



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA DE LOURDES BRESEGHELO

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES SALIVARES
RELACIONADAS À ADAPTAÇÃO FUNCIONAL DE PACIENTES
USUÁRIOS DE PRÓTESES TOTAIS**

**Goiânia
2014**

MARIA DE LOURDES BRESEGHELO

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES SALIVARES
RELACIONADAS À ADAPTAÇÃO FUNCIONAL DE
PACIENTES USUÁRIOS DE PRÓTESES TOTAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Rodrigues Leles

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo

**Goiânia
2014**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Maria de Lourdes Breseghelo

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Rodrigues Leles

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo

Membros:

1. Prof. Dr. Cláudio Rodrigues Leles (Presidente)

2. Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira (Membro)

3. Prof. Dr. Bento Alves de Barcelos (Membro)

4. Prof. Dr. Clever Gomes Cardoso (Membro)

5. Prof^a. Dr^a. Juliê Marra de Paula (Membro)

OU

6. Prof^a. Dr^a. Lee Chen Chen (Suplente)

7. Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça (Suplente)

Data: 18/12/2014

***Dedico este trabalho à minha família: meu esposo
Jessé e meus filhos Lucas e Breno pelo imenso
incentivo, indispensável ajuda e valiosa paciência,
tão fundamentais na necessária persistência para
chegar até o fim.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar um agradecimento especial a Deus, autor da minha vida, que me deu capacidade e coragem para nunca desistir.

Agradeço ao Professor Doutor Cláudio Rodrigues Leles por ter aceitado me orientar, tarefa que cumpriu com muita dedicação.

À Professora Doutora Lídia Andreu Guillo pela coorientação e por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Professor Doutor Cléver Gomes Cardoso pelo incentivo e ajuda que eu tanto precisei para vencer este desafio.

À Professora Doutora Célia Maria de Almeida Soares e ao Professor Doutor Clayton Luiz Borges pela colaboração e uso do laboratório para as análises de cortisol.

À Professora Doutora Liliani Vieira pela boa vontade em colaborar no projeto de pesquisa apresentado no processo de seleção.

Aos amigos que trabalharam no projeto atendendo os pacientes e instalando as próteses: Túlio, Bento, Donizete, Marcelo, Fernanda e Lays, e também aos pacientes que aceitaram participar da pesquisa doando saliva, os meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas que sempre que possível me incentivaram, a minha gratidão.

À Universidade Federal de Goiás e à Faculdade de Odontologia pelo suporte técnico.

Ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Adaptação ao Uso de Prótese	17
1.2	A saliva	18
1.2.1	Funções da Saliva	20
1.2.2	Marcadores Salivares e diagnósticos	22
1.3	O Óxido Nítrico.....	23
1.3.1	Síntese de Óxido Nítrico e Enzimas	24
1.3.2	Outras vias de geração de Óxido Nítrico	25
1.3.3	Funções do Óxido Nítrico	27
1.3.4	Saliva e Óxido Nítrico	29
1.4	O cortisol	30
1.4.1	Cortisol Salivar e Stress Fisiológico	32
1.5	Objetivo geral do Trabalho.....	33
1.6	Objetivos específicos	33
1.7	Hipóteses.....	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1	CrITÉRIOS de Inclusão e Exclusão	35
2.2	Abordagem de aspectos éticos envolvidos na pesquisa.....	36
2.2.1	Confidencialidade dos Dados.....	37
2.3	Avaliação clínica preliminar	37
2.3.1	Períodos de Avaliação.....	38
2.4	Variáveis Analisadas	38
2.5	Protocolo de confecção das próteses	39

2.6	Coleta, obtenção do volume e Armazenamento da saliva	39
2.7	Teste de inspeção visual para verificação do fluxo salivar não estimulado.....	40
2.8	Teste de viscosidade da saliva	41
2.9	Teste de medida do pH.....	41
2.10	Nível de Adaptação Funcional.....	41
2.11	Nível de Traumatismo Após Instalação	42
2.12	Dosagem da concentração de óxido nítrico.....	43
2.13	Curva de Calibração	44
2.14	Dosagem da Concentração de Cortisol	46
2.15	Análise de dados	50
3	RESULTADOS	51
3.1	Concentração de nitrito salivar	53
3.2	Concentração de cortisol salivar	59
4	DISCUSSÃO.....	62
4.1	Análise dos níveis de óxido nítrico	66
4.2	Análise dos níveis de cortisol salivar	69
5	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	ANEXOS	77

QUADROS, FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Geração de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase e a via nitrato-nitrito-NO (adaptado de Hezel e Weitzberg, 2013).	27
Figura 1.2 - Cascata de liberação de cortisol a partir da estimulação do hipotálamo pelo SNC (adaptado de Nelson e Cox 2011).....	31
Figura 2.1 - Kit utilizado na coleta de saliva	40
Figura 2.2 - Leitor de microplacas ELX 800	44
Figura 2.3 - Curva padrão para cálculo da concentração de nitrito.....	45
Figura 2.4 - Reação de Griess em placa do tipo ELISA para dosagem da concentração de nitrito	46
Figura 2.5 - Leitor de microplacas <i>Spectramax</i>	48
Figura 2.6 - Curva padrão para cálculo da concentração de cortisol	49
Figura 2.7 - Reação Enzimática em placa de ELISA para dosagem da concentração de cortisol	49
Figura 3.1 - Distribuição de frequência dos valores da concentração de nitrito salivar (n=76)	54
Figura 3.2 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os períodos de avaliação	55
Figura 3.3 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os períodos de avaliação	56
Figura 3.4 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os níveis de adaptação funcional do paciente às próteses totais. Adaptação favorável (n=35), alguma dificuldade (n=15), extrema dificuldade (n=1)	57
Figura 3.5 - Concentração de nitrito salivar de acordo com a presença de áreas de traumatismo nos períodos de avaliação. Ausência de traumatismo (n=18), 1 a 2 pequenos pontos (n=29), múltiplos pontos (n=4).....	57
Figura 3.6 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os níveis de fluxo salivar nos períodos de avaliação	58

Figura 3.7 - Concentração de nitrito salivar de acordo com a viscosidade nos períodos de avaliação 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Funções da saliva e constituintes envolvidos (adaptado de Wong, 2008).....	21
Tabela 1.2 - Similaridades e diferenças entre as duas NOS (adaptado de Moncada, Palmer e Higgs, 1991).....	25
Tabela 2.1 - Dados obtidos para construção da curva padrão na dosagem de nitrito	45
Tabela 2.2 - Dados obtidos para construção da curva padrão na dosagem de cortisol.....	48
Tabela 3.1 - Características físicas das amostras de saliva coletadas	51
Tabela 3.2 - Frequência dos níveis de adaptação de acordo com relato do paciente nos períodos de retorno após instalação das próteses (percentagem entre parêntesis)	52
Tabela 3.3 - Frequência da presença de pontos de traumatismo nas sessões de retorno após instalação das próteses (percentagem entre parêntesis)...	52
Tabela 3.4 - Estatística descritiva das concentrações de nitrito salivar de acordo com o paciente individualmente	53
Tabela 3.5 - Estatística descritiva das concentrações de nitrito salivar de acordo com os períodos avaliados: instalação, adaptação e pós adaptativo às próteses.....	55

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

O₂:	Oxigênio molecular
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Óxido nítrico sintase
cNOS:	Óxido nítrico sintase constitutiva
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
FAD:	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN:	Flavina mononucleotídeo
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
Ca²⁺:	Íon cálcio
BH₄:	Tetrahidrobiopterina
Fe:	Ferro atômico
HPA:	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ELISA:	Teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
IIQ:	Intervalo interquartil
B/Bo:	Límite percentual de densidade óptica (<i>Salimetrics</i>)

RESUMO

Próteses totais convencionais representam o principal tratamento para o edentulismo total na população em geral. Entretanto este tratamento pode levar ao aparecimento de alterações fisiológicas e funcionais transitórias durante o período adaptativo após a instalação das próteses. O objetivo deste trabalho foi avaliar modificações em parâmetros bioquímicos (níveis de óxido nítrico e cortisol) na saliva de usuários de próteses e verificar sua associação com parâmetros clínicos como os níveis de adaptação funcional, traumatismos, fluxo salivar e viscosidade. Foram selecionados 19 pacientes desdentados totais com necessidade de instalação ou substituição de próteses os quais foram avaliados na instalação, durante a adaptação e no período pós-adaptativo. O protocolo para confecção de próteses totais seguiu os procedimentos clínicos e laboratoriais. A dosagem da concentração de óxido nítrico foi feita por meio da reação de Griess onde a medida realizada é a concentração de nitrito uma vez que o óxido nítrico é muito instável e logo se transforma em nitrito. Os pontos para a construção da curva de calibração foram feitos em triplicata utilizando-se concentrações de nitrito que variaram de 5 a 150 μM sendo que para cada placa analisada uma nova curva foi construída. A dosagem da concentração de cortisol salivar foi feita utilizando-se o kit enzimático No. 1-3002 (*single*) *Salimetrics*. Foi realizada análise estatística descritiva para representação das medidas de resumos das variáveis mensuradas. Testes não paramétricos (Testes de Friedman, Wilcoxon, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) foram utilizados para

comparação entre grupos. Os níveis de óxido nítrico salivar foram quantificados para cada um dos períodos de avaliação e correlacionados entre si, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre eles. Os períodos adaptativos mostraram uma queda nos níveis de óxido nítrico em relação à instalação e à pós-instalação. Não houve diferenças significativas nas correlações entre as concentrações de óxido nítrico salivar e os níveis de adaptação funcional, traumatismo, fluxo salivar e viscosidade. Os níveis de cortisol salivar foram avaliados em dois períodos, no pós-adaptativo e depois de alguns meses de uso da prótese, mostrando grande variação no primeiro e estabilização no segundo. Não houve diferença significativa quando correlacionado com níveis de adaptação funcional e traumatismos. Concluiu-se que o tratamento protético provocou alterações nos níveis de óxido nítrico e cortisol salivares durante a adaptação às próteses porém estes níveis voltaram aos normais após este período.

Palavras-chave: próteses dentárias, saliva, óxido nítrico, cortisol.

ABSTRACT

Complete dentures represent the main treatment for total edentulism in the overall population. However this type of treatment can lead to the onset of physiological and functional alterations during the adaptative period after the installation of the denture. The objective of this work was to evaluate modifications in biochemical parameters (nitric oxide and cortisol levels) in complete denture user's saliva and verify its association with clinical parameters like levels of functional adaptation, trauma, salivary flux, and viscosity. Nineteen totally toothless patients in need of installation or substitution of dentures were selected and evaluated during the installation, adaptation and in the post-adaptation period. The protocol for making the complete dentures followed clinical and laboratory procedures. The nitric oxide concentration dosage was performed via the Griess reaction, where the measurement taken is the nitrite concentration, since nitric oxide is very unstable and rapidly transforms into nitrite. The points for construction of the calibration curve were made in triplicate using the nitrite concentration, which varied from 5 to 150 μM , wherein for each analyzed plate a new curve was built. The salivary cortisol concentration was performed using Salimetrics No. 1-3002 (single) enzymatic kit. A descriptive statistical analysis was done for representation of summary measures of the variables measured. Non-parametric tests (Friedman, Wilcoxon, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests) were used for group comparison. Salivary nitric oxide levels were quantified for each evaluation period and correlated between themselves,

showing statistically significant differences among them. The adaptative periods showed a decrease in nitric oxide levels between installation and post-installation. There were no significant differences in correlations between salivary nitric oxide concentrations and levels of functional adaptation, trauma, salivary flux and viscosity. The salivary cortisol levels were evaluated at two periods, in the post-adaptative and after some months of denture use, showing great variation at the first period and stabilization at the second. There was no significant difference when correlated to the levels of functional adaptation and trauma. It was concluded that the prosthetic treatment caused alterations in salivary nitric oxide and cortisol levels during adaptation to dentures however these levels came back to normal after that period.

Keywords: dentures, saliva, nitric oxide, cortisol.

1 INTRODUÇÃO

A saúde bucal da população brasileira sobretudo de idosos apresenta grande precariedade. O edentulismo (falta de dentes) nesta população tornou-se um problema de saúde pública observado principalmente em pessoas com renda familiar mais baixa, levando a um aumento na demanda por tratamentos que envolvem o uso de próteses dentárias. Estima-se que 15% dos indivíduos entre 65 e 74 anos apresentam necessidade de prótese total dupla e 23% precisam em pelo menos uma das arcadas (MURAKAMI *et al*, 2007; BRASIL, 2011).

As próteses são o principal tratamento para a falta de dentes mas frequentemente elas provocam um grande impacto sobre a qualidade de vida do usuário no que se refere a limitações na mastigação e deglutição, causam desconforto e dor e podem interferir até na aparência (MARUCH *et al*, 2009).

Análise de alterações bucais que aparecem por condições inadequadas de uso da prótese mostram regiões afetadas no palato duro, vestibulos inferior e superior, assoalho e mucosa labial. As lesões mais frequentes são: candidíase, hiperplasia, fibroma e trauma (RUIZ *et al*, 2008).

Fungos do gênero *Cândida* são encontrados com frequência maior na saliva e na prótese dos usuários, se comparado com os não usuários, sendo em torno de 70% para *Cândida albicans* e 30% para *Cândida* não *albicans* (GASPARETTO *et al*, 2005).

Alterações nos valores de pH foram observadas na saliva de usuários antes da instalação e 15 dias após, tanto para prótese convencional como para prótese suportada por implante, em ambos os casos houve mudança significativa no valor do pH salivar (NIKOLOPOULO & TZORTZOPOULOU, 2007).

O volume total da saliva não se apresenta alterado em indivíduos idosos, exceto em caso de uso de alguns medicamentos ou tratamentos como radioterapia. Observou-se também em idosos uma diferença entre os gêneros no volume de saliva produzido, sendo maior nos pacientes do sexo masculino. (ICHIKAWA *et al*, 2010).

1.1 ADAPTAÇÃO AO USO DE PRÓTESE

A fase de adaptação funcional que ocorre após a instalação das próteses é crítica devido a dificuldades transitórias relacionadas à fonética, excesso de salivação, dificuldades na mastigação e falta de coordenação mandibular, além de possíveis áreas de traumatismo (LELES *et al.*, 2006). Nessa etapa, inicia-se uma série de processos adaptativos transitórios e estabelece-se um prognóstico para avaliar o resultado final (BASKER *et al.*, 1992).

Após a instalação há um período de tempo que varia entre 2 e 6 semanas, durante o qual os pacientes devem se ajustar e acomodar. Novas próteses muitas vezes causam sensação de volume e incômodo na boca, porém esta estranheza, embora incômoda, é um problema temporário que normalmente é resolvido durante o período de adaptação.

Entretanto, a ocorrência de dificuldades no período inicial pode causar uma insatisfação do paciente no primeiro ano de uso (BERG, 1988). O sucesso do tratamento está relacionado não apenas à adequada reposição dos dentes, mas também à capacidade de adaptação que influencia diretamente na aceitação da prótese (BERGE *et al*, 1985; BERGMAN & CARLSSON, 1985). Embora problemas de adaptação sejam clinicamente identificáveis, poucos estudos avaliaram sistematicamente o seu significado e o mecanismo fisiológico das alterações que ocorrem neste período. O uso de prótese pode ser fator predisponente para o aparecimento de alterações salivares que afetam a saúde bucal e o conhecimento de características da saliva contribui para melhorar a adaptação, a preservação dos tecidos orais e conseqüentemente a qualidade de vida.

1.2 A SALIVA

A saliva é um líquido balanceado composto em mais de 99% de água e menos de 1% de proteínas e eletrólitos. Cerca de 0,5 a 1,0 litro de saliva é secretado por dia pelas glândulas salivares, sendo que 85% a 90% dessa secreção tem origem nas glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e o restante, aproximadamente 10%, nas glândulas salivares menores que estão distribuídas pela mucosa bucal. Esse fluido, que tem pH levemente ácido, contribui para várias funções dentre elas, capacidade de tamponamento, ação antibacteriana, mastigação, deglutição, fala, e lubrificação do epitélio (FEJERSKOV & KIDD, 2005).

As glândulas salivares são de natureza exócrina e localizam-se próximas à cavidade bucal, com três pares de glândulas maiores e várias

glândulas menores. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo, embora vários hormônios possam também modular sua composição (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001; SCULLY, 2003).

A unidade funcional de uma glândula salivar é um aglomerado de células piramidais conhecida como ácino que secreta sua produção líquida para o interior de um ducto. As glândulas parótidas e submandibulares possuem um sistema de ductos bem desenvolvidos e ramificados. Em outras glândulas, alguns ductos apresentam-se esparsamente distribuídos ou até mesmo ausentes (ROSS, 1993).

Cada glândula maior secreta um produto diferente: a parótida produz secreção serosa, com 25% do volume, a submandibular produz secreção serosa e mucosa, com 60% do volume e a sublingual produz secreção mucosa, com 5% do volume total de saliva (THYLSTRUP, 1988; ROSS, 1993).

Espalhadas pela cavidade bucal as glândulas menores são classificadas como serosas, mucosas e mistas. As glândulas bucais e labiais têm secreção mista; as palatinas têm secreção mucosa; e as linguais têm secreção mista, serosa e mucosa, conforme sua localização (AVERY, 2001).

A saliva é formada em dois estágios: a secreção primária ocorre no ácino e sofre modificações posteriores ao passar pelo ducto (EDGAR, 1992; MARINGONI *et al*, 1991). A que está presente na boca é referida como “saliva total” e, além dos componentes orgânicos e inorgânicos, apresenta células epiteliais descamadas e bactérias (EDGAR, 1992).

Dois componentes são secretados por mecanismos independentes, um componente fluído que inclui íons, produzido por estímulo parassimpático e um componente proteico liberado em resposta a um estímulo simpático (SCULLY, 2003).

A taxa de secreção salivar na boca é determinada taxa de formação de saliva primária nas células acinares, a composição final é influenciada por fatores fisiológicos e depende fortemente do fluxo salivar (EDGAR, 1992; THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001; FEJERSKOV & KIDD, 2005).

1.2.1 Funções da Saliva

A principal função da saliva está relacionada com a manutenção da saúde dos tecidos orais. Um grande número de proteínas salivares tem propriedades antimicrobiais prevenindo infecções e inflamações; estas proteínas também formam película de proteção na superfície dos dentes. Por esta razão a baixa secreção de saliva predispõe o indivíduo a todo tipo de doenças orais tanto na mucosa como nos dentes. A saliva de pessoas idosas saudáveis é suficiente em volume e mantém as propriedades adequadas para a função de proteção (WONG, 2008).

A tabela 1.1 resume as principais funções da saliva.

Tabela 1.1 - Funções da saliva e constituintes envolvidos (adaptado de Wong, 2008)

LOCAL	FUNÇÃO	MOLÉCULAS
Dentes	Tamponamento	Bicarbonato Fosfato Proteínas
	Lubrificação, Viscoelasticidade	Glicoproteína rica em prolina Mucinas
	Remineralização	Proteínas ricas em prolina Estaterina Ca, fosfato
	Inibição da desmineralização	Mucinas
Micro-organismos	Antibacteriana	Mucinas Lisozima Lactoferrina Lactoperoxidase Histatina Aglutinina Cistatina
	Antifúngica	Imunoglobulinas Mucinas Histatinas
	Antiviral	Mucinas Imunoglobulinas Cistatinas
Comida	Digestão	Amilase DNase, RNase Lipase Protease
	Paladar	Zinco
	Bolo	Mucinas

1.2.2 Marcadores Salivares e diagnósticos

Marcadores são parâmetros que servem para indicar um estado de saúde ou doença, como patologias, exposição ao meio ambiente, diagnósticos e resposta a intervenções terapêuticas. Muitos constituintes da saliva vem do sangue por difusão ou transporte ativo fazendo a sua composição ser parecida com a do plasma, podendo refletir o estado fisiológico do organismo incluindo o emocional, o endócrino, o nutricional e as variações metabólicas. Desta forma a saliva é cada vez mais utilizada em pesquisas para desenvolver diagnósticos de doenças ou promover a manutenção da saúde, porque além de ter componentes do sangue, tem a vantagem de ser coletada de forma não invasiva. Alguns componentes presentes em baixas concentrações não são detectáveis pelos métodos atualmente disponíveis, porém estudos são desenvolvidos para aumentar a sensibilidade de testes especialmente no campo dos marcadores proteômicos (SPIELMANN & WONG, 2010).

Em revisão sobre o valor diagnóstico da saliva para doenças orais e sistêmicas, Moura e colaboradores em 2007, afirmam que a saliva é útil na avaliação do risco de cárie, bem como no diagnóstico de outras doenças utilizando métodos sialométricos (fluxo salivar) e sialoquímicos (MOURA *et al*, 2007).

Vários parâmetros mostram correlação com doenças como: níveis salivares de bactérias associado com atividade cariogênica ou com infecção periodontal, ensaio imunológico para *Helicobacter pylori* como indicador de úlcera péptica, marcadores de infecção viral incluindo HIV, hepatites C e B e

herpes, análise do transcriptoma salivar e da flora microbiana associada ao câncer oral, concentração de esteróides como cortisol, estradiol e progesterona para medir a função ovariana, stress e progresso na síndrome de Cushing, níveis de proteína C reativa correlacionada com doença periodontal ou cardíaca e dosagens de variados analitos como por exemplo creatinina para acompanhar a eficácia da diálise renal (WONG, 2008).

1.3 O ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é uma pequena e simples molécula biológica de meia vida curta, apenas alguns segundos, mas que está envolvida em muitos processos fisiológicos que incluem: neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e citotoxicidade. É um gás incolor à temperatura ambiente pouco solúvel em água e solúvel em solventes apolares, característica que facilita a sua passagem através da base lipídica que forma as membranas biológicas levando-o a percorrer distâncias consideráveis a partir da célula que o produz antes da sua inativação. É uma molécula neutra que apresenta um elétron desemparelhado, esta propriedade relevante conduz a busca da estabilização deste elétron na maioria das interações químicas em sistemas biológicos de tal forma que ela é capaz de reagir rapidamente com radicais importantes como oxigênio molecular e superóxidos sendo que, a reação com este último tem como produto o peroxinitrito, um potente oxidante que reage com as bases do DNA. Em solução aquosa o óxido nítrico reage com o oxigênio molecular formando nitrito de acordo com a equação:

(QUEIRÓS & BATISTA, 1999).

1.3.1 Síntese de Óxido Nítrico e Enzimas

A síntese enzimática de óxido nítrico se dá em muitas células de diferentes tecidos através de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases ou NOS. O aminoácido L-arginina juntamente com o oxigênio molecular são os precursores nesta reação que tem como produtos o óxido nítrico e uma molécula de L-citrulina segundo esquema:

(CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002)

Estas enzimas são dependentes de cofatores como flavinas (FAD e FMN), NADPH, Ca^{2+} , calmodulina, tetrahydrobiopterina (BH_4) e grupo heme (MARLETTA, 1993). São conhecidas três formas desta enzima que recebem o nome de isoenzimas, duas são chamadas formas constitutivas (cNOS) e uma forma induzível (iNOS), as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente porém são reguladas de modo diverso por genes de diferentes cromossomos (WANG & MARDSEN, 1995). As formas constitutivas estão presentes nas células do cérebro (isoforma I) e do endotélio dos vasos sanguíneos (isoforma III), estas são expressas constitutivamente de forma habitual. A forma induzível é encontrada principalmente nos macrófagos (isoforma II), alguns autores consideram que qualquer célula do organismo possa produzir esta enzima sob estímulos apropriados. Somente as formas constitutivas são dependentes de cálcio e atuam em processos fisiológicos como neurotransmissões nervosas ou regulação da pressão sanguínea, enquanto a forma induzível se expressa nos macrófagos mediante estímulos como lipopolisacárides bacterianos ou citocinas. Quando induzida a isoforma II é capaz de produzir óxido nítrico por

um longo tempo e em quantidade bem maior se comparada com as isoformas I e III. Assim podemos considerar que estas enzimas possuem duas formas de atuação, de baixo débito relacionadas aos processos homeostáticos, e de alto débito expressando-se mediante indução. (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A tabela 1.2 resume características relevantes das formas enzimáticas da óxido nítrico sintase (MONCADA *et al*, 1991).

Tabela 1.2 - Similaridades e diferenças entre as duas NOS (adaptado de Moncada, Palmer e Higgs, 1991)

CONSTITUTIVA	INDUZÍVEL
Citosólica	Citosólica
NADPH dependente	NADPH dependente
Oxirredutase	Oxirredutase
Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina
Ca ²⁺ /calmodulina dependente	Ca ²⁺ /calmodulina independente
Libera picomoles de NO	Libera nanomoles de NO
Liberção de curta duração	Liberção de longa duração
Não inibida por glicocorticoides	Inibida por glicocorticoides

1.3.2 Outras vias de geração de Óxido Nítrico

Em recente artigo de revisão Hezel e Weitzberg em 2013 ressaltam a via de formação do óxido nítrico partindo de moléculas de nitratos provenientes da dieta tendo a participação direta de bactérias comensais presentes na cavidade oral. As fontes de nitratos da dieta são: vegetais como beterraba, espinafre, alface, couve, carnes industrializadas e água.

Depois de ingeridas estas moléculas são absorvidas no trato digestivo, entram na circulação onde permanecem em níveis elevados no plasma por algumas horas, uma grande parte é excretada pelos rins, outra parte é reabsorvida pelos túbulos renais e bile e uma outra parte (aproximadamente 25%) acaba concentrada nas glândulas salivares e na saliva sendo a glândula parótida a que mais contribui para esta excreção. Uma vez presente na saliva estas moléculas são então reduzidas a nitrito pelas mais de 300 espécies de bactérias residentes na cavidade oral. A enzima nitrato redutase presente nestas bactérias faz a reação de redução normalmente quando a disponibilidade de oxigênio é limitada. Desta forma significativas quantidades de saliva contendo nitrito são continuamente deglutidas alcançando o ambiente ácido do estômago onde uma pequena parte é protonada produzindo óxidos de nitrogênio bioativos (LUNDBERG & WEITZBERG, 2013). A maior parte passa para o intestino onde é absorvido e alcança a circulação sistêmica. No sangue e tecidos existem muitas vias enzimáticas ou não enzimáticas que fazem a redução do nitrito para óxido nítrico e outros intermediários reativos do nitrogênio. As proteínas hemoglobina e mioglobina são exemplos importantes de redutores de nitrito. Assim se estabelece a via nitrato – nitrito – NO, passando obrigatoriamente pela atuação da microflora oral, esta relação simbiótica é importante para a homeostase sistêmica e para funções metabólicas e cardiovasculares (HEZEL & WEITZBERG, 2013).

A Figura 1.1 mostra as vias de geração de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase e a via nitrato – nitrito - NO.

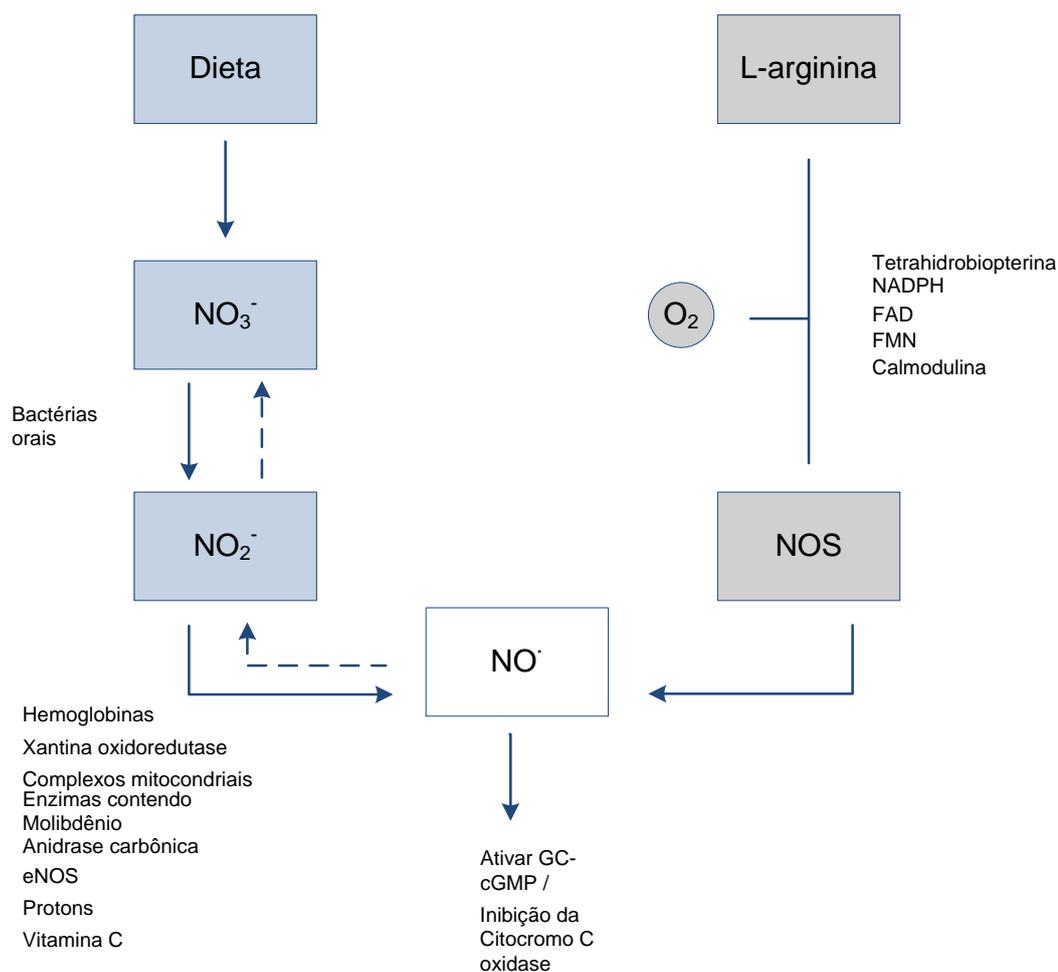


Figura 1.1 - Geração de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase e a via nitrato-nitrito-NO (adaptado de Hezel e Weitzberg, 2013).

1.3.3 Funções do Óxido Nítrico

As principais funções são: fisiológicas como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea e inibição da agregação plaquetária, e imunológicas onde os macrófagos aumentam a produção em resposta a estímulos externos. Como neurotransmissor o óxido nítrico é um mediador que atua em nervos não adrenérgicos e não colinérgicos, além de ser

também um neurotransmissor no cérebro e sistema respiratório (QUEIROZ & BATISTA, 1999). Nos vasos sanguíneos o óxido nítrico causa vasodilatação moderada e constante ao se difundir pela musculatura lisa vascular, se a formação basal diminuir aparecerá vasoconstrição, se aumentar haverá vasodilatação comprometendo a homeostase. No sistema circulatório o óxido nítrico apresenta atividade antitrombótica resultante da inibição da agregação plaquetária sendo que a sua diminuição resulta em formação de trombos (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

No sistema imunológico as células conhecidas como macrófagos, quando estimuladas, elevam a produção de óxido nítrico. Esta ativação acontece na presença de citocinas que são moléculas liberadas por alguns tipos de linfócitos diante de processos infecciosos ou tumores (VESPA & SILVA, 1994). Uma vez ativado os macrófagos são capazes de sintetizar e liberar grande quantidade de óxido nítrico (nmoles) por longos períodos O efeito citotóxico desta molécula tem sido descrito pela sua ligação com o Fe, seu alvo molecular, presente no grupamento prostético de enzimas que operam na replicação do DNA, no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons (VESPA & SILVA, 1994; KRONCKE, 2003).

O óxido nítrico tem importante efeito sobre células do tecido ósseo. Suas ações são relevantes nas doenças como osteoporose ou doenças inflamatórias como a artrite reumatoide as quais são caracterizadas pelo aumento da sua produção ativado por citocinas; altos níveis inibem a reabsorção e formação deste tecido. Por outro lado ele é apontado como mediador nos efeitos do estrógeno sobre os ossos (VAN'T HOF & RALSTON, 2001).

1.3.4 Saliva e Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um marcador bioquímico que pode indicar a extensão de doenças inflamatórias como gengivite e periodontite quando seus níveis são medidos na saliva porque tem correlação positiva e direta com estes processos e é um bom indicador do status desta doença. (SHARMA *et al*, 2003). Em altas concentrações ele age como molécula citotóxica contra células infectadas por fungos, bactérias e protozoários, mas também pode resultar na destruição dos tecidos adjacentes à sua produção como o osso alveolar (KOSHTI & KOHAD, 2004; REHER *et al*, 2007). A placa dentária também causa um estímulo na expressão das enzimas óxido nítrico sintases das células gengivais as quais podem ser induzidas por proliferação bacteriana ou indiretamente por aumento na produção de citocinas levando ao aumento na produção de óxido nítrico. Por último este gás tem se mostrado ser um ativador da enzima ciclo oxigenase (COX) que leva a uma produção de prostaglandinas, substâncias conhecidas como mediadores em processos inflamatórios que também interagem com citocinas e promovem o progresso de doenças inflamatórias do periodonto. Observou-se que o tratamento das doenças periodontais provocou a queda no nível de produção de óxido nítrico (PARWANI *et al*, 2012).

Considera-se também que a incidência de cárie é menor em indivíduos com maiores níveis de óxido nítrico salivares (HEGDE, 2008).

1.4 O CORTISOL

Cortisol é um hormônio esteroide, um glicocorticoide, produzido pela córtex da glândula adrenal que é liberado em resposta ao stress ou a baixos níveis de glicocorticoides no sangue. Estímulos como dor, medo, infecção, hemorragia, hipoglicemia e outros provocam a ativação do hipotálamo que por sua vez estimula a hipófise liberando o hormônio adrenocorticotrópico que por sua vez estimula a glândula adrenal a liberar o hormônio cortisol. Este age no fígado, no tecido adiposo e nos músculos para suprir o organismo com combustível necessário na situação estressante. É um hormônio de ação lenta que altera o metabolismo pela mudança nos tipos e quantidades de determinadas enzimas sintetizadas em suas células alvo. No fígado ele promove a gliconeogênese (síntese de glicose); efeito semelhante ao do hormônio glucagon e contrário ao do hormônio insulina. A glicose assim produzida pode ser armazenada ou exportada para os tecidos onde serve de combustível. No tecido adiposo o cortisol aumenta a liberação de ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis armazenados que também serve como combustível, e nos músculos ele estimula a degradação de proteínas e a exportação de aminoácidos para o fígado onde servem de precursores na gliconeogênese. Em períodos prolongados de estresse, a liberação constante de cortisol perde o valor adaptativo positivo e começa a causar danos ao músculo, prejudicando as funções endócrina e imunológica (NELSON & COX, 2011).

A Figura 1.2 mostra a cascata de liberação do cortisol.

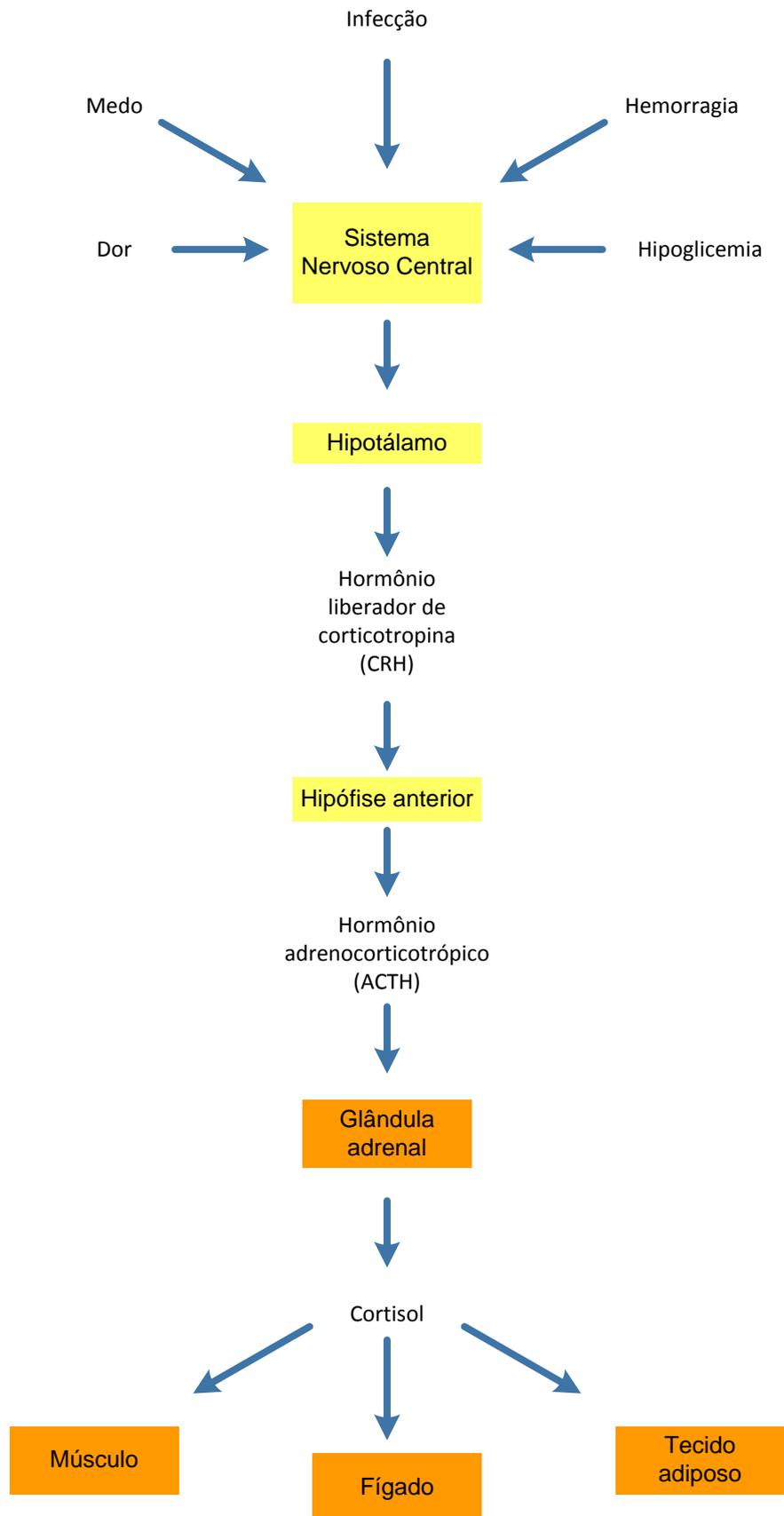


Figura 1.2 - Cascata de liberação de cortisol a partir da estimulação do hipotálamo pelo SNC
(adaptado de Nelson e Cox 2011)

1.4.1 Cortisol Salivar e Stress Fisiológico

A dosagem de cortisol na saliva tornou-se importante desde os anos 1980 para auxiliar em diagnósticos de síndrome de Cushing, insuficiência adrenal e acompanhamento de tratamentos com medicamentos do tipo hidrocortisona. Medidas do cortisol salivar tem sido extensivamente utilizada como biomarcador de stress em trabalhos de pesquisas especialmente o stress fisiológico. Na saliva este hormônio se encontra livre ao contrário do sangue onde ele se liga a proteínas, existe também uma correlação direta entre os níveis nestes dois fluídos biológicos (WARRICK *et al*, 2012).

Entende-se como stress fisiológico a percepção de uma dificuldade ou incapacidade para dominar certas demandas que se desdobra em situações de ansiedade, preocupação, irritabilidade e outras. Estas condições designam sintomas divergentes como dores, nervosismo, agitação, mau humor, falta de concentração e batimentos cardíacos alterados. Os índices fisiológicos de stress são difíceis de se avaliar, por isso as dosagens de cortisol salivar como detecção da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é considerada de grande valor. Níveis elevados de hormônios esteroides podem produzir entre outras enfermidades, a supressão do sistema imunológico que é um dos efeitos do cortisol, pessoas em situações estressantes tem mais probabilidade de sofrer doenças infecciosas ou demora na cicatrização de feridas, bem como tem aumento na pressão arterial e frequência cardíaca; nesta situação é comum a redução do efeito de fármacos como anestésicos e o aumento da percepção da dor. (AGUILAR CORDEIRO *et al*, 2014).

1.5 OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

O trabalho tem como propósitos quantificar os níveis salivares de óxido nítrico e cortisol em pacientes usuários de próteses totais avaliados em períodos anterior e após a instalação, estudar os níveis de adaptação e traumatismo e verificar a variação dos valores de pH, volume, fluxo e viscosidade salivares durante o período adaptativo.

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São destacados os seguintes objetivos específicos:

- ◆ Avaliar a variação nos níveis de óxido nítrico salivar antes da instalação e durante o período de adaptação funcional.
- ◆ Avaliar a variação nos níveis de cortisol salivar durante o período de adaptação funcional.
- ◆ Examinar os níveis de traumatismo causados pela instalação e correlacionar com a produção de óxido nítrico e cortisol.
- ◆ Medir a variação nos parâmetros: pH, volume, fluxo e viscosidade salivares durante o período de adaptação e correlacionar com a produção de óxido nítrico.

1.7 HIPÓTESES

- ◆ Indivíduos estão predispostos a alterações nos níveis de concentração de óxido nítrico salivar decorrente do uso de próteses totais;
- ◆ Indivíduos estão predispostos a alterações nos níveis de concentração de cortisol salivar decorrente do uso de próteses totais;
- ◆ O período de adaptação funcional envolve alterações transitórias nos parâmetros físicos: pH, volume, fluxo e viscosidade da saliva;
- ◆ A presença de trauma na mucosa de suporte das próteses altera as condições bioquímicas da saliva dos pacientes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada obedecendo as etapas descritas abaixo:

- ◆ Seleção de pacientes para o tratamento protético;
- ◆ Coleta de informações clínicas;
- ◆ Coleta e armazenamento da saliva;
- ◆ Dosagem das concentrações de óxido nítrico e cortisol nas amostras;
- ◆ Análise estatística dos dados obtidos.

Este estudo foi delineado como observacional de corte. Inicialmente foi realizada a seleção dos indivíduos para participar da pesquisa, sendo a população alvo constituída por pessoas de ambos os sexos, desdentados totais, com necessidade de instalação de próteses novas ou substituição de próteses antigas. Os participantes foram selecionados dentre aqueles encaminhados pelas sete unidades que compõem a Rede Municipal de Saúde de Goiânia (Campinas, Leste, Noroeste, Norte, Oeste, Sudoeste, Sul) e por profissionais da rede municipal que atuam no programa Estratégia de Saúde da Família.

2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para fazer parte da amostra, os indivíduos tiveram que corresponder aos seguintes critérios de inclusão: ser desdentado total, ter necessidade de reabilitação com prótese total convencional ou de substituição de prótese

antiga, apresentar bom estado de saúde e ter disponibilidade para participar da pesquisa.

Os critérios de exclusão foram: existência de alterações locais que pudessem influenciar diretamente na estabilidade, retenção e adaptação das próteses tais como: deformações anatômicas dos maxilares, alterações da mucosa causada por fungos, bactérias ou tumores, xerostomia absoluta, doenças sistêmicas psicológicas ou neurológicas que dificultassem a compreensão ou locomoção do participante para atendimento e/ou acompanhamento clínico em todas as etapas, alcoolismo ou outros distúrbios do comportamento que pudessem comprometer a participação e opção por outras modalidades de tratamento.

2.2 ABORDAGEM DE ASPECTOS ÉTICOS ENVOLVIDOS NA PESQUISA

Seguindo as normas e preceitos éticos relativos a pesquisas que envolvam seres humanos, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás com o número de protocolo: 020/13 CEP UFG (Anexo III). Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com linguagem acessível à compreensão. As dúvidas relacionadas à participação ou aos preceitos do estudo foram sanadas após a leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I). O convidado que confirmou sua participação assinou o TCLE que foi disponibilizado em duas vias, uma via foi arquivada junto aos demais documentos da pesquisa e a outra ficou com o participante. Foi assegurada aos convidados total

liberdade de escolha quanto à participação ou não na pesquisa bem como foi garantido o sigilo sobre seus dados pessoais. Os participantes não tiveram que arcar com custos de ordem profissional ou material referentes ao tratamento realizado e não receberam pagamento por sua participação. Em casos de dificuldades de adaptação ao tratamento, surgimento de leves traumas na mucosa ou algum outro inconveniente, foram tomadas todas as medidas necessárias para solucionar as ocorrências. O participante teve o direito de retirar o TCLE e se excluir do grupo a qualquer momento.

2.2.1 Confidencialidade dos Dados

Foram tomados todos os cuidados para não se identificar os participantes garantindo a privacidade e confidencialidade de seus dados e informações prestadas, os quais foram utilizados apenas para fins da pesquisa. Após a conclusão as fichas foram arquivadas e o material gráfico produzido com os dados coletados foi picotado e encaminhado à reciclagem. O estudo foi realizado em tempo hábil para cumprir o cronograma proposto encerrando-se após a conclusão das atividades previstas.

2.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA PRELIMINAR

Nesta etapa foi realizado um exame clínico oral preliminar com finalidade de avaliar se as condições bucais estavam condizentes com os critérios da pesquisa e se as próteses que estavam utilizando tinham real necessidade de substituição. Foi preenchida uma ficha clínica de avaliação protética da Faculdade de Odontologia da UFG para cada um dos participantes. Na sequência eles foram submetidos a exame físico e a

anamnese onde informações mais detalhadas sobre o histórico médico, odontológico e familiar, bem como hábitos e dados sócio-demográfico foram coletadas. Os dados obtidos nesta sessão foram anotados em ficha clínica específica. Os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão e não possuíam nenhum dos critérios de exclusão foram considerados aptos a participar da pesquisa. O total de participantes somou 19 indivíduos.

2.3.1 Períodos de Avaliação

Os participantes foram avaliados em relação a todos os desfechos clínicos e a coleta de saliva foi feita em diferentes períodos, no dia da instalação, nas consultas de retorno subsequentes e no retorno a longo prazo que variou de 1 a 12 meses.

2.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis analisadas foram classificadas em variáveis de desfecho (dependentes) e variáveis preditoras (independentes). As variáveis de desfecho foram:

- ◆ Alterações na concentração de óxido nítrico.
- ◆ Alterações na concentração de cortisol.
- ◆ Alterações nos parâmetros físicos: pH, volume, fluxo e viscosidade.

As variáveis preditoras foram:

- ◆ Níveis de adaptação funcional dos pacientes às próteses;
- ◆ Presença de áreas de traumatismo após a instalação das próteses;

- ◆ Tempo decorrido durante o período de adaptação funcional.

2.5 PROTOCOLO DE CONFECÇÃO DAS PRÓTESES

O protocolo para confecção de próteses totais seguiu os procedimentos convencionais incluindo: moldagem preliminar com hidrocolóide irreversível, confecção de moldeira individual, moldagem funcional com polissulfeto, confecção de planos de orientação, registro interoclusal e montagem simplificada em articulador semiajustável, montagem de dentes, provas clínicas e instalação. Todas as próteses totais foram acrilizadas através da técnica de microondas, utilizando apenas uma marca de resina acrílica e respeitando a orientação do fabricante quanto ao ciclo de polimerização indicado. Um único laboratório foi contratado para realizar a fase laboratorial da confecção das próteses.

2.6 COLETA, OBTENÇÃO DO VOLUME E ARMAZENAMENTO DA SALIVA

Para a coleta foi confeccionado um kit contendo um pedaço de algodão (aproximadamente meia bola) e um eppendorf de capacidade de 1,5 mL dentro de papel cirúrgico, lacrado e esterilizado, conforme mostra a Figura 2.1. Utilizou-se ainda uma seringa descartável de 5 mL. Para efetuar a coleta o algodão foi colocado embaixo da língua do paciente por um tempo de 4 minutos, depois foi retirado, colocado na seringa e comprimido com o êmbolo, a saliva foi recolhida no eppendorf e o volume obtido foi registrado. Quando a quantidade adquirida não chegou a 1.5 mL, outro pedaço de

algodão foi colocado sob a língua e o procedimento repetido sem contar o tempo para completar o volume necessário. As amostras coletadas foram mantidas no gelo até chegarem ao laboratório onde foram centrifugadas durante 4 minutos a 8000 rpm, divididas em alíquotas de 500 µL e armazenadas em freezer a -20 graus centígrados.



Figura 2.1 - Kit utilizado na coleta de saliva

2.7 TESTE DE INSPEÇÃO VISUAL PARA VERIFICAÇÃO DO FLUXO SALIVAR NÃO ESTIMULADO

Para a realização deste teste o paciente permaneceu sentado sob iluminação satisfatória, a mucosa labial inferior foi completamente secada com o uso de ar e observado o tempo de formação de gotículas de saliva em orifícios das glândulas salivares menores. Quando este tempo foi maior que

60 segundos, o fluxo salivar foi considerado baixo, entre 30 e 60 segundos, o fluxo salivar foi considerado normal e menor que 30 segundos o fluxo salivar foi considerado alto.

2.8 TESTE DE VISCOSIDADE DA SALIVA

Nesta verificação a avaliação foi visual. Com o uso de uma luva foi tomada uma pequena quantidade de saliva no dedo indicador e observado entre os dedos indicador e polegar a viscosidade salivar da seguinte forma:

- ◆ Resíduo grosso e pegajoso indicou viscosidade incrementada;
- ◆ Resíduo aguado e transparente indicou viscosidade normal.

2.9 TESTE DE MEDIDA DO PH

Foram utilizadas tiras indicadoras de pH da marca Fusion para fazer esta medida. Uma tira indicadora foi colocada embaixo da língua do paciente fazendo ter contato com a saliva durante aproximadamente 10 segundos, sendo então removida, o excesso de líquido retirado e a cor produzida na tira foi comparada com a grade de cores da embalagem. A cor mais próxima indicou o pH salivar.

2.10 NÍVEL DE ADAPTAÇÃO FUNCIONAL

Nas consultas subsequentes à instalação das próteses o paciente relatou sua adaptabilidade ao uso das mesmas e estabeleceu-se a seguinte escala:

- ◆ Quando não houve queixas e houve utilização contínua da prótese, a adaptação foi considerada sem queixas.
- ◆ Quando o relato foi de queixas mínimas e houve utilização contínua da prótese, a adaptação foi favorável.
- ◆ Quando o relato foi de queixas moderadas e houve utilização intermitente da prótese, a adaptação foi com alguma dificuldade.
- ◆ Quando o relato foi de queixas severas e houve utilização episódica ou não utilização da prótese, a adaptação foi com extrema dificuldade.

2.11 NÍVEL DE TRAUMATISMO APÓS INSTALAÇÃO

No exame clínico feito durante as consultas de retorno foram verificadas as áreas de traumatismo conforme a seguinte escala:

- ◆ Sem área de traumatismo e sem queixas: traumatismo ausente sem queixas.
- ◆ Sem área de traumatismo com queixas: traumatismo ausente com queixas.
- ◆ Com 1 a 2 pequenos pontos ou áreas de traumatismo evidenciados visualmente ou por pressão digital ou ainda por teste de compressão com a prótese que não impediram a sua utilização: traumatismo leve.
- ◆ Com múltiplos pontos ou áreas evidenciados visualmente ou por pressão digital ou ainda por teste de compressão com a prótese que impediram a sua utilização: traumatismo severo.

2.12 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A dosagem da concentração de óxido nítrico foi feita utilizando-se o kit *Molecular Probes - G – 7921* seguindo as instruções do fabricante. Esta dosagem se baseia na reação de Griess onde a medida realizada é a concentração de nitrito uma vez que o óxido nítrico é muito instável e logo se transforma em nitrito. O reagente é composto por uma mistura de sulfanilamida a 2% e de naftiletlenodiamino bicloridrato a 0.2% em ácido fosfórico a 5%. O nitrito é detectado pela formação de um composto de cor púrpura, resultante do sal diazônico formado pela reação do nitrito com a sulfanilamida.

As amostras foram transferidas em duplicata para uma placa do tipo ELISA de 96 poços. Para cada dosagem utilizou-se uma mistura de: 20µL do reagente de Griess (resultante da mistura em igual volume dos componentes A e B do kit), 150µL de saliva e 130µL de água deionizada incubando-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (GREEN et al. 1982). A leitura foi feita em um leitor de microplacas ELX 800- Bio-Tek a 548 nm (Figura 2.2). Os pontos para a construção da curva de calibração foram feitos em triplicata utilizando-se concentrações de nitrito que variaram de 5 a 150 µM sendo que para cada placa analisada uma nova curva foi construída.



Figura 2.2 - Leitor de microplacas ELX 800

2.13 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi feita preparando-se soluções de nitrito com as concentrações: 5, 10, 50, 100 e 150 μM . Estas concentrações foram obtidas por diluições da solução padrão de nitrito, presente como componente C do kit, em água deionizada. A curva padrão foi construída com os valores de absorbância obtidos e a concentração de nitrito foi determinada segundo a equação gerada.

A tabela 2.1 e a figura 2.3 mostram os dados obtidos e uma curva padrão construída.

Tabela 2.1 - Dados obtidos para construção da curva padrão na dosagem de nitrito

Concentração (μM)		ABS		MÉDIA	DESVIO
5	0,059	0,055	0,059	0,057667	0,002309
10	0,094	0,116	0,113	0,107667	0,01193
50	0,504	0,462	0,438	0,468	0,033407
100	0,905	0,929	0,892	0,908667	0,018771
150	1,277	1,305	1,204	1,262	0,052144

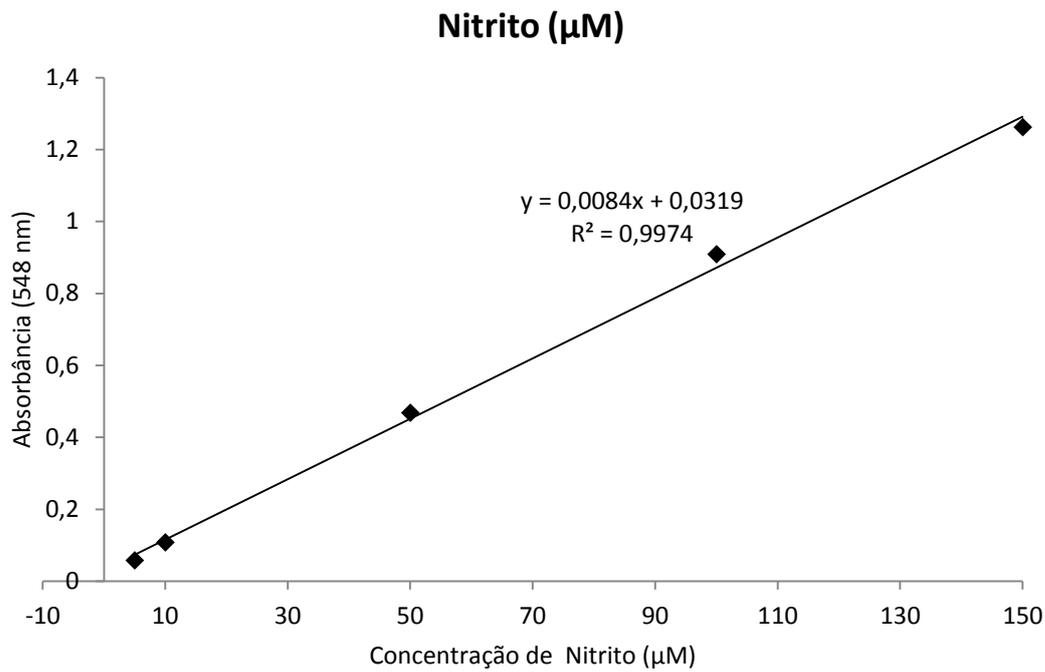


Figura 2.3 - Curva padrão para cálculo da concentração de nitrito

A Figura 2.4 mostra a placa de ELISA com a reação de Griess.

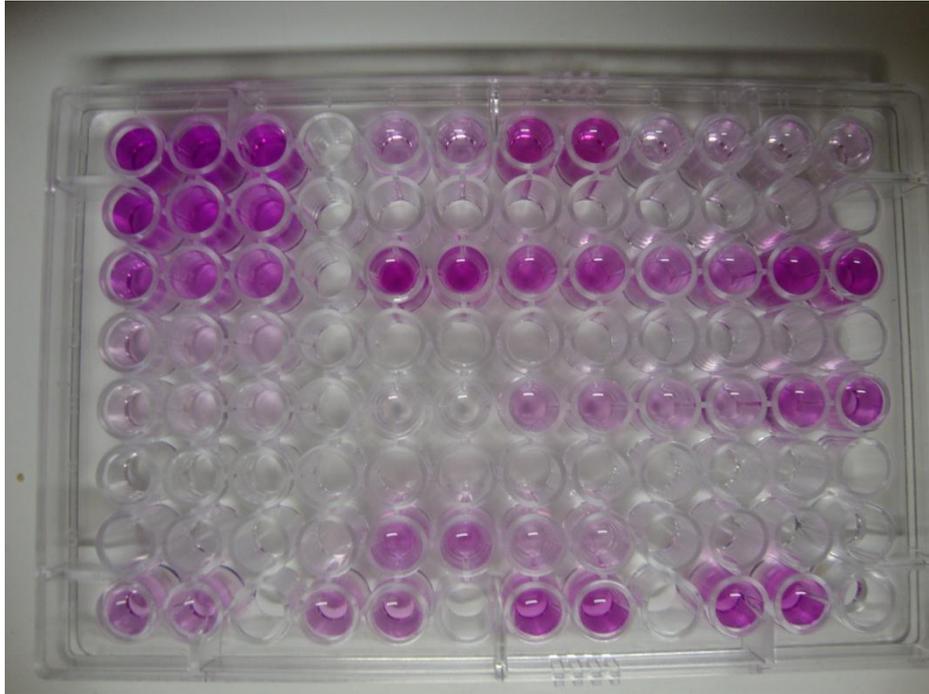


Figura 2.4 - Reação de Griess em placa do tipo ELISA para dosagem da concentração de nitrito

2.14 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL

A dosagem da concentração de cortisol salivar foi feita utilizando-se o kit enzimático No. 1-3002 (*single*) *Salimetrics* seguindo as instruções do fabricante. A placa presente no kit é revestida com anticorpo monoclonal para cortisol. As amostras foram descongeladas, centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm e mantidas a temperatura ambiente (25 graus) durante o ensaio assim como todos os reagentes utilizados. Foi diluído 10 vezes o tampão de lavagem a partir do concentrado presente no kit na quantidade necessária.

O cortisol a ser analisado, tanto o conhecido (padrões) como o desconhecido (amostras), bem como os controles foram pipetados em duplicata nos devidos poços na quantidade de 25 μ L. Foi colocado 25 μ L de diluente em dois poços para servir de valor zero assim como nos poços NSB

(*non specific binding wells*), estes poços são utilizados para normalização das leituras e não contem o anticorpo para cortisol. Foi feita uma diluição 1:1600 do conjugado, que é formado pela enzima HRP (*horseradish peroxidase*) ligada ao cortisol, com o diluente na quantidade necessária e em seguida distribuído nos poços utilizando uma pipeta multicanal. A placa ficou 5 minutos em um agitador a 500 rpm, e 55 minutos em incubação a temperatura ambiente. Durante a incubação ocorre uma competição entre o cortisol a ser dosado e o cortisol ligado na enzima pelo sítio do anticorpo.

Na sequência a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem, cada poço recebeu 300 μL de tampão em cada lavagem, depois foi colocado 200 μL de solução de tetra-metil benzidina (TMB), o substrato da enzima, após 5 minutos no agitador a reação que produziu cor azul, foi interrompida com o acréscimo de 50 μL da solução de ácido sulfúrico 3 molar produzindo cor amarela. A leitura foi feita após 10 minutos em leitor de microplaca *Spectramax (Molecular Devices)*, a 450 nm (Figura 2.5).

A quantidade de cortisol conjugado a peroxidase detectada é medida pela intensidade da cor e é inversamente proporcional a quantidade de cortisol presente na amostra. Uma curva padrão foi construída com os valores de absorvância dos padrões com $R= 0,9717$ (Figura 2.6 e Tabela 2.2), e a concentração de cortisol em cada amostra foi determinada segundo a equação gerada.



Figura 2.5 - Leitor de microplacas *Spectramax*

Tabela 2.2 - Dados obtidos para construção da curva padrão na dosagem de cortisol

Cortisol ug/dL	B/Bo
3	0,117918
1	0,272508
0,333	0,542819
0,111	0,777119
0,037	0,914141
0,012	0,99473

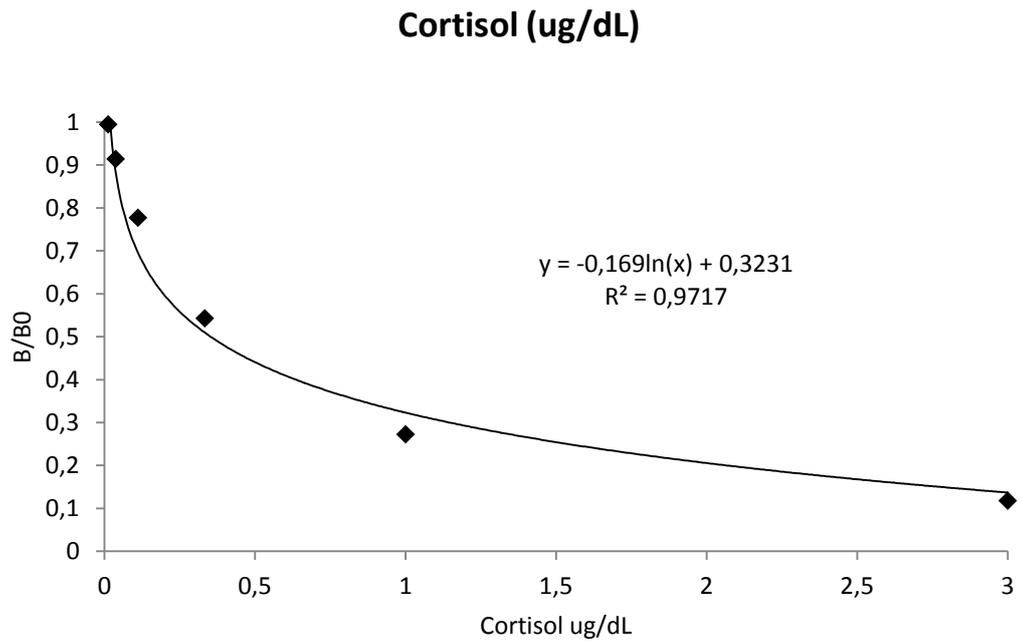


Figura 2.6 - Curva padrão para cálculo da concentração de cortisol

A Figura 2.7 a mostra a placa de ELISA com a reação de dosagem da concentração de cortisol.

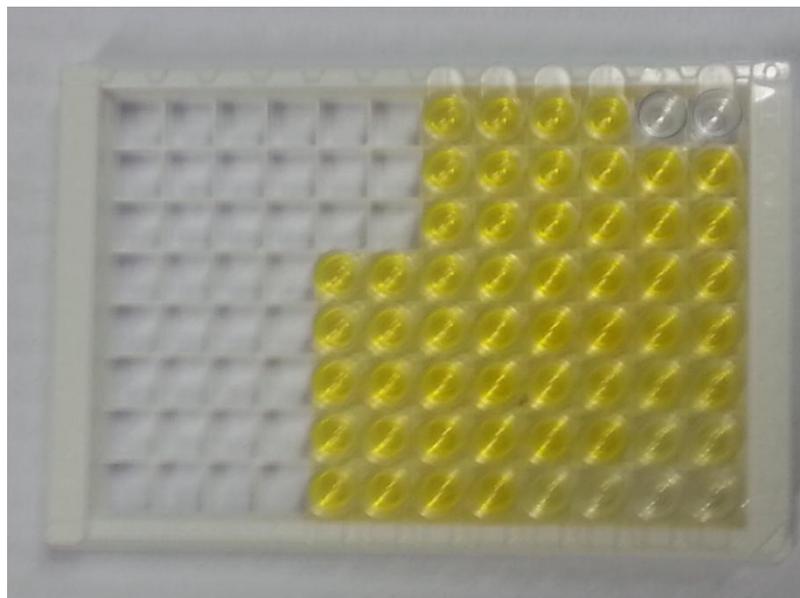


Figura 2.7 - Reação Enzimática em placa de ELISA para dosagem da concentração de cortisol

2.15 ANÁLISE DE DADOS

Foi realizada análise estatística descritiva para representação das medidas de resumos das variáveis mensuradas. Testes não paramétricos (Testes de Friedman, Wilcoxon, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) foram utilizados para comparação entre grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando apresentaram nível de significância de 5%. Foi utilizado o pacote estatístico SPSS for Windows – versão 20.0 para análise dos dados.

3 RESULTADOS

Foram incluídos 19 pacientes desdentados totais tratados com próteses convencionais. A idade variou entre 52 e 76 anos (média=64,4; DP=8,3 anos), sendo 14 (73,7%) do sexo feminino. A avaliação do fluxo salivar mostrou que 4 pacientes (21,1%) apresentavam fluxo salivar baixo, 8 (42,1%) fluxo salivar normal e 7 (36,8%) fluxo salivar alto. Foram coletadas um total de 76 amostras de saliva distribuídas nos diferentes períodos de adaptação das próteses. A Tabela 3.1 mostra as características das amostras de saliva (viscosidade, pH e volume).

Tabela 3.1 - Características físicas das amostras de saliva coletadas

Viscosidade – n (%)	Aguado e transparente	17 (89,5)
	Grossa e pegajosa	2 (10,5)
pH	Valores mín – máx (amostra)	5,0 – 7,0
	Valores mín – máx (media por paciente)	5,32 – 5,91
	Média (DP)	5,62 (0,17)
Volume (ml)	Valores mín – máx (amostra)	0,0 – 1,5
	Valores mín – máx (media por paciente)	0,29 – 0,86
	Média (DP)	0,60 (0,19)

A Tabela 3.2 mostra a distribuição de frequência dos escores referentes ao nível de adaptação funcional após a instalação das próteses e retornos subsequentes. As dificuldades de adaptação funcional foram progressivamente diminuídas nas sessões de retorno ($p < 0,001$), levando à adaptação sem queixas ou favorável no retorno de longo prazo. A mesma

condição foi observada em relação aos escores de áreas de traumatismo após a instalação das próteses, conforme mostra a Tabela 3.3 ($p < 0,001$).

Tabela 3.2 - Frequência dos níveis de adaptação de acordo com relato do paciente nos períodos de retorno após instalação das próteses (percentagem entre parêntesis)

Nível de adaptação	1º retorno	2º retorno	3º retorno	4º retorno	p-valor*
Sem queixa (escore 0)	2 (10,5)	1 (5,3)	11 (57,9)	11 (57,9)	
Adaptação favorável (escore 1)	7 (36,8)	13 (68,4)	7 (36,8)	8 (42,1)	
Alguma dificuldade (escore 2)	9 (47,4)	5 (26,3)	1 (5,3)	–	
Extrema dificuldade (escore 3)	1 (5,3)	–	–	–	
Média (mediana)	1,47 (2,0)	1,21 (1,0)	0,47 (0,0)	0,42 (0,0)	< 0,001
Posto médio	3,34	3,00	1,79	1,87	

* Teste de Friedman

Tabela 3.3 - Frequência da presença de pontos de traumatismo nas sessões de retorno após instalação das próteses (percentagem entre parêntesis)

Pontos de traumatismo	1º retorno	2º retorno	3º retorno	4º retorno	p-valor*
Sem traumatismo / sem queixas (escore 0)	1 (5,3)	2 (10,5)	11 (57,9)	11 (57,9)	
Sem traumatismo / com queixas (escore 1)	2 (10,5)	3 (15,8)	6 (31,6)	7 (36,8)	
1 a 2 pequenos pontos de traumatismo (escore 2)	14 (73,7)	12 (63,2)	2 (10,5)	1 (5,3)	
Múltiplos pontos de traumatismo (escore 3)	2 (10,5)	2 (10,5)	–	–	
Média (mediana)	1,89 (2,0)	1,74 (2,0)	0,53 (0,0)	0,47 (0,0)	< 0,001
Posto médio	3,45	3,21	1,66	1,68	

* Teste de Friedman

3.1 CONCENTRAÇÃO DE NITRITO SALIVAR

A Tabela 3.4 mostra o resumo da concentração de nitrito salivar por paciente considerando quatro diferentes períodos de avaliação: instalação, retornos do período adaptativo (1º e 2º) e pós adaptativo (3º retorno).

Tabela 3.4 - Estatística descritiva das concentrações de nitrito salivar de acordo com o paciente individualmente

Paciente	Média (DP)	Mínimo – Máximo	Mediana
1	19,03 (12,6)	6,64 – 35,2	17,14
2	24,35 (17,6)	0 – 39,49	28,95
3	24,78 (17,5)	2,41 – 44,45	26,12
4	27,09 (16,0)	8,7 – 41,51	29,065
5	31,09 (22,9)	0 – 55,2	34,58
6	31,71 (15,9)	9,4 – 46,71	35,37
7	33,29 (27,0)	0 – 65,29	33,93
8	36,03 (24,3)	6,76 – 65,29	36,025
9	38,20 (28,1)	6,76 – 74,85	35,6
10	38,69 (32,7)	2,41 – 75,55	38,41
11	38,71 (14,7)	24,33 – 58,66	35,93
12	43,04 (16,9)	24,33 – 65,29	41,26
13	43,15 (21,9)	24,33 – 65,29	41,495
14	54,61 (51,1)	11,83 – 124,33	41,13
15	67,86 (17,4)	46,71 – 84,95	69,88
16	74,45 (68,6)	9,4 – 167,37	60,515
17	101,03 (60,6)	39,49 – 182,04	91,295
18	113,04 (55,1)	45,29 – 175,2	115,84
19	123,77 (37,9)	90,2 – 173,2	115,84

A Figura 3.1 mostra a distribuição de frequência dos valores da concentração de nitrito salivar no total de amostras analisadas (n=76). A concentração média foi de 50,4 (DP=37,5), sendo a mediana de 39,5 e os valores variando de 0,0 a 182,04.

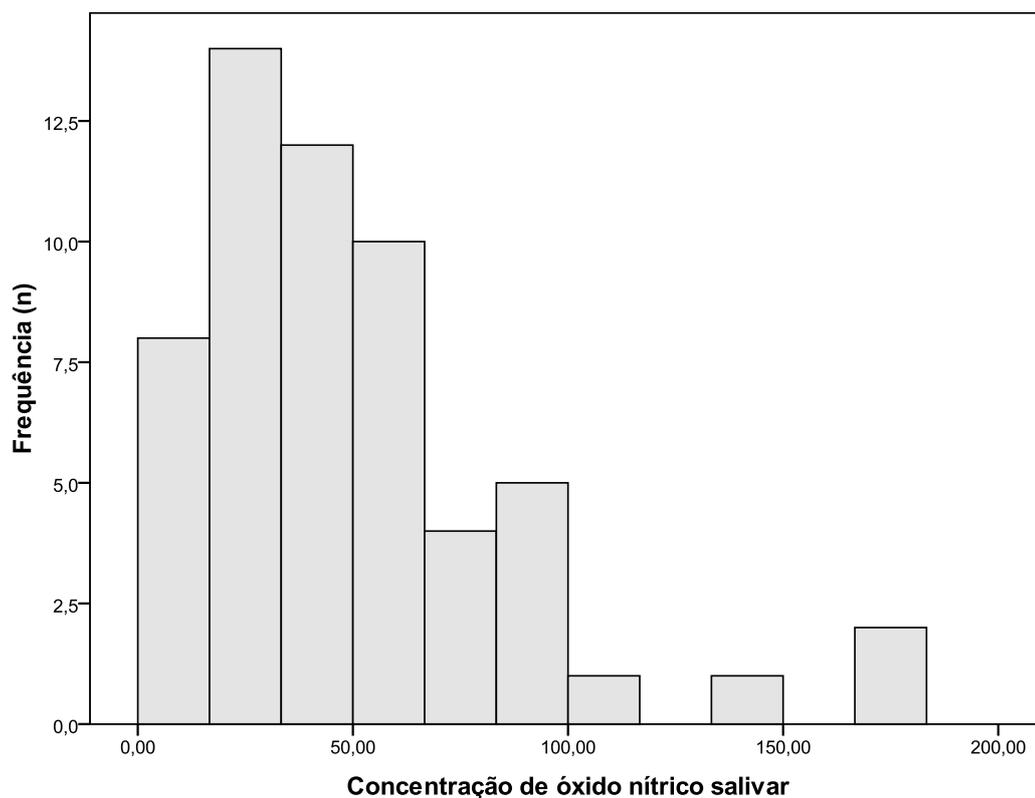


Figura 3.1 - Distribuição de frequência dos valores da concentração de nitrito salivar (n=76)

A Tabela 3.5 e as Figuras 3.2 e 3.3 mostram os valores de concentração de nitrito salivar nos diferentes períodos de avaliação. Houve diferença significativa na concentração de nitrito entre os períodos avaliados (Teste de Friedman: $p=0,053$), sendo que na comparação aos pares (teste de Wilcoxon) houve diferença significativa entre os retornos 2 e 3 ($p=0,028$).

Tabela 3.5 - Estatística descritiva das concentrações de nitrito salivar de acordo com os períodos avaliados: instalação, adaptação e pós adaptativo às próteses

Período	Média (EP)	IC 95%	Mediana
Instalação	36,44 (14,86)	3,32 – 69,56	8,7
Retorno 1	18,63 (5,70)	5,92 – 31,34	14,89
Retorno 2	21,05 (6,46)	6,67 – 35,43	18,64
Retorno 3	38,71 (12,02)	11,93 – 65,49	22,45

Comparação entre os pares (Wilcoxon Signed Ranks Test):

Instalação x Retorno 1	p = 0,272
Instalação x Retorno 2	p = 0,480
Instalação x Retorno 3	p = 0,433
Retorno 1 x Retorno 2	p = 0,875
Retorno 1 x Retorno 3	p = 0,062
Retorno 2 x Retorno 3	p = 0,028

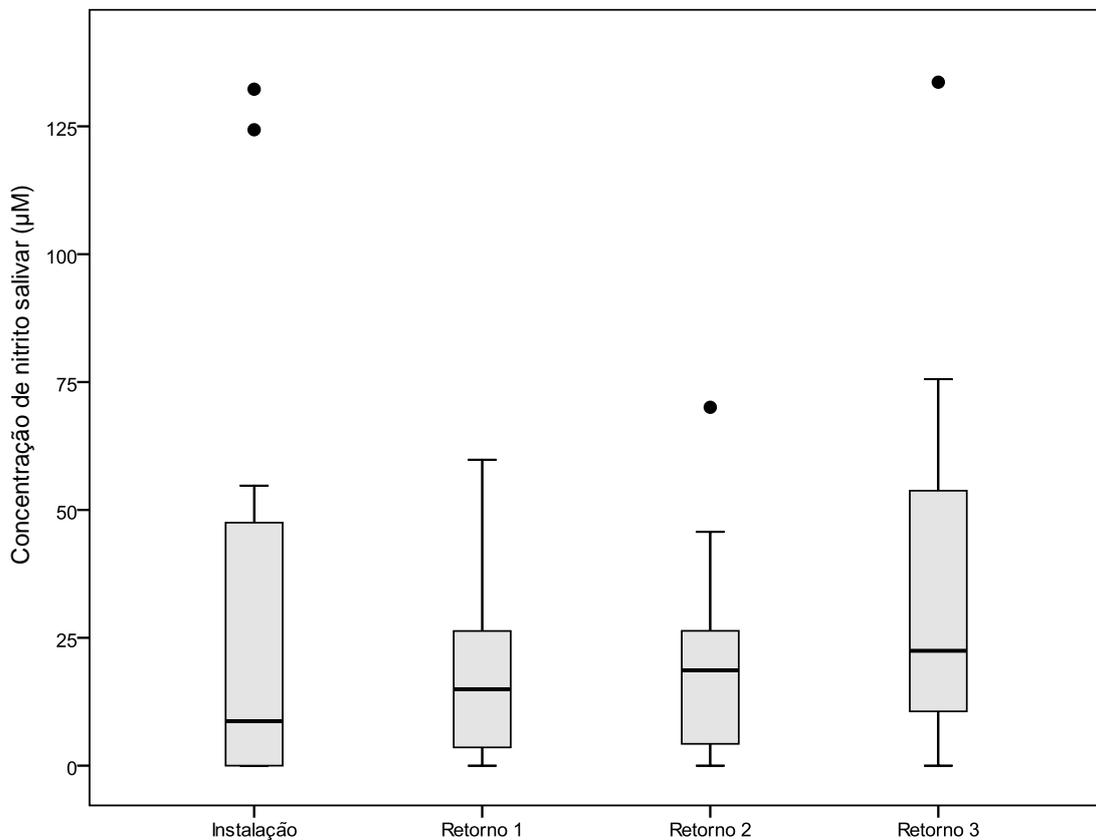


Figura 3.2 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os períodos de avaliação

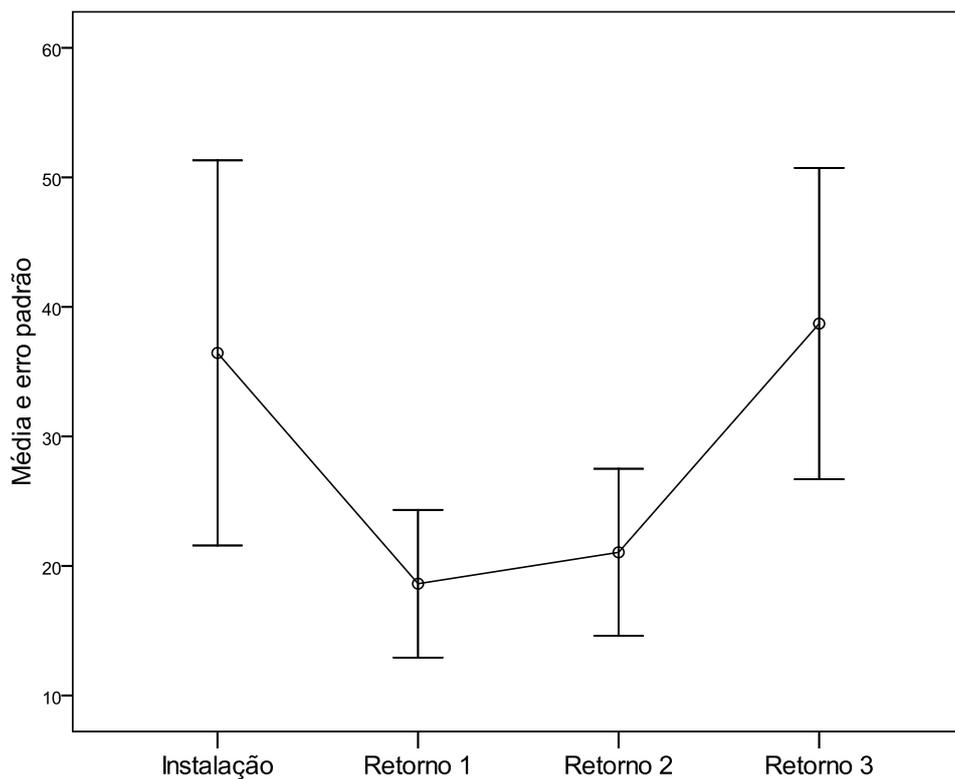


Figura 3.3 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os períodos de avaliação

A variação nas concentrações de nitrito não foi influenciada pelo nível de adaptação funcional (teste de Kruskal-Wallis $p=0,555$), presença de áreas de traumatismo (teste de Kruskal-Wallis $p=0,949$), nível do fluxo salivar (teste de Kruskal-Wallis $p=0,729$) e viscosidade da saliva (teste de Mann-Whitney $p=0,289$), conforme pode ser visualizado nas Figuras 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7.

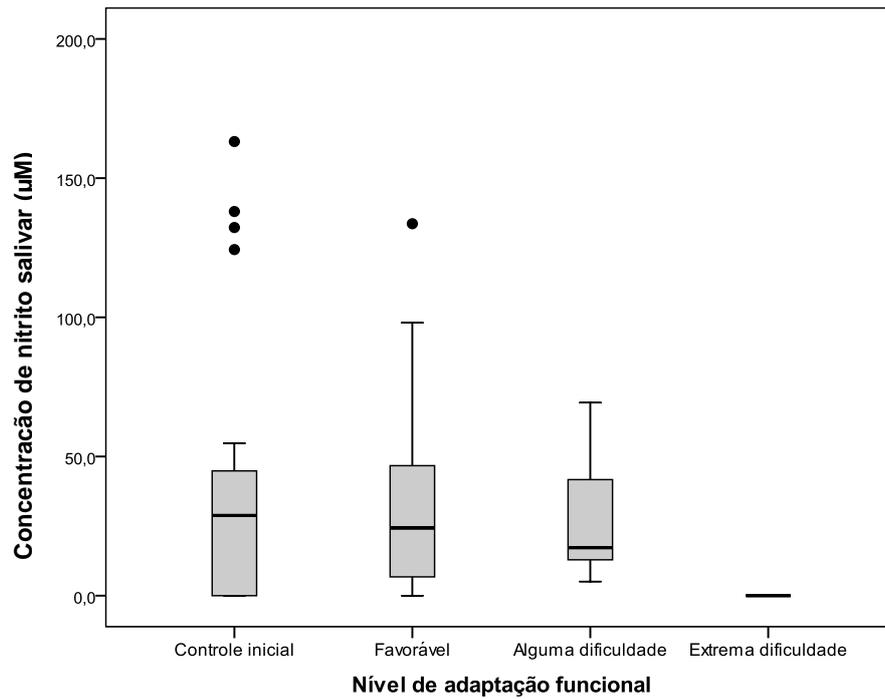


Figura 3.4 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os níveis de adaptação funcional do paciente às próteses totais. Adaptação favorável (n=35), alguma dificuldade (n=15), extrema dificuldade (n=1)

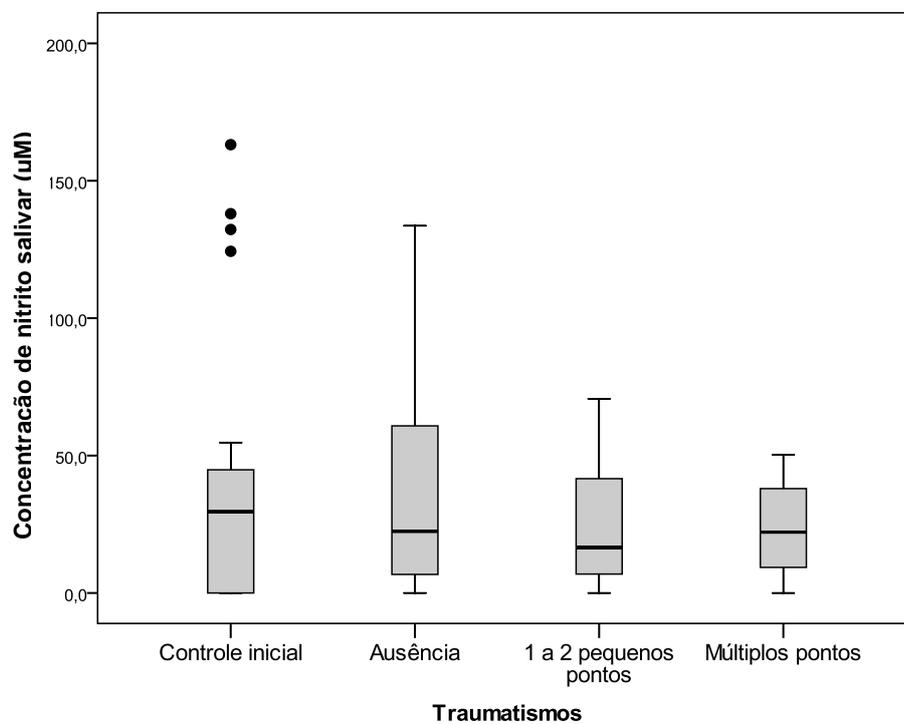


Figura 3.5 - Concentração de nitrito salivar de acordo com a presença de áreas de traumatismo nos períodos de avaliação. Ausência de traumatismo (n=18), 1 a 2 pequenos pontos (n=29), múltiplos pontos (n=4)

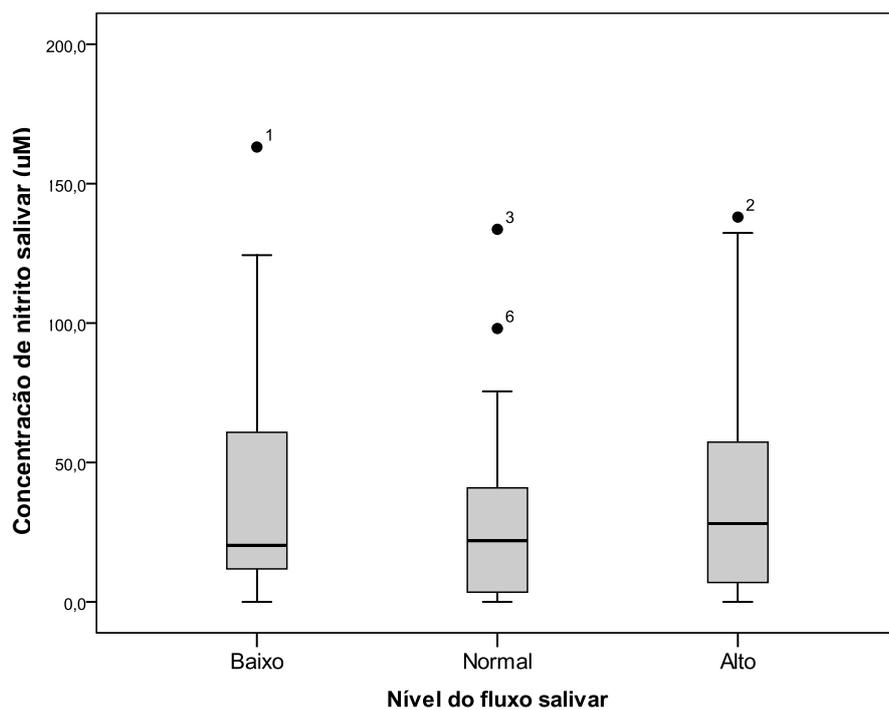


Figura 3.6 - Concentração de nitrito salivar de acordo com os níveis de fluxo salivar nos períodos de avaliação

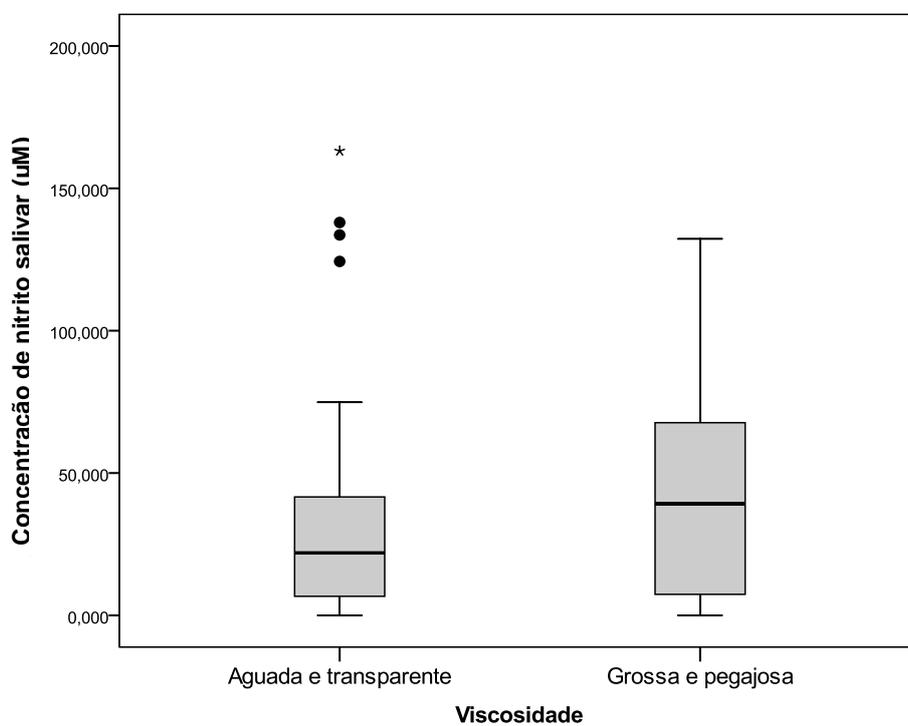


Figura 3.7 - Concentração de nitrito salivar de acordo com a viscosidade nos períodos de avaliação

3.2 CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL SALIVAR

Foram realizadas duas coletas de saliva em 16 pacientes, sendo a primeira logo após o período de adaptação funcional (T-1) e a segunda após um tempo de utilização da prótese que variou entre 1 e 12 meses. A Tabela 3.6 mostra os valores da concentração de cortisol salivar na amostra total e nos dois períodos analisados. A distribuição destes dados pode ser verificada nas Figuras 3.8 A (amostra total) e B (T-1 e T-2). Não houve diferença na concentração de cortisol salivar na comparação entre T-1 e T-2 (Teste de Wilcoxon $p=0,501$).

Tabela 3.6 - Estatística descritiva das concentrações de cortisol salivar nos períodos pós adaptativos.

	Média (DP)	Mín – Máx	Mediana (IIQ)
Amostra total (n=32)	0,359 (0,85)	0,025 - 3,170	0,068 (0,04 - 0,14)
T-1 (n=16)	0,633 (1,16)	0,025 - 3,170	0,053 (0,03 - 0,46)
T-2 (n=16)	0,084 (0,05)	0,027 - 0,200	0,071 (0,05 – 0,12)

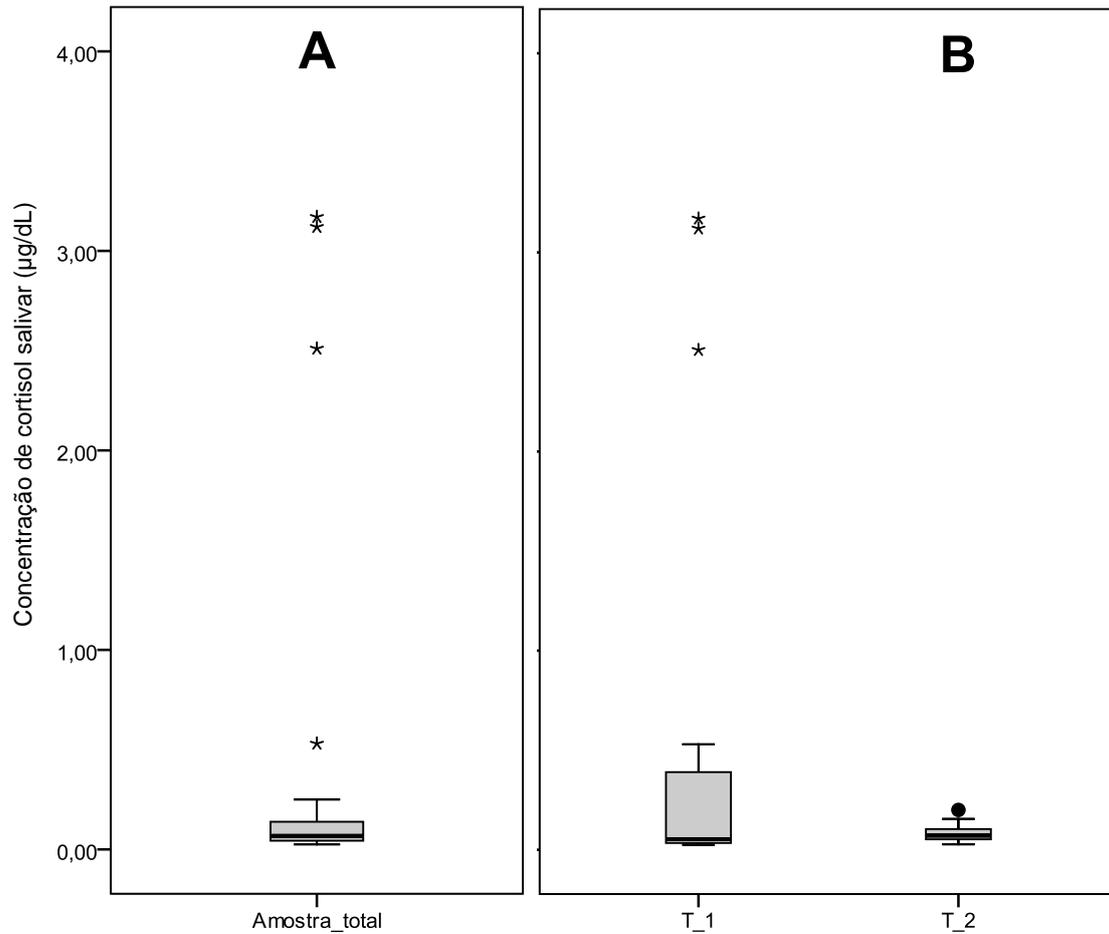


Figura 3.8 - Distribuição da concentração de cortisol salivar ($\mu\text{g/dL}$) na amostra total (A) e nos períodos T-1 e T-2 (B)

As Figuras 3.9 e 3.10 mostram a distribuição da concentração de cortisol salivar de acordo com o nível de adaptação funcional e presença de áreas de traumatismos. Não houve diferenças na comparação entre grupos em relação à adaptação funcional (teste de Mann-Whitney $p=0,346$) e áreas de traumatismos (teste de Kruskal-Wallis $p=0,155$).

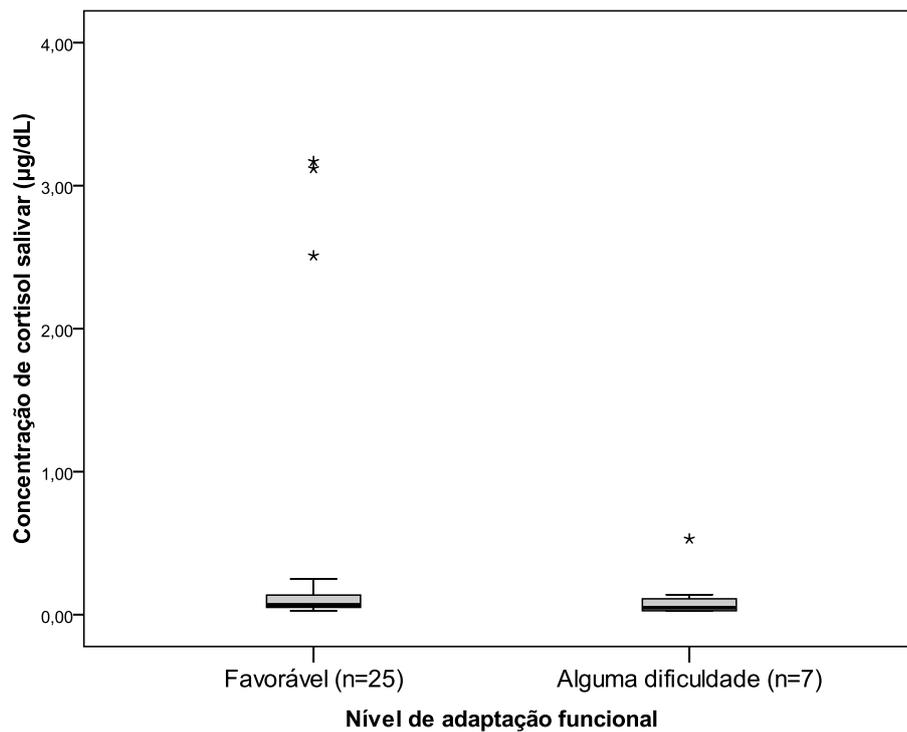


Figura 3.9 - Distribuição da concentração de cortisol salivar de acordo com o nível de adaptação funcional

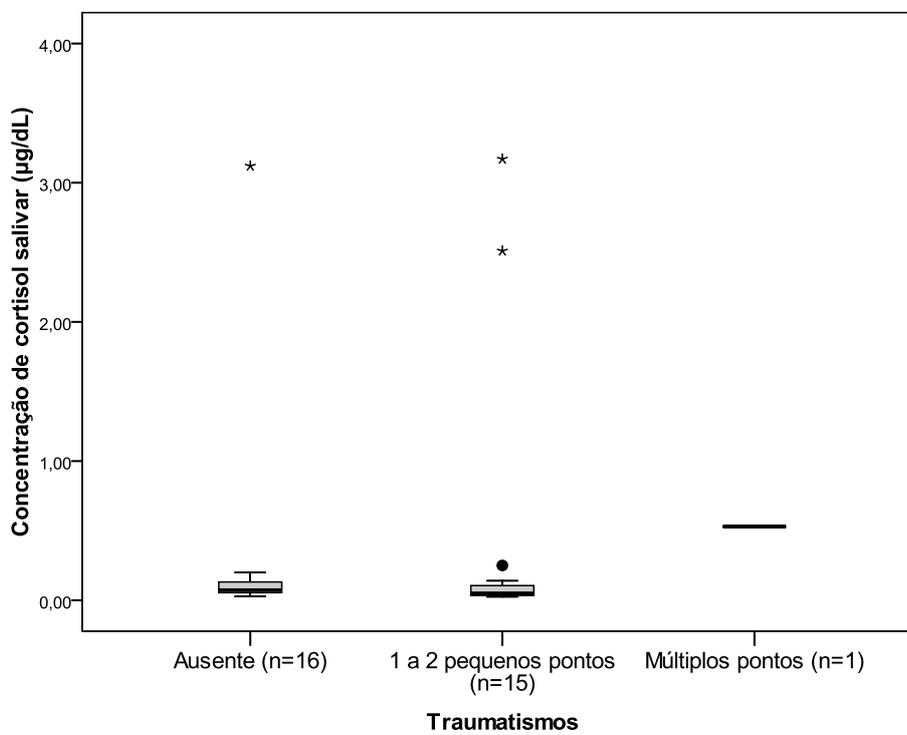


Figura 3.10 - Distribuição da concentração de cortisol salivar de acordo com o nível de traumatismos

4 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a explorar possíveis alterações de parâmetros físicos e bioquímicos durante o período adaptativo ao uso de próteses dentárias.

Os resultados mostraram que as dificuldades de adaptação funcional foram progressivamente diminuídas nas sessões de retorno, levando à adaptação sem queixas ou favorável no retorno de longo prazo. Normalmente, no processo de adaptação funcional, que inicia-se imediatamente após a instalação das próteses, é comum surgirem dificuldades transitórias relacionadas à fonética, excesso de salivação, dificuldades na mastigação e incoordenação mandibular, além de possíveis áreas de traumatismo relacionadas à extensão incorreta da prótese ou a áreas de compressão localizadas (MORSTAD & PETERSEN, 1968; BASKER *et al.*, 1992).

Alterações fonéticas, principalmente na pronúncia de sons sibilantes e fluência das palavras durante a conversação, podem estar relacionadas a alterações na posição dos dentes artificiais, na espessura da base protética em relação às próteses antigas, nas alterações para restabelecimento da dimensão vertical ou mesmo nas percepções negativas por parte do paciente. Devido à sensação inicial de corpo estranho dentro da boca, pode ocorrer indução da estimulação das glândulas salivares e aumento significativo do fluxo salivar (BERGMAN & CARLSSON, 1985; WINKLER, 1988).

A minimização destas dificuldades depende de fatores relacionados à conduta do tratamento por parte do profissional, atitudes do paciente, além de requisitos básicos de qualidade das próteses (LELES *et al.*, 2006). O sucesso do tratamento depende do reconhecimento de que estes problemas transitórios podem ocorrer após a instalação e que, embora seja difícil prever com precisão a capacidade adaptativa individual do paciente (BERG, 1993), uma abordagem ampla que leve em consideração não só aspectos técnicos da confecção das próteses, mas também a motivação, a comunicação e a empatia na relação profissional-paciente, são partes essenciais do sucesso do tratamento (BELL, 1968; BERG, 1988, 1993; SHERMAN, 1988).

Independentemente das características do paciente, a qualidade das próteses, associada à presença de fatores locais favoráveis como a qualidade da mucosa de suporte e do rebordo residual, são excelentes indicadores do prognóstico relacionado ao uso de próteses totais (BAAT *et al.*, 1997; BRUNELLO & MANDIKOS, 1998; FENLON *et al.*, 2000).

Ao analisar em nosso estudo os níveis de adaptação, verifica-se que as dificuldades vão progressivamente diminuindo ao longo dos retornos sendo que já no segundo retorno 68,4% dos pacientes apresentaram adaptação favorável e no terceiro retorno a quase totalidade (95%) dos pacientes não relataram dificuldades levando à adaptação favorável ou sem queixas.

Análise semelhante pode ser observada em relação a áreas de traumatismo onde cerca de 90% dos pacientes se apresentaram sem queixas ou com 1 ou 2 pequenos pontos de traumatismo já no segundo retorno sendo que no terceiro retorno quase todos os pacientes não tinham mais pontos de traumatismo.

As lesões da mucosa oral associada ao uso de próteses removíveis são reações agudas ou crônicas à placa microbiana da prótese ou, mais comumente, uma lesão mecânica. Úlceras traumáticas causadas por dentaduras com sobreextensão ou desequilíbrio oclusal ocorrem em cerca de 5% dos usuários. A hiperplasia causada por irritação da dentadura é uma lesão crônica do tecido em contacto com a borda da prótese e está presente em cerca de 12% dos portadores (BUDTZ-JØRGENSEN, 1981). Por outro lado, o trauma devido a próteses instáveis sugerido como um fator etiológico da estomatite protética pode ser minimizado em idosos desdentados, quando próteses mandibulares são apoiadas por um mínimo de 2 implantes, impedindo o trauma para a mucosa oral (EMAMI *et al.*, 2008).

Com relação aos valores obtidos para os parâmetros físicos salivares, no presente estudo, estes se mostraram dentro da normalidade conforme se pode constatar em registros da literatura. Na avaliação do fluxo salivar a proporção ficou assim distribuída entre os indivíduos: 21% apresentou fluxo salivar baixo, 42% apresentou fluxo salivar normal e 37% apresentou fluxo salivar alto. Estes valores são considerados normais mesmo dentro da população idosa como é o caso da média de idade da amostra (64,4 anos).

Em pessoas idosas, a xerostomia (baixa produção de saliva) está associada com fluxo salivar baixo, alta prevalência de doenças e uso de medicamentos. Altas taxas de xerostomia correlacionam-se com doenças metabólicas, respiratórias ou neurológicas, ingestão de hormônios da tireoide, agentes respiratórios (principalmente glicocorticoides), psicolépticos e/ou psicoanalépticos, antineoplásicos, inibidores da bomba de prótons, antidiabéticos, diuréticos, antiespasmódicos, e outros (SMIDT *et al.*, 2011).

A hipofunção salivar foi previamente estabelecida ter um declínio com o avanço da idade, porém estudos tem demonstrado que a secreção das glândulas salivares maiores não diminui significativamente ao longo da vida em indivíduos saudáveis, assim como os componentes salivares também se apresentam estáveis na ausência de doenças (SHIP, 1990). A maioria dos casos de xerostomia está ligada ao uso de medicamentos (WONG, 2008; ICHIKAWA, 2010). A taxa de fluxo salivar total não é influenciada pelo uso de próteses removíveis (SCHMIDEG *et al*, 2007).

A mesma observação pode ser feita com relação ao volume de saliva coletado em um tempo de 4 minutos. Os valores se apresentaram constantes para um mesmo indivíduo durante o período estudado confirmando o que é encontrado na literatura citada acima. O indivíduo que possui fluxo salivar baixo não produz volume de saliva detectável pelos métodos utilizados no tempo determinado, ou seja volume zero; enquanto que o indivíduo que possui fluxo salivar alto produz até 1,5 ml de saliva no tempo determinado. A presença da prótese na boca do paciente não alterou o volume de saliva produzido por ele.

Na verificação do pH os valores da amostra total estiveram entre 5 e 7 com valor médio de 5,62 com desvio padrão de 0,17. Esta média se encaixa dentro do que é considerado normal para o pH salivar que é levemente ácido e que pode sofrer pequenas variações (FEJERSKOV & KIDD, 2005; WONG, 2008). Foi verificado por Nicolopoulou & Tzortzopoulou em 2007, que mudanças nos valores de pH acontecem antes e após a instalação de próteses removíveis ou suportada por implantes em saliva não estimulada onde as medidas foram feitas usando um pHmetro. Estes resultados são o

contrário daqueles pesquisados por Makila em 1969, em trabalho citado pelos autores, onde não foi detectada diferença significativa nos valores de pH em função do uso de próteses (MAKILA, 1969 *apud* NIKOLOPOULOU & TZORTZOPOULOU, 2007). A explicação estaria no modo de fazer as medidas uma vez que este último usou tiras de papel indicador de pH ao invés de medidor de pH como foi o caso do trabalho em 2007.

No parâmetro viscosidade constata-se que quase 90% das amostras apresentaram a viscosidade aguado e transparente não sofrendo alterações

4.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é uma molécula de sinalização que desempenha um papel chave na patogênese da inflamação e isso resulta em um efeito anti-inflamatório, sob condições fisiológicas normais (SHARMA, 2007). É sintetizado por diversos tipos de células envolvidas na imunidade e inflamação, sendo importante molécula de defesa contra organismos infecciosos, além de regular a atividade funcional, o crescimento e a morte de vários tipos de células imunológicas e inflamatórias, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células assassinas naturais (COLEMAN, 2001).

O óxido nítrico desempenha um papel importante no processo de destruição dos tecidos periodontais na periodontite (POORSATTAR BEJEHMIR *et al.*, 2013). Estudos em pacientes com doença periodontal crônica mostraram que esta molécula é importante na defesa do hospedeiro e na homeostase, por outro lado, ela modula a resposta inflamatória conduzindo a

efeitos prejudiciais, desempenhando um importante e complexo papel no processo imuno-inflamatório e na remodelação e manutenção das estruturas ósseas (WADHWA *et al.*, 2013).

Embora seja bem conhecido que os níveis de nitrito são elevados na saliva de pacientes com doença periodontal, na boca, os nitritos podem derivar em parte da redução de nitratos por bactérias orais, enquanto os nitratos têm sido relatados como um mecanismo de defesa.

Sánchez *et al.* Em 2014 concluíram que os nitratos salivares e aumento dos nitritos, em pacientes com doença periodontal, poderia estar relacionada com os mecanismos de defesa. Assim, a possibilidade de as glândulas salivares responder às doenças infecciosas orais aumentando a secreção de nitrato deve ser explorada (SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

Em nosso estudo a distribuição de frequência apresentada na figura 3.1 para um total de 76 amostras indica que a maior parte delas possui uma concentração de nitrito em torno de 50 μ M.

Pela tabela 3.5 que apresenta a estatística descritiva das concentrações de nitrito nos diferentes períodos de avaliação observa-se uma grande variação nos níveis. A análise estatística (teste de Friedman: $p=0,053$) mostra diferença significativa na concentração de nitrito entre os períodos de avaliação, sendo que ao se comparar os pares a diferença significativa é observada entre os retornos 2 e 3 (teste de Wilcoxon $p=0,028$).

Podemos observar que as concentrações de nitrito salivar tendem a uma queda durante o período de adaptação a prótese conforme mostra o

gráfico da figura 3.2. Nos retornos 1 e 2 os níveis estão menores em relação à instalação, observa-se também que estes níveis retornam aos iniciais conforme pode-se verificar no retorno a longo prazo (retorno 3), onde os valores se mostram bem próximos aos da instalação.

Em análise feita por Güncü e colaboradores em 2008 relacionando estabilidade de implantes dentários de carga imediata e de carga convencional com níveis de nitrito contido no fluido do sulco perimplantar, observou-se que para os implantes de carga imediata houve uma redução gradativa nos níveis ao longo de 12 meses de estudo atingindo o menor nível no 12º mês de observação, a mesma análise pode ser feita com os implantes de carga convencional só que neste caso houve uma grande variação nos níveis de nitrito durante o estudo porém os níveis finais são exatamente os mesmos entre os dois tratamentos sugerindo segundo o autor, o mesmo sucesso para ambos os casos. As flutuações intermediárias são transitórias e tendem a se dissipar com o tempo (GÜNCÜ *et al*, 2008).

Em nosso estudo também observamos grande variação nos níveis de nitrito salivar durante o período adaptativo. Esta variação aconteceu entre um retorno e outro para um mesmo paciente como também entre os pacientes, levando os valores próximos aos iniciais a atingir uma estabilidade nos retornos a longo prazo. Esta estabilização se faz importante porque os níveis do mediador óxido nítrico se mostram numa relação paradoxal com o tecido ósseo uma vez que sua produção excessiva pode estar associada à perda óssea, mas ele também media efeitos benéficos para este tecido (THOMAS & PULEO, 2011).

As concentrações de nitrito não foram influenciadas pelos diferentes níveis de adaptação funcional ($p= 0,555$) conforme mostra o gráfico da figura 3.4. A mesma observação pode ser feita quando comparamos as concentrações de nítrico com os níveis de traumatismo ($p= 0,949$) mostrado no gráfico da figura 3.5. Este fato pode ser um indicativo que não houve nenhum fator (processo infeccioso ou grandes lesões) que pudesse ativar a enzima óxido nítrico sintase presente nas células da cavidade oral ou nas glândulas salivares.

O estudo demonstra também que os parâmetros físicos da saliva: nível de fluxo salivar e viscosidade não tiveram influência sobre a concentração de nitrito ($p= 0.729$ e $p= 0,289$ respectivamente) conforme mostram os gráficos das figuras 3.6 e 3.7.

4.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CORTISOL SALIVAR

Para a análise de cortisol as coletas de saliva foram feitas no final do período de adaptação funcional, aproximadamente 3 semanas de uso da prótese, e após a utilização por algum tempo que variou entre 1 e 12 meses. No conjunto da amostra total observa-se que houve grande variação na concentração de cortisol, mas ao se analisar os tempos separadamente nota-se que houve uma acomodação nos valores com o passar do tempo de uso da prótese conforme podemos observar no conjunto das amostras denominado T-2; a média e o desvio padrão foram bem menores (tabela 3.6). Não foi observada diferença na concentração de cortisol entre estas duas amostras de saliva ou seja, o uso da prótese não influenciou a concentração de cortisol salivar conforme atesta o teste de Wilcoxon.

Quando se compara os níveis de adaptação funcional com concentração de cortisol usando o teste de Mann-Whitney não detectamos diferença entre os dois grupos, ou seja, a concentração de cortisol salivar não variou entre o grupo que teve adaptação favorável e o grupo que teve alguma dificuldade.

Observação semelhante podemos fazer na comparação dos níveis de traumatismo com concentração de cortisol usando o teste de Kruskal-Wallis não detectamos diferença entre os grupos ou seja, a concentração de cortisol salivar não variou entre os grupos que tiveram ausência de traumatismo, 1 ou 2 pequenos pontos ou múltiplos pontos de traumatismo.

5 CONCLUSÕES

- ◆ As dificuldades de adaptação funcional foram progressivamente diminuídas nas sessões de retorno, levando à adaptação sem queixas ou favorável no retorno de longo prazo.
- ◆ Houve diferença significativa na concentração de nitrito entre os diferentes períodos de avaliação, havendo redução no período imediato após a instalação das próteses e retorno aos níveis iniciais na avaliação de longo prazo.
- ◆ A variação nas concentrações de nitrito não foi influenciada pelo nível de adaptação funcional, presença de áreas de traumatismo, nível do fluxo salivar e viscosidade da saliva.
- ◆ Não houve diferença na concentração de cortisol salivar na comparação entre os diferentes períodos de avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR CORDERO M. J., SÁNCHEZ LÓPEZ, A. M, MUR VILLAR, N., GARCÍA GARCÍA, I., RODRÍGUEZ LÓPEZ, M. A., ORTEGÓN PIÑERO, A., CORTES CASTELL E. Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico em niños y adultos; revisión sistemática. **Nutrición Hospitalaria**, n.5, v.29, p.960-968, 2014.

AVERY, J. K. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal. Uma abordagem clínica.** 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

BASKER, R.M., DAVENPORT, J.C., TOMLIN, H.R. **Prosthetic treatment for the edentulous patient.** 3ª edição. London: McMillan, 1992.

BELL, D. Problems in complete denture treatment. **J. Prosthet. Dent.**, v.19, p.550-560, 1968.

BERG, E. A 2-year follow-up study of patient satisfaction with new complete dentures. **J Dent.**, v. 16, p. 160-165, 1988.

BERG, E. Acceptance of full dentures. **Int. Dent. J.**, v.43, p.299-306, 1993.

BERG. E, JOHNSEN T.B., INGEBRETSEN R. Social variables and patient acceptance of complete dentures. A study of patients attending a dental school. **Acta Odontol Scand.**,v.43, p.199-203, 1985.

BERGMAN B., CARLSSON G. Clinical long-term study of complete denture wearers. **J Prosthet Dent.**, v. 53, p. 56-61, 1985.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SB Brasil 2010 – Levantamento Nacional de Saúde Bucal – Principais Resultados, 2011.

BRUNELLO, D., MANDIKOS, M. Construction faults, age, gender, and relative medical health: factors associated with complaints in complete denture patients. **J Prosthet Dent.**, v.79, p.545-554, 1998.

BUDTZ-JØRGENSEN, E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. **J Oral Pathol.**, v.10, p.65-80, 1981.

CERQUEIRA, N. F., YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, n.6, v.17, p.417-423, 2002.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol.**, v.1, p.1397-1406, 2001.

- DE BAAT, C., VAN AKEN, A. A., MULDER, J., KALK, W “Prosthetic condition” and patients’ judgment of complete dentures. **J. Prosthet. Dent.**, v.78, p.472-478, 1997.
- EDGAR, W. M. Saliva: Its secretion, composition and functions. **Br. Dent. J.**, n.8, v.172, p.305-312, 1992.
- EMAMI, E., DE GRANDMONT, P., ROMPRÉ, P.H., BARBEAU, J., PAN, S., FEINE, J.S. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. **J. Dent. Res.**, v.87, p.440-444, 2008.
- FEJERSKOV, O, KIDD, E. **Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos , 2005.
- FENLON, M., SHERRIF, M., WALTER, J. An investigation of factors influencing patients’ use of new complete dentures using structural equation modelling techniques. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.28, p.133-140, 2000.
- FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**, n.3, v.46, p.265-271, 2000.
- GASPARETTO, A., NEGRI, M. F. N., PAULA, C. R., SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Sci. Health Sci.**, n.1, v.27, p.37-40, 2005.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WINSHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.
- GÜNCÜ, G. N., TÖZÜM, T. F., GÜNCÜ, M. B., YAMALIK, N. Relationships between implant stability, image-based measures and nitric oxide levels. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.35, p.745-753, 2008.
- HEGDE, A. M. NEEKHRA, V., SHETTY, S. Evaluation of levels of nitric oxide in saliva of children with rampant caries and early childhood caries: a comparative study. **J. Clinical Pediatr. Dent.**, n.4, v.32, p.283-286, 2008.
- HEZEL, M. P., WEITZBERG, E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. **Oral Diseases**, p.1-10, 2013.
- ICHIKAWA, K., SAKUMA, S., YOSHIHARA, A., MIYAZAKI, H., FUNAYAMA, S., ITO, K., IGARASHI, A. Relationships between the amount of saliva and medications in elderly individuals. **Gerodontolgy**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 116-120, 2010.
- KOSHTI, S., KOHAD, R. M. Effects of salivary nitric oxide on stress related periodontitis. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v.7, p.19-26, 2004.

- KRÖNCKE, K. D. Nitrosative stress and transcription. **Biol. Chem.**, v.384, p.1365-1377, 2003.
- LELES, C. R. ; COMPAGNONI, M. A. ; SOUZA, R. F. ; MARRA, J. ; PERO, A. C. . Avaliação das alterações funcionais associadas ao período de adaptação de pacientes usuários de próteses totais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, p. 177-183, 2006.
- LUNDBERG, J. O., WEITZBERG, E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. **Gut**, v.62, p.616-629, 2013.
- MARINGONI, R. L. et al. A secreção eletrolítica da saliva. **Rev Paul Med.**, n. 6, v. 109, p. 278-283, 1991.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.
- MARUCH, A. O., FERREIRA, E. F., VARGAS, A. M. D., PEDROSO, M., A., G., RIBEIRO, M. T. F. Impacto da prótese dentária total removível na qualidade de vida de idosos em Grupos de convivência de Belo Horizonte - MG. **Arq. odontol.**, [s. l.], v 45, n. 2, p. 73-80, 2009.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- MORSTAD, A., PETERSEN, A. Post-insertion denture problems. **J. Prosthet. Dent.**, v.19, p.126-132, 1968.
- MOURA, S. A. B., MEDEIROS, A. M. C., COSTA, F. R. H., MORAES, P. H., OLIVEIRA FILHO, S. A. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesqui. Bras. em Odontopediatria Clín. Integr.**, n.2, v.7, p.187-194, 2007.
- MURAKAMI, A. M. U., MOYSES, S. J., MOYSES, S. T. Equidade frente à necessidade de prótese dentária na população de 65 a 74 anos de idade em Curitiba. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 139-141, jun. 2007.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Estados Unidos: Sarvier, 2011, 1274 p.
- NIKOLOPOULOU, F., TZORTZOPOULOU, E. Salivary pH in Edentulous Patients Before and After Wearing Conventional Dentures and Implant Overdentures: a clinical study. **Impl. Dent.**, v. 16, n. 4, p. 397-402, 2007.
- PARWANI, S. R., CHITNIS, P. J., PARWANI, R. N. Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease: a case-control and interventional study. **Int. Journal of Dental Hygiene.**, v. 10, p. 67-73, 2012.
- POORSATTAR BEJEH-MIR, A., PARSIAN, H., AKBARI KHORAM, M., GHASEMI, N., BIJANI, A., KHOSRAVI-SAMANI, M. Diagnostic role of salivary and GCF nitrite, nitrate and nitric oxide to distinguish healthy

- periodontium from gingivitis and periodontitis. **Int J Mol Cell Med.**, v.3, p.138-145, 2013.
- QUEIROZ, S. L., BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, n.4, v.22, p.584-589, 1999.
- REHER, V. G. S., ZENOBIO, E. G., COSTA, F. O., REHER, P., SOARES, R. V. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. **J. Oral Sci.**, v.49, p.271-276, 2007.
- ROSS, M. H. **Histologia: texto e atlas**, 2 ed, Panamericana, São Paulo, 1993.
- RUIZ, C., OLIVEIRA, L. C., BERNARDO, K. C., PIRES, T. B., BELOTI, A. M. Avaliação das alterações bucais causadas pelo uso de próteses removíveis. **Revista Dens.**, v.16, n.2, 2008.
- SÁNCHEZ, G. A., MIOZZA, V. A., DELGADO, A., BUSCH, L. Total salivary nitrates and nitrites in oral health and periodontal disease **Nitrix Oxide**, v.36, p.31-35, 2014.
- SCHMIDEG, G., KIVOVICS, P., MÁRTON, K. Flow rate of minor salivary glands in elderly patients wearing complete dentures. **Fogorv Sz.**, n.4, v.100, p.153-158, 2007.
- SCULLY, C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. **Oral Dis.**, n.4, v.9, p.165-176, 2003.
- SHARMA, J.N., AL-OMRAN, A., PARVATHY, S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v.15, p.252-259, 2007.
- SHARMA, V., SAIMBI, C. S., MEHROTRA, K. K. Estimation of nitric oxide as diagnostic marker of periodontal disease. **J. Indian Soc. Periodontol.**, n.4, v.6, p.137-143, 2003.
- SHERMAN, H. Denture insertion. In: WINKLER, S. **Essentials of complete denture prosthodontics**. St Louis: Mosby, 1988.
- SHIP, J. A., BAUM, B. J. Is reduced salivary flow normal in old people? **Lancet**, v.336, p.1507, 1990.
- SMIDT, D., TORPET, L.A., NAUNTOFTE, B., HEEGAARD, K.M., PEDERSEN, A.M. Associations between oral and ocular dryness, labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.39, p.276-288, 2011.
- SPIELMANN N., WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Diseases**, v.17, p.345-354, 2011.
- THOMAS, M. V., PULEO, D. A.. Infection, inflammation and bone regeneration: a paradoxical relationship. **J. Dent. Res.**, n. 9, v.90, p.1052-1061, 2011.

- THYLSTRUP, A. **Tratado de cariologia**: Cultura médica, 1988.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2.ed. São Paulo, Ed. Santos, 2001. 421p.
- VAN'T HOF, R. J., RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, n. 3, v. 103, p.255-261, 2001.
- VESPA, G. N., R., SILVA, J. S. Óxido nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. **Rev. Pat. Trop.**, n. 23, v. 1, p.1-23, 1994.
- WADHWA, D., BEY, A., HASIJA, M., MOIN, S., KUMAR, A., AMAN, S., SHARMA, V.K. Determination of levels of nitric oxide in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Implant Sci.**, v.43, p.215-220, 2013.
- WANG, Y., MARDSEN, P. A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Curr Opin Nephrol Hypert**, v. 4, p.12-22, 1995.
- WINKLER, S. **Essentials of complete denture prosthodontics**. St Louis: Mosby, 1988.
- WONG, D. T. **Salivary Diagnostics**. 1ª edição. Estados Unidos: Wiley-Blackwell, 2008. 301 p.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

_____,
portador (a) da cédula de identidade _____, após
leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AOS PACIENTES OU
RESPONSÁVEIS**, devidamente explicada pelos profissionais em seus
mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais serão
submetidos, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado,
firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em
participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode a qualquer
momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar
de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas
tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º
do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Goiânia ____ de _____ de _____.

Assinatura Paciente ou responsável

Profª Ms. Maria de Lourdes Breseghelo

ANEXO II

INFORMAÇÕES

Senhores Pacientes ou Responsáveis,

Necessitamos de sua colaboração com a doação de saliva. Em todos os pacientes selecionados, serão coletados cerca de 2 mL de saliva utilizando um pedaço de algodão colocado embaixo da língua. Essa saliva será usada em pesquisa com a finalidade de avaliar as alterações salivares de usuários de próteses antes e após a sua instalação, Espera-se com os resultados desta pesquisa conhecer determinadas alterações salivares que possam colaborar com a tomada de decisões que levem a melhor adaptação da prótese possibilitando melhora na qualidade de vida.

Deste modo, os benefícios sendo maiores que os riscos, solicitamos apenas a doação da saliva para que a pesquisa possa ser realizada.

Os pesquisadores responsáveis se comprometem a fornecer todas as informações e esclarecimentos da pesquisa. Os pacientes ou responsáveis tem total liberdade para se recusar a autorização da participação sem prejuízo ao tratamento.

Goiânia _____ de _____ de _____.

Assinatura Paciente ou responsável

Profª Ms. Maria de Lourdes Breseghelo

ANEXO III



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Goiânia, 06/05/2013

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O N.: 020/13

I – Identificação

- Título do projeto: Análise bioquímica das alterações salivares relacionadas à adaptação funcional de pacientes usuários de próteses totais
- Pesquisador Responsável: Maria de Lourdes Breseghele
- Pesquisadores Participantes: Lidia Andreu Guillo; Túlio Eduardo Nogueira
- Orientador: Cláudio Rodrigues Leles
- Instituição onde será realizado o estudo: Faculdade de Odontologia - UFG
- Data de apresentação ao CEP/UFG: 24/01/13
- Data de atendimento primeira pendência: 08/04/2013
- Data de atendimento segunda pendência: 25/04/2013
- Área Temática: Grupo III

II – Documentos apresentados:

Carta de encaminhamento ao CEP/UFG com os esclarecimentos solicitados.

III – Parecer do CEP:

- Após análise do documento anexado, pelos pesquisadores, página 42, em atenção aos itens pendentes, constata-se o atendimento aos requisitos solicitados e por sua vez à resolução CNS 196/96, portanto o parecer, S.M.J deste comitê, é pela **APROVAÇÃO**.

P.S. Observações: Favor enviar os relatórios parcial e final.

VI – Data da reunião: 06 de abril de 2013

Assinatura do(a) relator(a):

Assinatura do(a) Coordenador(a) CEP/UFG:


Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Predio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163
Homepage: www.pppg.ufg.br - E_mail: pppg@pppg.ufg.br