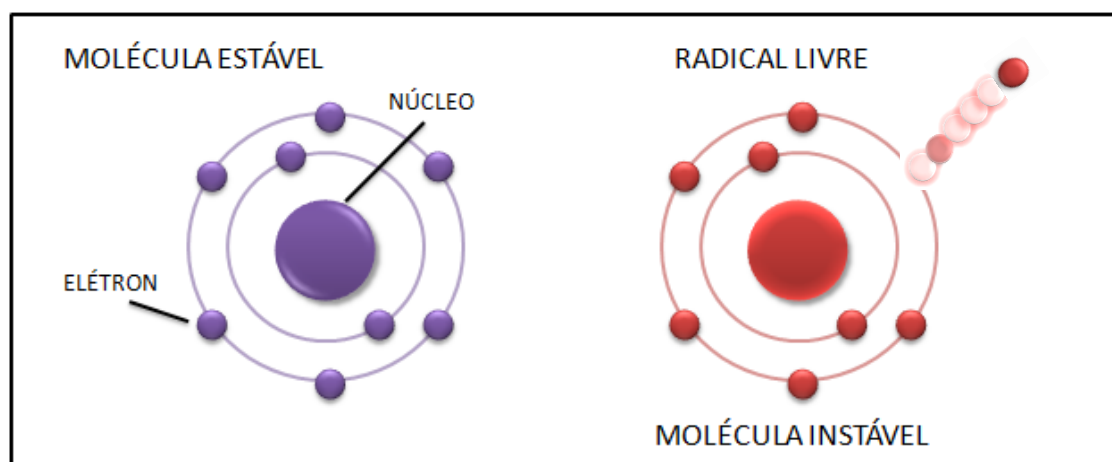
Para combater esse efeito, o organismo possui mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos (EREL et al., 2004; JONES, 1990). Portanto, o monitoramento do estresse oxidativo pode ser realizado por meio do resultado do dano produzido em células e tecidos, ou investigando o potencial de organismos, tecidos ou fluidos de resistir à oxidação, ou seja, estudando o comportamento dos antioxidantes (ABUJA; ALBERTNI, 2001).

Um estudo demonstrou a relação entre estresse oxidativo e DC, através da ação do glúten contra o equilíbrio pró e antioxidante na mucosa intestinal, provavelmente por uma superprodução de radicais livres, deixando a capacidade antioxidante de pacientes com DC reduzida (ODETTI; VALENTINI; ARAGNO, 1998). O estudo de Stojiljković e colaboradores (2009) comparou o nível desses elementos pela biópsia do intestino delgado desses pacientes pediátricos com DC e concluiu que além dos radicais livres estarem aumentados nos casos com a doença ativa, sugerem que o glúten ativa xantina oxidase em enterócitos, o que resulta em excesso de produção de espécies reativas de oxigênio e progressão dos danos. Stojiljković e colaboradores (2007) demonstraram também que há aumento do estresse oxidativo nos indivíduos com DC não tratada, utilizando sangue para a verificação do índice.

1.2.1 Espécies Reativas

A espécie reativa que apresenta em sua última camada um número não pareado de elétrons é denominada de radical livre (RL), formado a partir de reações de REDOX (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) (FIGURA 1). As fontes mais comuns de RL em sistemas biológicos são o oxigênio e o nitrogênio (óxido nítrico), sendo chamados, respectivamente, de espécie reativa de oxigênio (ERO) e espécie reativa de nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O que diferencia ERO/N e os RL é a reatividade entre eles, a meia vida de cada molécula e as concentrações em que estes se apresentam, nos diferentes compartimentos celulares e teciduais (WINTERBOURN, 2008).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DE RADICAL LIVRE



FONTE: AUTOR (2016)

As espécies reativas podem ser geradas por processos REDOX, catalisados por íons de metais de transição livre e íons metálicos ligados a enzimas, por radiação ionizante ou por meio de reações químicas e enzimáticas. Portanto, as fontes celulares são importantes para o estresse oxidativo, por exemplo, a formação de espécies reativas de oxigênio por redução incompleta do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial. Óxido nítrico sintases são um grupo de enzimas que transforma a L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina. O óxido nítrico, na presença de oxigênio ou de superóxido, é convertido em espécies mais reativas, como o dióxido de nitrogênio e peroxinitrito (STOREY, 2004).

O Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma espécie reativa considerada altamente tóxica, pois é capaz de atravessar camadas lipídicas pelas aquaporinas, reagindo com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe³⁺, e também considerada deletéria, pois participa da reação que produz o radical hidroxila (FERREIRA; MATSUBARA., 1997). Já os RL mais estudados são o superóxido, formado após a primeira redução do O₂ (HALLIWELL, 1990); e o radical hidroxila, mais importante da peroxidação lipídica por ser radical livre mais reativo dos sistemas biológicos.

Portanto, o equilíbrio entre a produção de RL e defesa dos antioxidantes garantem o bom funcionamento de sistemas aeróbicos (SIES, 1991), como ativadores de moléculas envolvidas na função celular, por exemplo, a transmissão de sinal de várias expressões gênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Quando a produção das espécies reativas encontra-se descontrolada, pode ser prejudicial aos tecidos (BLAKE, 1990; PARKINSON, 1995), danificando as moléculas extra e intracelulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

1.2.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes de mecanismo de defesa para prevenir a danificação do processo de oxidação (HALLIWELL, 1995), podendo inibir danos deletérios causados por RL. Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos e os sistemas de defesa são divididos em quatro subclasses. Os antioxidantes enzimáticos são superóxido dismutase (SOD), catalase, peroxidase

salivar, glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH), glutathione S transferase. E os não enzimáticos, vitaminas C, vitamina A, vitamina E e ácido úrico.

SOD foi descoberto em 1969, isolado de eritrócitos com capacidade de catalisar a reação de dismutação de RL (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A forma SOD-cobre-zinco, presente principalmente no citosol, não é afetada pelo aumento de ERO/N; e a SOD-manganês, primariamente na mitocôndria, aumenta sua atividade com o aumento do estresse oxidativo (BABIOR, 1997). Em geral, é capaz de atuar como mediador inibitório da inflamação mediada por neutrófilos (NAGLER et al., 2002). A catalase, heme proteína citoplasmática, é capaz de catalisar a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Podem dar continuidade do efeito de SOD, eliminando o superóxido liberado, produzindo H_2O_2 , prevenindo a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 (SCOTT, 1991).

A peroxidase salivar, considerada a enzima antioxidante mais importante presente na saliva pode catalisar a reação de peroxidação (reduzir H_2O_2 a H_2O), além de possuir uma ação antibacteriana. Entretanto, representa apenas 0.01% de todas as proteínas presentes na saliva (NAGLER et al., 2002). A GSH-Px é uma enzima antioxidante por apresentar selênio, um cofator antioxidante. Atua catalisando a redução do H_2O_2 e dos peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH em GSSG (Glutathione oxidada) (SHAN; AW; JONES, 1990). Após exposição da GSH a um agente oxidante, ocorre sua oxidação à GSSG. (HALLIWELL, 1995).

Para mensuração dos níveis de estresse oxidativo, pode-se utilizar o ciclo de oxidação e redução da GSSG/GSH, pois a quantidade de GSSG aumentada representa maior nível de agentes oxidantes que esse tecido ou célula possui. A GSH tem ação protetora na cavidade bucal por agir contra o estresse oxidativo (NAGLER et al., 2002). Ela auxilia no ciclo antioxidante, na remoção de xenobióticos, pode intervir no metabolismo do ácido ascórbico e quelar o cobre (SHAN; AW; JONES, 1990).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos há os que são produzidos pelo organismo e os que são adquiridos pela dieta alimentar. Para o sistema de defesa primário alguns antioxidantes podem interagir diretamente com as espécies reativas de oxigênio (STOREY, 2004), conhecidos como sistemas de prevenção, que atuam impedindo a formação dos RL ou espécies não RL. Há outros antioxidantes que

pertencem aos sistemas varredores que atuam impedindo a ação desses oxidantes (CLARKSON; THOMPSON, 2000). Proteínas ou enzimas quelantes, como a ferritina-complexação de metal, transferrina, ceruloplasmina, metalotioneína, impedem ou minimizam a participação do ferro e de cobre (e outros metais pesados) na geração de RL (STOREY, 2004).

As vitaminas C, A e E são antioxidantes não enzimáticos. A vitamina C pode atuar diretamente nas membranas celulares, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou regenerando a vitamina E. Pode também atuar como antioxidante na fase lipofílica da membrana (FREI; ENGLAND; AMES, 1989), e como pró-oxidante em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação (CHAKRABORTHY et al., 2014). A vitamina E combate geralmente a peroxidação lipídica por facilmente se adaptar a esse ambiente (FREI, 1994); atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas e lipoproteínas além de interceptar o radical hidroxila. A vitamina A pode inibir a peroxidação lipídica da membrana. (FREI; ENGLAND; AMES, 1989).

Outro sistema é o de reparação enzimática, que repara as biomoléculas danificadas por ERO/N, capaz de impedir a formação dos RL, impedir a ação desses ou favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (HALLIWELL, 1995). Portanto, quando identificamos antioxidantes nos fluidos do corpo podemos ter ideia da eficácia do sistema de defesa local ou sistêmica do indivíduo (DEVASAGAYAM et al., 2004).

1.3 SALIVA E DOENÇA CELIACA

A saliva é um fluido que funciona como solvente das substâncias do meio bucal e mantém úmidas a mucosa e as superfícies dos dentes. Ela é produzida e secretada por três pares de glândulas maiores: parótida, sublingual e submandibular, além de centenas de outras glândulas salivares menores que também contribuem para a sua produção. Este fluido é composto por aproximadamente 98% de água e o restante por compostos orgânicos e inorgânicos (SPIELMANN; WONG, 2011), sendo eles: eletrólitos, imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas, ureia, amônia (EDGAR, 1992). Para o fluxo salivar ser

considerado normal, ele deve estar acima de 0,1 mL/min, e quando está abaixo disso é hipofunção (SCREEBNEY; VALDINI, 1987).

A saliva é considerada "janela sobre o estado de saúde" (SEGAL; WONG, 2008), pois ela reflete praticamente todo o espectro de estado normal e de doença de um indivíduo, incluindo as substâncias naturais do tecido bucal e uma grande variedade de moléculas introduzidas ao organismo como, por exemplo, alimentos e fármacos. A saliva pode ser coletada de forma não invasiva e com equipamentos de baixo custo (HASAN; GHADHBAN; ABUDAL KADHUM, 2012), podendo fornecer análise de grandes populações (KAUFMAN; LAMSTER, 2002). Diversos estudos demonstram a saliva como meio para o diagnóstico de várias doenças, e a sua utilização aumentou consideravelmente nos últimos anos (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

A DC é capaz de modificar a composição da saliva, assim como outras doenças sistêmicas. E para verificar a incidência dessa doença em uma população pediátrica, um grupo de pesquisadores examinou esses indivíduos com o objetivo de encontrar a presença de auto-anticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG) na saliva, comparar e quantificar a concentração dos auto-anticorpos anti-tTG, antes e após seis meses do início da dieta sem glúten. Verificaram que estes auto-anticorpos estão presentes com e sem dieta do glúten, podendo considerar como um marcador de diagnóstico adicional (COSTACURTA et al., 2011). Há também estudos que evidenciam micro-organismos orais que podem degradar o glúten, podendo servir de proteção para pacientes em risco de DC (HELMERHORST et al., 2010).

Estudos têm analisado os componentes da saliva de portadores da DC, como ela se comporta e o que ela poderia nos trazer de informações relevantes. Um estudo que visou investigar a microbiota salivar e metaboloma de crianças com DC, sob dieta livre de glúten, com método de cultura, identificou que há diversos micro-organismos e alguns compostos orgânicos voláteis, sugerindo que existe associação entre a disbiose oral que poderia afetar o metaboloma oral (FRANCAVILLA et al., 2014).

Outro estudo importante foi uma pesquisa com 75 pacientes celíacos de diferentes idades que visou avaliar a concentração de ceruloplasmina salivar e atividade de ferroxidase salivar. Foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente coradas para ferroxidase, bem como para a atividade de oxidase. Foram encontradas concentrações aumentadas de ceruloplasmina em todos os

grupos de pacientes com DC em comparação com a do grupo de controle. Já a atividade ferroxidase salivar revelou diminuição estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes, assim como para grupo controle (HASAN; GHADHBAN; ABUDAL KADHUM, 2012).

Atualmente, os estudos utilizando a saliva em indivíduos portadores da DC são escassos, considerando que a saliva pode ser um meio seguro para a determinação do estresse oxidativo. Entretanto, a maioria dos estudos utilizam amostras de tecidos e plasma para a verificação do estado oxidativo nos indivíduos com DC.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar o estado oxidativo da saliva de indivíduos com doença celíaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar o estado oxidante total salivar;
- Mensurar a capacidade antioxidante total salivar;
- Determinar o índice de estado oxidativo salivar.

3 ARTIGO

Introdução

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica gastrointestinal sensível ao glúten, associada a fatores genéticos e ambientais (1). A ingestão ou contato com esta proteína resulta na atrofia das vilosidades do intestino delgado impedindo a absorção de nutrientes (2). O diagnóstico é realizado com a associação de achados clínicos e testes sorológicos e confirmado com biópsia endoscópica do intestino (3).

Após confirmação, será permitido o início do tratamento que consiste na dieta livre de glúten (1). Quando não há adesão ao tratamento, essa doença auto-imune pode evoluir se associando a diversas outras doenças, como: osteoporose, distúrbios neurológicos, esterilidade, dermatite herpétiforme e diabetes mellitus (4). Além destas, a incidência global de malignidade é aumentada nos indivíduos portadores da DC (5).

Estudos demonstraram que o glúten age contra o equilíbrio oxidante e antioxidante. Esse desequilíbrio é denominado estresse oxidativo, pois há uma interferência no controle da oxidação-redução (REDOX) e na sinalização celular, levando a um dano molecular (6). A alteração desse equilíbrio pode ser por trauma, estresse, exercício, nutrição, doenças degenerativas, distúrbios imunológicos e desequilíbrio hormonal, acelerando a formação de radicais livres (7). Os radicais livres tem efeito citotóxico e para combater esse efeito, o organismo possui mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos (8, 9).

Para o monitoramento do estresse oxidativo, a maioria dos estudos utilizam amostras de tecidos ou avaliação dos compostos em plasma, não havendo estudos utilizando saliva para a verificação de índices de oxidantes e antioxidantes em indivíduos com DC. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar o estado oxidativo salivar de indivíduos com DC.

Materiais e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná sob o número: 1.041.046.

População do Estudo

Os pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Paraná com diagnóstico de DC, de zero a 35 anos de idade foram convidados a participar da pesquisa. A amostra foi por conveniência e 30 indivíduos não tabagistas, com boa condição de saúde oral e que não utilizavam medicamentos polivitamínicos foram recrutados para a coleta de saliva. Todos os indivíduos foram pareados por sexo e idade com um grupo controle, totalizando 60 participantes no estudo.

Coleta da Saliva

Amostras de saliva foram coletadas em ambos os grupos. A coleta salivar foi realizada no período compreendido entre as 8h00 e 11h30 da manhã. A saliva foi estimulada com auxílio do filme de parafina (Parafilm) e armazenada em um recipiente esterilizado (Coletor Universal Estéril J.PROLAB, 80 mL), codificado e transportado refrigerado até o laboratório para posterior análise. Todos os indivíduos passaram por uma breve anamnese e avaliação intra-oral.

Após a coleta, a saliva foi centrifugada a 10.000 RPM (Minispin, Eppendorf – Life Sciences Biotechnology) durante 4 minutos, sendo posteriormente armazenada em microtubos de 500µL (Eppendorf – Life Sciences Biotechnology) devidamente identificados e mantidos a - 20°C por no máximo 15 dias.

Análise Bioquímica

- Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT):

A CAT foi determinada pelo método de Erel (8), no qual as reações de radicais livres são iniciadas com a produção do radical hidroxila por meio de reação de Fenton e a velocidade desta é monitorada seguindo a absorvância de radicais dianisidil coloridos. A curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L.

- Determinação do Estado Oxidante Total (EOT):

O EOT foi determinado pelo método de Erel (10). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico na presença de várias espécies oxidantes em meio ácido e a medição do íon férrico pelo laranja de xilenol. A curva padrão foi realizada com H₂O₂. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em µmol H₂O₂ equivalente /L.

- Determinação do índice de estresse oxidativo (IEO):

O IEO foi considerado como a relação entre o EOT e a CAT. Para realizar o cálculo, a unidade do CAT foi ajustada de mmol de Trolox equivalente/L para µmol de Trolox equivalente/L. O valor do IEO é um valor arbitrário e calculado da seguinte forma:

$$\text{IEO} = \frac{\text{EOT}}{\text{CAT}} \times 100$$

Análise estatística

Os dados coletados foram tabulados e organizados estatisticamente por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences® (versão 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados obtidos foram analisados aplicando o Teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade e o teste de Mann Withney para comparar os grupos. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

Resultados

O grupo caso de 30 indivíduos com DC foi formado por 73% de participantes do gênero feminino e 27% do gênero masculino. A idade dos participantes variou entre 5 e 33 anos de idade (TABELA 2).

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO COM DOENÇA CELÍACA (CURITIBA, 2016)

	Celiacos (n)	%
Número	30	100
Gênero		
Feminino	22	73
Masculino	08	27
Idade (anos)		
5 – 10	06	20
11 – 15	10	33,33
16 – 20	07	23,33
21 – 25	02	6,66
Maior que 25	05	16,66
Cor		
Branca	26	86,66
Não-branca	04	13,33
Procedência		
Zona Urbana	28	93,33
Zona Rural	02	6,66

Os participantes do grupo com DC apresentavam comorbidades como: diabetes, anemia, úlcera aftosa, ansiedade, hipertireoidismo, intolerância a lactose (TABELA 3).

TABELA 3. NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM COMORBIDADES DO GRUPO COM DOENÇA CELÍACA (CURITIBA, 2016)

	Celíacos (n)
Diabetes	4
Anemia	5
Úlcera aftosa	1
Ansiedade	4
Hipertireoidismo	1
Intolerância a lactose	1

O valor da concentração do estado oxidante total foi semelhante em ambos os grupos. Já o grupo de indivíduos com DC apresentou a concentração da capacidade antioxidante total estatisticamente diminuída quando comparado ao grupo controle. Quando determinado o índice de estado oxidativo, foi observado que o grupo de indivíduos com DC apresentam um valor dez vezes maior quando comparado ao grupo controle (TABELA 4).

TABELA 4. MÉDIA E DESVIO DO PADRÃO DO ESTADO OXIDANTE TOTAL (EOT), DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) E DO ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO (IEO) NA SALIVA ESTIMULADA DOS GRUPOS DE ESTUDO.

	Celíacos	Controles	P
EOT ($\mu\text{mol/L}$)	2,524 \pm 0,268	2,492 \pm 0,284	0,603
CAT (mmol/L)	0,002 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,000
IEO	0,154 \pm 0,304	0,012 \pm 0,013	0,037

Teste Mann Withney

Discussão

O desequilíbrio REDOX pode desencadear diversas desordens sistêmicas, caracterizando o estresse oxidativo (8). Diversos estudos já comprovaram que a DC altera o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, pois a gliadina, peptídeo do glúten, possui a capacidade de penetrar nas células conduzindo a ativação de algumas vias de transmissão de sinal e a um aumento dos níveis de radicais livres, por isso pode-se dizer que o glúten está diretamente relacionado com o estresse oxidativo (11).

A saliva é um meio prático, não-invasivo e útil para o monitoramento de diferentes condições, inclusive do índice de estresse oxidativo (IEO) (12, 13). No presente estudo verificou-se além desse índice, a capacidade antioxidante total (CAT) e estado oxidativo total (EOT) na saliva de portadores da DC. Foi possível identificar aumento no valor de IEO do grupo caso (TABELA 4), concordando com os resultados de que o estresse oxidativo é fortemente associado com a DC a partir de coleta de sangue periférico (14).

Em saliva, o EOT está aumentado (TABELA 4) entrando em concordância também com Boda e colaboradores (14) que demonstraram o excesso de produção de espécie reativa de oxigênio em amostras de tecidos intestinais biopsiados. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante processos metabólicos nas células e quando a produção de ERO é maior que a CAT, ocorre o estresse oxidativo. A peroxidação lipídica é uma das primeiras consequências, modificando a estrutura da membrana lipídica bicamada, causando perda de elasticidade da membrana e permeabilidade seletiva, além de perturbações das suas outras funções (15). Esse processo está presente na patogênese de diversas doenças, inclusive distúrbios gastrointestinais, como a DC (16).

Os antioxidantes poderiam evitar o dano provocado pela peroxidação lipídica, entretanto, como os celíacos possuem má absorção de nutrientes, incluindo as vitaminas, a CAT é reduzida (17) e permanece o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, concordante com resultado do presente estudo (TABELA 4).

A mucosa intestinal está frequentemente em contato com oxidantes (18) e para o mecanismo de defesa ser efetivo deve-se manter elevadas as concentrações de antioxidantes, como GSH. Entretanto, os antioxidantes estão diminuídos tanto para celíacos (conforme resultados) quanto para Doença de Crohn, outra doença grave do trato gastrointestinal (19).

A recomendação para aumentar a concentração de antioxidantes é a ingestão de frutas e vegetais ricos em vitaminas (20) e a prática de exercícios físicos moderados e frequente que atua no aumento e ativação de enzimas antioxidantes, como, a SOD, levando à redução dos níveis de EROs (21).

Várias comorbidades tem sido descritas em associação com a DC, geralmente auto-imunes. Apesar de não estar claro se a DC é uma reação secundária ou primária em relação às outras doenças, sabe-se que as doenças em indivíduos com DC ocorrem dez vezes mais quando comparadas com indivíduos sem DC, como: doenças dermatológicas, hepatobiliar, pancreática, endocrinopatias, deficiências imunológicas, síndromes de má formação, alergia alimentar, entre outras (4). Sendo assim, justifica-se os indivíduos do grupo caso apresentarem diabetes, anemia, úlcera aftosa, ansiedade, hipertireoidismo, intolerância a lactose (TABELA 3). Tanto a diabetes mellitus quanto a anemia podem alterar o índice do estresse oxidativo pelo aumento da produção de ERO (22, 23).

Diversos estudos tem demonstrado que a DC está associada a estresse oxidativo (6), e no presente trabalho foi possível verificar que os indivíduos com DC apresentam também o estado oxidativo na saliva alterado, principalmente em decorrência da diminuição da capacidade antioxidante total.

Referências Bibliográficas

- 1 DEWAR, D.; PEREIRA, S. P.; CICLITIRA P. J. The pathogenesis of coeliac disease. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 36, p. 17-24, 2004.
- 2 RASHID, M.; ZARKADAS, M.; ANCA, A.; LIMEBACK, H. Oral manifestations of celiac disease: a clinical guide for dentists. **J Can Dent Assoc.** v., p. 1-6, 2011.
- 3 COSTACURTA, M.; CONDÒ, R.; SICURO, L.; PERUGIA, C.; DOCIMO, R. Cervical vertebral maturation and dental age in coeliac patients. **Oral & Implantology.** v. IV, p. 23–29, 2011.

- 4 LEPERS, S.; COUIGNOUX, S.; COLOMBEL, J. F.; DUBUCQUOI, S. Celiac disease in adults: new aspects. **Rev Med Interne**. v. 25, p. 22-34, 2004.
- 5 KELLY, C. P.; BAI, J. C.; LIU, E.; LEFFLER, D. A. Advances in diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology**. v. 148, p. 1175-86, 2015.
- 6 FINK, G. Encyclopedia of Stress. **New York: Academic Press**. segunda edição, 2007.
- 7 COFTA, S.; WYSOCKA, E.; PIORUNEK, T.; RZYMKOWSKA, M.; BATURA-GABRYEL, H.; TORLINSKI, L. Oxidative stress markers in the blood of persons with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. **J Physiol Pharmacol**. v. 59, p. 183-190, 2008.
- 8 EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Biochem**, v. 37, n. 2, p. 112-9, Feb 2004. ISSN 0009-9120.
- 9 JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, n. 1, p. 61 -71, 1990.
- 10 EREL. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, v. 38, n. 12, p.1103-1111, 2005.
- 11 HEYMAN, M.; MENARD, S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. v. 1165, p. 274–278, 2009.
- 12 STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Dis**. v. 8, p. 69-76, 2002.
- 13 MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxid Redox Signal**. v. 20, p. 164-82, 2014.
- 14 BODA, M.; NÉMETH, I.; BODA, D. The caffeine metabolic ratio as an index of xanthine oxidase activity in clinically active and silent celiac patients. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 29, p. 546–50, 1999.
- 15 HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**. v. 16 p.33–50, 1996.
- 16 SIDO, B.; HACK, V.; HOCHLEHNERT, A.; LIPPS, H.; HERFARTH, C.; DRÖGE, W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**. v. 42, p. 485–92, 1998.

17 GOODE, H. F.; COWLEY, H. C.; WALKER, B. E.; HOWDLE, P. D.; WEBSTER, N. R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med.** v. 23, p. 646–51, 1995.

18 AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science.** v. 221, p.1256–64, 1983.

19 STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; PEJIĆ, S.; KASAPOVIĆ, J.; SAICIĆ, Z. S.; RADLOVIĆ, N.; PAJOVIĆ, S. B. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. **Ann Clin Biochem.** v 44, p. 537-43, 2007.

20 WAHLQVIST, M.L. Antioxidant relevance to human health. **Asia Pac J Clin Nutr,** vol. 22, n^o 2, 2013.

21 CARDOSO, A.M. Acute effects of resistance exercise and intermittent intense aerobic exercise on blood cell count and oxidative stress in trained middle-aged women. **Braz J Med Biol Res,** vol. 45, n^o 12, 2012.

22 YIMAM, M.; BROWNELL, L.; JIA, Q. Aloesin as a medical food ingredient for systemic oxidative stress of diabetes. **World J Diabetes,** v. 06, n. 10, pag. 1097-107, 2015.

23 FUJII, J.; KURAHASHI, T.; KONNO, T.; HOMMA, T.; IUCHI, Y. Oxidative stress as a potential causal factor for autoimmune hemolytic anemia and systemic lupus erythematosus. **World J Nephrol,** v. 06; n. 4, p. 213-22, 2015.

4 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo pode ser concluído que os indivíduos com doença celíaca apresentam o estado oxidativo da saliva aumentado decorrente da diminuição da capacidade antioxidante.

REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin Chim Acta**. v. 306, p.1–17, 2001.

ACAR, S.; YETKINER, A. A.; ERSIN, N.; ONCAG, O., AYDOGDU, S.; ARIKAN, C. Oral Findings and Salivary Parameters in Children with Celiac Disease: A Preliminary Study. **Med Princ Pract**. v. 21, n. 2, p. 129-33, 2012.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**. v. 221, p.1256–64, 1983.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz J Med Biol Res**. v. 30, p. 141-155 1997.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, 2006.

BLAKE, D. R. Iron free radicals and arthritis. **Proc Nutr Soc**, v. 49, n. 2, p. 239-45, 1990.

BODA, M.; NÉMETH, I.; BODA, D. The caffeine metabolic ratio as an index of xanthine oxidase activity in clinically active and silent celiac patients. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 29, p. 546–50, 1999.

BONAMICO, M.; NENNA, R; MONTUORI, M.; LUPARIA, R. P.; TURCHETTI, A.; MENNINI, M.; LUCANTONI, F.; MASOTTI, D.; MAGLIOCCA, F. M.; CULASSO, F.; TIBERTI, C. First salivary screening of celiac disease by detection of anti-transglutaminase autoantibody radioimmunoassay in 5000 Italian primary schoolchildren. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 52, p. 17–20, 2011.

CARDOSO, A.M. Acute effects of resistance exercise and intermittent intense aerobic exercise on blood cell count and oxidative stress in trained middle-aged women. **Braz J Med Biol Res**, vol. 45, nº 12., 2012.

CHAKRABORTHY, A.; RAMANI, P.; SHERLIN, H. J.; PREMKUMAR, P.; NATESAN, A. Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 4, p.499-504, 2014.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**. v.72, n. 2, p. 637-46, 2000.

COFTA, S.; WYSOCKA, E.; PIORUNEK, T.; RZYMKOWSKA, M.; BATURA-GABRYEL, H.; TORLINSKI, L. Oxidative stress markers in the blood of persons with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. **J Physiol Pharmacol**. v. 59, p. 183-190, 2008.

COSTACURTA, M.; CONDÒ, R.; SICURO, L.; PERUGIA, C.; DOCIMO, R. Cervical vertebral maturation and dental age in coeliac patients. **Oral & Implantology**. v. IV, p. 23–29, 2011.

DEVASAGAYAM T. P. A., TILAK J. C., BOLOOR K. K., SANE K. S., GHASKADBI S. S., LELE R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**. v. 52, p.794–804, 2004.

DEWAR, D.; PEREIRA, S. P.; CICLITIRA P. J. The pathogenesis of coeliac disease. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 36, p. 17-24, 2004.

EDGAR, W. M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br Dent J**. v. 172, p. 305-12, 1992.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Biochem**, v. 37, n. 2, p. 112-9, 2004.

EREL. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, v. 38, n. 12, p.1103-1111, 2005.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 61 -8, 1997.

FINK, G. Encyclopedia of Stress. **New York: Academic Press**. segunda edição, 2007.

FRANCAVILLA, R.; LIONETTI, E.; CASTELLANETA, S.; PULVIRENTI, A. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. **N Engl J Med**. v. 371, p. 1295-303, 2014.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **Am J Med**. v. 97, p.5-13, 1994.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 88, p.6337-6381, 1989.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2012; p. 1-11, 2012.

GOODE, H. F.; COWLEY, H. C.; WALKER, B. E.; HOWDLE, P. D.; WEBSTER, N. R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med**. v. 23, p. 646–51, 1995.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 3, p. 277-82, Jun 2001.

GRAINGE, M. J.; WEST, J.; SOLAYMANI-DODARAN, M. The long-term risk of malignancy following a diagnosis of coeliac disease or dermatitis herpetiformis: a cohort study. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 35, p. 730–9, 2012.

GUPTA, R. K.; PATEL, A. K.; SHAH, N. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 15, p. 4405-4409, 2014.

HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr.** v. 16 p.33–50, 1996.

HALLIWELL B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol,** v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Intensive Crit Care Nurs.** v. 11, n. 6, p. 336-40, Dec 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford: Clarendon.** quarta edição, 2007.

HASAN, H. R.; GHADHBAN, J. M.; ABUDAL KADHUM, Z. I. Salivary ceruloplasmin ferroxidase & oxidase activities in celiac patients. **Int J Biomed Sci.** v. 8, p. 163-70, 2012.

HELMERHORST, E. J.; ZAMAKHCHARI, M.; SCHUPPAN, D.; OPPENHEIM, F. G. Discovery of a Novel and Rich Source of Gluten-Degrading Microbial Enzymes in the Oral Cavity. **Plos ONE.** v. 5, 2010.

HEYMAN, M.; MENARD, S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1165, p. 274–278, 2009.

JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther,** v. 47, n. 1, p. 61 -71, 1990.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva--a review. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 13, p. 197-212, 2002.

KELLY, C. P.; BAI, J. C.; LIU, E.; LEFFLER, D. A. Advances in diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology.** v. 148, p. 1175-86, 2015.

LEPERS, S.; COUIGNOUX, S.; COLOMBEL, J. F.; DUBUCQUOI, S. Celiac disease in adults: new aspects. **Rev Med Interne.** v. 25, p. 22-34, 2004.

MARSH, M. N. Mucosal pathology in gluten sensitivity. **Blackwell Scientific Publications.** v. 6, p.136-91, 1992.

MCCORD J, FRIDOVICH I. Superoxido dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem.** v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MERKSAMER, P. I.; LIU, Y.; HE, W.; HIRSCHEY, M.D.; CHEN, D.; VERDIN, E. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. **Aging Albany NY.** v. 5, p. 144-150, 2013.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxid Redox Signal.** v. 20, p. 164-82, 2014.

NAGLER, R. M.; KLEIN, I.; ZARZHEVSKY, N.; DRIGUES, N.; REZNICK, A. Z. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 32, n. 3, p.268-77, 2002.

ODETTI, P.; VALENTINI, S.; ARAGNO, I. Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. **Free Radic Res.** v. 29, p. 17–24, 1998.

POLANCO, I. Enfermedad celíaca. **Pediatría Integral**, v. 1, p.124, 1995.

PARKINSON, D. Oxygen free radicals: in search of a unifying theory of disease. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

RASHID, M.; ZARKADAS, M.; ANCA, A.; LIMEBACK, H. Oral manifestations of celiac disease: a clinical guide for dentists. **J Can Dent Assoc.** v. 77, p. 1-6, 2011.

SCOTT, M. D. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.** v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SCREEBNEY, L. M.; VALDINI, A. Xerostomia. A neglected symptom. **Arch Intern Med.** v. 147, p. 1333-7, 1987.

SEGAL, A.; WONG, D. T. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. **Eur J Dent Educ**, v. 12, p. 22-9, 2008.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SIDO, B.; HACK, V.; HOCHLEHNERT, A.; LIPPS, H.; HERFARTH, C.; DRÖGE, W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut.** v. 42, p. 485–92, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, 1991.

SPIELMANN, N.; WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Dis**, v. 17, n. 4, p. 345-54, 2011.

STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; PEJIĆ, S.; KASAPOVIĆ, J.; SAICIĆ, Z. S.; RADLOVIĆ, N.; PAJOVIĆ, S. B. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. **Clin Biochem.** v. 42, p. 1431-7, 2009.

STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; PEJIĆ, S.; KASAPOVIĆ, J.; SAICIĆ, Z. S.; RADLOVIĆ, N.; PAJOVIĆ, S. B. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. **Ann Clin Biochem.** v 44, p. 537-43, 2007.

STOREY, K. B. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. **Wiley- Liss**

Publications. primeira edNew Jersey; 2004.

STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Dis.** v. 8, p. 69-76, 2002.

WAHLQVIST, M.L. Antioxidant relevance to human health. **Asia Pac J Clin Nutr**, vol. 22, nº 2, 2013.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology.** v. 4, n. 5, p.278-286, 2008.

APÊNDICE 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná com parecer de número 1.041.046 (ANEXO 1). Os indivíduos foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a participação voluntária na pesquisa.

POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes do presente estudo são pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Paraná portadores de DC atendidos de Agosto de 2015 a Dezembro de 2016.

A amostra foi por conveniência. Após passar pela consulta médica, os pacientes eram convidados a participar do estudo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todo indivíduo com DC que passava por atendimento médico no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná era convidado a participar, desde que o mesmo conseguisse realizar a coleta da saliva. Após isso, era selecionado um caso controle de escolas de Curitiba, triagem da Clínica de Odontopediatria e acadêmicos de Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Cada controle possuía a mesma idade e sexo, sem doença, boa condição de saúde oral, sem doença periodontal ou cárie dentária e não fazia uso de medicamento, totalizando 60 indivíduos participantes da pesquisa, sendo 30 indivíduos no grupo caso e 30 indivíduos no grupo controle.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os participantes que não estavam aptos a coletar a saliva, tabagistas, ruim condição de saúde oral, com doença periodontal ou cárie dentária e uso de medicamentos polivitamínicos.

COLETA DE DADOS

Os dados, como: sexo, idade, medicamentos utilizados pelos indivíduos foram coletados mediante questionário realizado previamente à coleta de saliva.

COLETA DA SALIVA

Foi solicitado aos participantes não comer, beber ou escovar os dentes por um período de pelo menos uma hora antes da coleta de saliva. As coletas de saliva foram feitas entre os períodos de 8:00 e 11:30 horas da manhã. Antes do início da coleta foi solicitado que deglulissem a saliva presente na cavidade bucal.

A coleta da saliva estimulada foi realizada utilizando-se o método de *spitting*, sendo estritamente estimulada com um filme de parafina. A saliva coletada foi armazenada em recipientes estéreis devidamente identificados. Durante a coleta, e para seu transporte, as amostras permaneceram em uma caixa de isopor com gelo até o laboratório de Bioquímica Bucal da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram centrifugadas a $9.030 \times g$ (10.000 RPM) durante 4 minutos.

A coleta da saliva dos controles seguiu o mesmo protocolo. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C e analisadas em menos de 15 dias.

Após a coleta da saliva, prosseguiu-se uma avaliação clínica intra oral e breve anamnese.

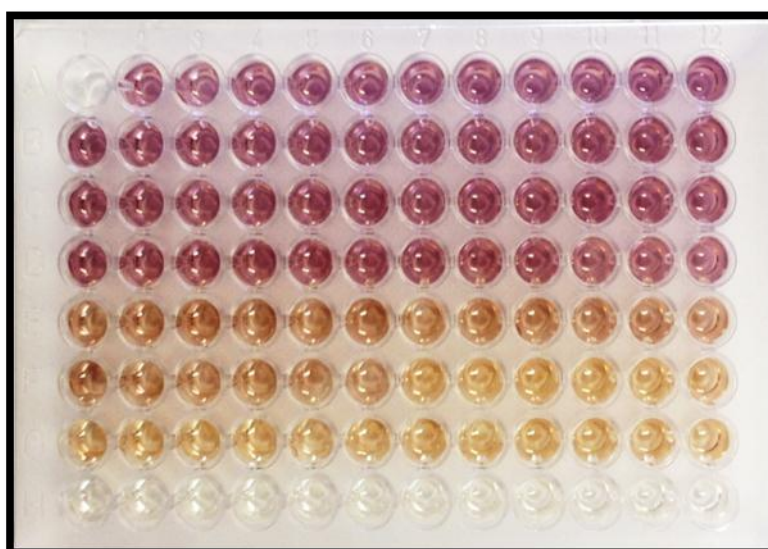
ANÁLISE BIOQUÍMICA DA SALIVA

- Determinação da Capacidade Antioxidante Total

Determinou-se a CAT pelo método de Erel (2004), no qual as reações de radicais livres são iniciadas com a produção do radical hidroxilo por meio de reação de Fenton e a velocidade desta é monitorada seguindo a absorvância de radicais dianisidil corado. Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75 mM de solução de Clark e Lubs [(160 ml de KCl (75 mM) e 40 ml de HCl 37% (75 mM), pH final 1,8)], 10 mM de o-dianisidina e 45 μM de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorvância de 450nm. Após a primeira leitura foi

adicionada uma alíquota de uma solução 7.5 μM de H_2O_2 , preparada na solução de Clark e Lubs, e após de 7 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com Trolox em tampão fosfato básico (pH 7,4). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L (FIGURA 2).

FIGURA 2. IMAGEM ILUSTRATIVA REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES TOTAIS



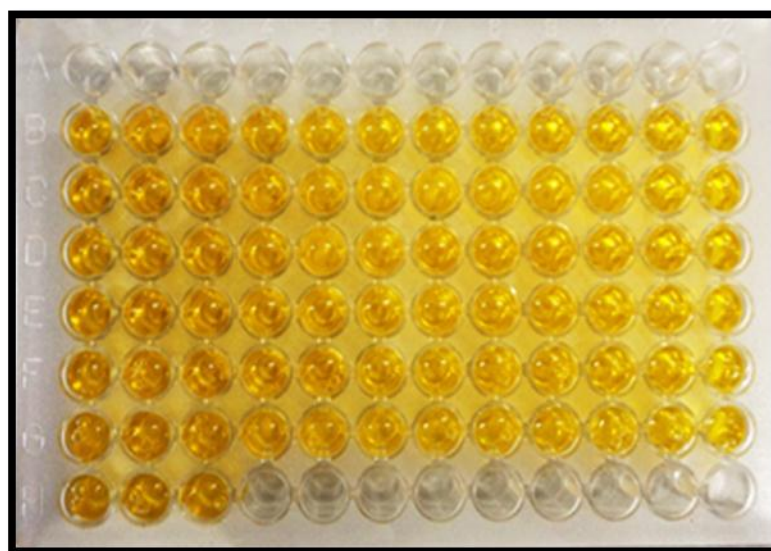
FONTE: AUTOR (2015)

- Determinação do Estado Oxidante Total (EOT)

O EOT foi determinado pelo método de Erel (2005). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico na presença de várias espécies oxidantes em meio ácido e a medição do íon férrico pelo laranja de xilenol. Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo: 150 μM de xilenol, 140 μM de NaCl, 90 ml de H_2SO_4 25 μM e 10 ml de glicerol 1,35 M. Posteriormente, foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorvância de 550 nm. Após a primeira leitura foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo: 5 mM de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mM de o-dianisidina

em 10 ml de H₂SO₄ 25 mM. Após 4 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi realizada com H₂O₂. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em µmol H₂O₂ equivalente /L (FIGURA 3).

FIGURA 3. IMAGEM ILUSTRATIVA DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIDANTES TOTAIS



FONTE: AUTOR (2015)

- Determinação do índice de estresse oxidativo (IEO)

O IEO é considerado como a relação entre o EOT e a CAT (HARMA e EREL, 2003). Para realizar o cálculo, a unidade do CAT foi ajustada de mmol de Trolox equivalente/L para µmol de Trolox equivalente/L. O valor do IEO é um valor arbitrário e calculado da seguinte forma:

$$\text{IEO} = \frac{\text{EOT}}{\text{CAT}} \times 100$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados e organizados estatisticamente por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences® (versão 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados obtidos foram analisados aplicando o Teste Shapiro Wilk para avaliar a normalidade e o teste de Mann Withney para comparar os grupos. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

APÊNDICE 2 - FICHA DE AVALIAÇÃO

FICHA CLÍNICA

Dados do Paciente CODIFICAÇÃO:

Grupo Caso () Grupo Controle ()

Data: |__| |__| |__|

Data do diagnóstico (se "Caso"): |__| |__| |__|

Nome: _____ Prontuário

Nº: |_____| Telefone: _____.

Data de Nascimento: |__| |__| |__| Idade: |_____|

Sexo: |__| (1) Masculino (2) Feminino

Cor: |__| (1) Amarela (2) Branca (3) Indígena (4) Parda (5) Preta

Procedência: _____ . Zona Rural (1) Zona Urbana (2): |__|

Grau de parentesco com a criança de quem respondeu o questionário: |__|

(1) Mãe; (2) Pai; (3) Avós; (4) Tios; (5) Outros Quem? _____

Tomou algum medicamento nos últimos três meses? |__|

(1) Nenhum; (2) Analgésico; (3) Antiinflamatório; (4) Antibiótico

Informações do histórico médico, medicamentos, deficiência de vitaminas, outras doenças e informações complementares:

**ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Manifestações orais em pacientes com doença celíaca.

Pesquisador: LUCIANA REICHERT ASSUNÇÃO ZANON

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41861015.0.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.041.046

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Manifestações orais em pacientes com doença celíaca

Pesquisadora: Luciana Reichert Assunção Zanoni

Trata-se de estudo observacional transversal com fins de em que as manifestações bucais associadas com a doença celíaca. Os fatores a serem analisados serão: carie dentária, hipomineralização molar incisivo (MIH), defeito de desenvolvimento de esmalte (DDE), lesões de mucosa bucal e alterações nos parâmetros salivares. Para isto serão selecionados 50 participantes portadoras de doença celíaca entre 2 e 21 anos assistidos no ambulatório de gastropediatria do Hospital de Clínicas - UFPR. O diagnóstico da doença celíaca se deu previamente através do exame positivo para o anticorpo anti-endomísio – (IgA) e confirmação definitiva da doença através da biópsia do intestino delgado associada à sorologia positiva para doença celíaca. Para efeito de comparação, um grupo controle formado por 20 participantes não portadoras da doença celíaca, irmãos dos pacientes, também serão selecionadas para o estudo. Esses foram previamente diagnosticados como não-celíacos através de sorologia negativa para o anti-endomísio –anticorpos (IgA). O exame clínico será realizado por um examinador previamente calibrado.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.04.1.046

Índices ceo-d e CPO-D serão utilizados para o diagnóstico de cárie dentária. A classificação de Aine (1986) será utilizada para o exame clínico de DDE. Para a avaliação da MIH serão utilizados os critérios da Academia Européia de Odontopediatria (EAPD). As lesões de mucosa bucal serão divididas de acordo com a Classificação Internacional das Doenças (CID). Também será realizada análise salivar para verificar o pH, a capacidade tampão e o fluxo salivar. Para melhor avaliação das manifestações bucais será também aplicado um questionário previamente testado para o grupo de pacientes celíacos e para o grupo controle. Os dados obtidos serão analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos conforme o tipo de variável a ser analisada.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desta pesquisa será avaliar as condições bucais em pacientes portadores de doença celíaca.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a experiência de cárie dentária em pacientes com doença celíaca em comparação a um grupo de indivíduos não portadores da doença;•
- Avaliar a ocorrência de defeitos de desenvolvimento de esmalte em pacientes com de doença celíaca em comparação a um grupo de indivíduos não portadores da doença;•
- Avaliar a presença de hipomineralização molar incisivo em pacientes com doença celíaca em comparação a um grupo de indivíduos não portadores da doença;•
- Analisar a presença de lesões de mucosa bucal em pacientes com doença celíaca em comparação a um grupo de indivíduos não portadores da doença;•
- Avaliar parâmetros salivares em pacientes com doença celíaca e comparar os valores obtidos em paciente sem a doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Um risco relacionado a esta pesquisa será a possibilidade de constrangimento do participante ao responder alguma pergunta do questionário.

Tentará ser minimizado esse risco através da manutenção do sigilo dos dados por parte do pesquisador e do direito do participante em não

responder alguma pergunta, bem como interromper sua participação na pesquisa. Existe o risco

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.041.046

do participante durante o exame bucal sentir um mínimo desconforto. Para minimizar esse risco o exame bucal poderá ser interrompido à qualquer momento e retomado com a autorização do participante. Além disso, o tempo de exame bucal não deverá ultrapassar 10 minutos.

Benefícios:

Dentre os benefícios diretos para os participantes desta pesquisa estão a melhoria de formas auxiliares de diagnóstico da doença celíaca, através da identificação de indicadores bucais para a doença. O benefício indireto será a contribuição do estudo para o tema, proporcionando o estabelecimento de uma melhor conduta terapêutica por parte dos cirurgiões-dentistas frente à DC.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, bem descrita, previamente analisada, com pendências a serem atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos foram analisados.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências foram corrigidas e atendidas.

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS).

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.041.046

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Quando o projeto de pesquisa for realizado num todo ou em parte no Hospital de Clínicas da UFPR: O pesquisador deverá aguardar o Parecer Consubstanciado de Coparticipação do CEP/HC APROVANDO o projeto, para então dar início a pesquisa.. Se houver necessidade de alteração do Cronograma em virtude desse trâmite, solicitar prorrogação de prazo através de emenda, alterando o Cronograma no sistema PB.

CURITIBA, 29 de Abril de 2015

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

