



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

CAROLINA VIEIRA MARCONDES

**ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE DA
ANIDRASE CARBÔNICA VI (CA VI) NA SALIVA DE
CRIANÇAS EM IDADE ESCOLAR**

Piracicaba
2017

CAROLINA VIEIRA MARCONDES

**Análise da concentração e atividade da anidrase carbônica
vi (ca vi) na saliva de crianças em idade escolar**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de
Cirurgião Dentista.

Orientador: Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Coorientador: Dra. Daniele de Cassia Rodrigues Picco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO APRESENTADO PELA ALUNA
CAROLINA VIEIRA MARCONDES E ORIENTADA
PELO PROF. DR. MARINÊS NOBRE DOS
SANTOS UCHÔA.

Piracicaba

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M333a Marcondes, Carolina Vieira, 1994-
Análise da concentração e atividade da anidrase carbônica VI (CA VI) na saliva de crianças em idade escolar / Carolina Vieira Marcondes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marinês Nobre dos Santos Uchôa.

Coorientador: Daniele de Cassia Rodrigues Pico.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Saliva. 2. Cárie dentária. 3. Anidrases carbônicas. I. Nobre dos Santos, Marinês, 1958-. II. Pico, Daniele de Cassia Rodrigues, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais complementares

Palavras-chave em inglês:

Saliva

Dental caries

Carbonic anhydrases

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 02-10-2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por sempre me guiar e confortar nos momentos difíceis; aos meus pais pelo exemplo de vida, apoio, amor e carinho; e ao meu namorado e amigos pela convivência, paciência e atenção em todos os momentos.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivos: 1-Determinar a concentração e atividade da isoenzima AC VI na saliva de escolares com cárie; 2 - Investigar a relação entre essas variáveis e a cárie dental. Para isto, 50 escolares de 7 a 9 anos serão divididos em 02 grupos: grupo livre de cárie (Grupo LC n=25) e grupo com cárie (Grupo C n= 25). Para os ensaios da concentração de AC VI salivar, utilizaremos ensaio de rotulagem de antígeno e fluoroimunoensaio na saliva. Os resultados mostraram que para o pH salivar, não houve diferença entre os grupos com cárie ($8,172 \pm 0,622$) e livre de cárie ($8,155 \pm 0,509$; $p= 0,92$). A capacidade tampão(CP) da saliva foi estatisticamente maior no grupo livre de cárie ($p= 0,0019$). A concentração da AC VI na saliva foi significativamente maior no grupo livre de cárie ($0,8363 \pm 0,1160$) do que no grupo com cárie ($0,5122 \pm 0,07702$). Por outro lado, a atividade da AC VI na saliva foi significativamente maior no grupo com cárie ($16,73 \pm 3,766$) quando comparada com o grupo sem cárie ($8,622 \pm 1,541$; $p= 0,0425$). Observou-se uma correlação negativa entre a CP e a cárie dental. Como conclusão, os resultados sugerem que a atividade da AC VI e a capacidade tampão da saliva exercem influência sobre o desenvolvimento da cárie dentária

Palavras Chave: Saliva. Cárie dentária. Anidrase Carbônica.

ABSTRACT

This research aimed to: 1-Determine a concentration and activity of AC VI isoenzyme in the saliva of schoolchildren with caries; 2 - Investigate the relationship between these variables and dental caries. For this, 50 students aging 7 to 9 years old were divided into 2 groups: caries free group (CF group n = 25) and group with caries (Group C n = 25). For determination of salivary AC VI concentration, the application of antigen labeling and fluoroimmunoassay tests were used. The analysis of AC VI activity was performed by zimography. The correlations between caries and the variables concentration and AC VI isoenzyme activity, werw evaluated using the Spearman and Pearson correlation test. The results showed that regarding salivary pH, there was no difference between the caries group and the careis-free group(8.172 ± 0.622 and 8.155 ± 0.509 ; $p= 0.92$). The buffering capacity was higher in the the careis-free group than in the caries group ($p= 0.0019$). CA VI concentration in saliva was higher in the careis-free group than in the caries group than in the caries group (0.8363 ± 0.1160 and 0.5122 ± 0.07702).On the other side, CA activity was higher in saliva of the caries group than careis-free group (16.73 ± 3.766 and 8.622 ± 1.541 ; $p= 0.0425$).We also observed a negative correlation between BC and dental caries. As conclusion, the results suggests that CA activity and the salivary buffering capacity may influence dental caries development

Key words: Saliva. Dental caries. Carbonic Anhydrases.

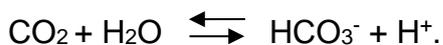
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Procedimentos Éticos	15
4.2 Amostra	15
4.3 Calibração do Examinador e Diagnóstico de cárie	16
4.4 Coleta das amostras de saliva	16
4.5 Determinação do pH e capacidade tamponante da saliva	16
4.6 Determinação da concentração de AC VI na saliva	17
4.7 Determinação da Atividade da AC VI na saliva	17
4.8 Análise estatística	17
5 RESULTADOS	19
5.1 pH da Saliva	20
5.2 Capacidade Tamponante	20
5.3 Determinação da concentração de AC VI na saliva	20
5.4 Atividade da AC VI na saliva	21
5.5 Correlação entre a cárie dentária e todas as variáveis estudadas	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA	30

1 INTRODUÇÃO

A saliva é uma mistura das secreções das glândulas parótida, submandibular, sublingual, glândulas salivares menores e fluido gengival e contém substâncias inorgânicas, compostos e múltiplas proteínas que afetam as condições da cavidade bucal e localmente nas superfícies dos dentes. Além disso, a saliva apresenta vários mecanismos de defesa, que incluem leucócitos, IgA secretoras, proteínas aglutinadoras e uma série de enzimas que atuam nos sítios de crescimento microbiano nas superfícies dos dentes e mucosas (Kivelä et al. 1999a).

A capacidade tampão salivar é um fator de importância primária na manutenção da homeostase bucal. Os principais sistemas tampão conhecidos por contribuir para a capacidade tamponante total da saliva são os sistemas bicarbonato e fosfato e aqueles baseados em proteínas. Durante a ingestão de alimentos e a mastigação, a maior parte da capacidade tamponante salivar é devida ao sistema bicarbonato, que baseia-se no equilíbrio:



A existência da isoenzima anidrase carbônica VI (AC VI) na saliva humana é conhecida há 60 anos (Becks and Wainright, 1939), mas até recentemente, apenas alguns poucos estudos foram conduzidos para elucidar o papel fisiológico da AC salivar (Parkkila et al. 1994; Kivelä et al. 1999a; Nishimori et al. 2007; Kasuya et al. 2007).

A anidrase carbônica VI (AC VI) é a única isoenzima secretada da família de genes AC de mamíferos (18). São estipuladas 16 diferentes isoenzimas α -CA ou proteínas relacionadas com CA em mamíferos. Algumas são expressas em quase todos os tecidos, enquanto outras são encontrados no tecido ou órgão específico. Enzimas citosólicas são cinco (I, II, III, VII e XIII), cinco são ligadas à membrana (IV, IX, XII, XIV e XV), duas estão presentes na mitocôndria (VA e VB) e a VI é uma enzima secretada. A AC VI é secretada na saliva pelas células acinares serosas da parótida e glândulas submandibulares (19). As isoenzimas AC apresentam divergência considerável na sequência de DNA, localização cromossômica e nas propriedades enzimáticas (20) (Kivelä et al. 1999a; Kivelä et al. 1999b; Aidar et al. 2013)

De acordo com estudos recentes, a AC VI parece ser uma das enzimas chave na fisiologia bucal em humanos e animais (Kimoto et al. 2006; Kaseda et al. 2006; Mau et al. 2010). A anidrase carbônica é a única forma de isoenzima de rato que pode ser secretada para a saliva com a finalidade de proporcionar uma maior capacidade tamponante, bem como promover a retenção de HCO_3^- no nível das glândulas salivares. O pH elevado da saliva seria necessário para manter o meio apropriado para a multiplicidade de enzimas (incluindo proteases), que estão presentes. (Feldstein e Silverman, 1984). Estudos anteriores demonstraram que a AC VI tem um papel notável na proteção dos dentes contra a cárie dentária (Kivelä et al. 1999a). O estudo realizado por Ozturk et al. (2008), encontrou uma correlação negativa entre a atividade de AC VI na saliva e o índice CPOD dos sujeitos envolvidos, talvez devido à excelente higiene bucal e saúde gengival dos adultos participantes da pesquisa.

Com relação à saliva, foi demonstrado que em crianças livres de cárie, a concentração da AC VI na saliva foi maior do que naquelas com lesões de cárie ativas (Szabó 1974). Posteriormente, foi evidenciada uma correlação negativa entre a concentração salivar de AC VI e o CPOD em adultos com higiene bucal deficiente (Kivelä et al. 1999b). No entanto, a evidência de que existe uma alta concentração da AC VI na saliva pode não necessariamente significar que toda a isoenzima esteja ativa e dessa forma, seja capaz de neutralizar os ácidos após um desafio cariogênico. Neste contexto, o estudo realizado por Frassetto et al. (2012) demonstrou que a atividade da AC VI foi significativamente maior no biofilme de pré-escolares com cárie. Com relação a atividade da AC VI na saliva, a pesquisa longitudinal recentemente realizada por Borghi et al. (2017), demonstrou que a atividade da AC VI foi significativamente maior na saliva de pré-escolares com cárie precoce na infância quando comparada aquela observada na saliva de crianças livres de cárie. Observa-se, no entanto, que não existem relatos na literatura sobre a possível relação entre a concentração e atividade da AC VI na saliva de escolares com a doença cárie. Assim, a determinação da atividade da AC VI salivar e não apenas de sua concentração proporcionaria mais uma prova do efeito desta isoenzima em proteger a superfície dental. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivos determinar a concentração e atividade da

isoenzima AC VI na saliva de escolares com cárie e verificar se existe correlação entre a concentração e a atividade desta isoenzima na saliva e a cárie dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Assaf et al. (2006) é possível calibrar um examinador a diagnosticar a cárie nas diferentes fases de evolução da doença. Um grupo de examinadores foi organizado e submetido a treinamentos e exercícios de calibração sobre o diagnóstico da cárie em diferentes etapas, avaliando crianças com histórico de cárie. Os resultados da fase inicial foram submetidos aos limiares WHO e WHO + IL e a partir daí determinou-se ótimos valores médios de Kappa intra e inter-examinador.

Segundo Borghi et al (2017) A presença de biofilme visível e a baixa atividade da amilase podem ser considerados fatores de alto risco para o desenvolvimento de lesões de cárie. Um grupo de crianças foi dividido em dois grupos: com cárie e sem cárie, foi coletado o biofilme e a saliva destas crianças e analisados quanto a atividade da amilase e da Anidrase Carbônica VI, o resultado obtido constatou que a atividade da Amilase foi maior no grupo livre de cárie e a atividade da Anidrase Carbônica VI foi maior no grupo com cárie.

F. Frasseto et al. (2012) sugere que a atividade da Anidrase Carbônica VI e a idade da criança estão associadas a cárie. O resultado foi obtido analisando um grupo de crianças com cárie e um grupo de crianças sem cárie, após a análise de suas salivas, percebeu-se que a atividade da Anidrase Carbônica VI foi maior no grupo de crianças sem cárie, além disso o fluxo salivar, pH do biofilme e idade da criança foram relacionados com a cárie, obtendo um resultado significativo apenas na atividade da Anidrase Carbônica VI e na idade da criança.

De acordo com o estudo de Jyrki et al. (2003), foi possível comprovar que os níveis hormonais não interferem na secreção da Anidrase Carbônica VI. Para chegar a essa conclusão, um estudo foi feito na saliva estimulada de mulheres grávidas e não grávidas e saudáveis, para confirmar que o estrogênio é conhecido por regular a quantidade de Anidrase Carbônica em alguns tecidos. Após obter a análise da saliva dos dois grupos, foi possível comprovar que os hormônios não interferem na secreção desta enzima.

A partir do estudo de Kaseda et al. (2006) foi possível determinar que a Anidrase Carbônica VI bovina, influi de várias maneira na regulação do pH, no equilíbrio de íons e fluidos e na proliferação celular. Isso foi possível de ser determinado pela análise de células de diferentes partes do corpo do animal, como intestino grosso e as glândulas produtoras de saliva, por exemplo.

Com o estudo da pesquisa de Kasuya et al. (2007) foi concluído que a Anidrase Carbônica VI em cães é secretada na saliva pelas células que produzem saliva serosa. O estudo conseguiu chegar a esse resultado utilizando um antígeno da enzima e com a análise imunohistoquímica foi possível determinar os locais onde o antígeno se ligou a enzima, que foram nas células acinares serosas, não contendo nenhuma imunorreação nas células acinares mucosas.

A partir do estudo de Kimoto et al. (2006) podemos afirmar que a Anidrase Carbônica VI neutraliza os ácidos da reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, funcionando como uma enzima anti-cárie na saliva. O resultado foi obtido monitorando o pH de amostras de placa de indivíduos que continham ou não o inibidor da Anidrase Carbônica VI acetazolamida. Após os resultados, a análise da placa com o inibidor da Anidrase Carbônica VI obteve menores valores de pH, do que as amostras que não continham o inibidor.

O estudo de Kivela et al. (1999b), relacionou as contagens de lactobacillus e Streptococcus mutans, taxa de secreção salivar, os níveis de atividade da alfa-amilase, o pH e a capacidade tampão de amostras de saliva, com o índice de Anidrase Carbônica VI. Após esta criteriosa correlação, os autores concluíram que a atividade da Anidrase Carbônica VI é menor em indivíduos que apresentam cárie e com má higiene bucal.

A partir do estudo Mau et al. (2010) foi possível observar a presença de um segunda enzima da classe das Anidrases Carbônicas presente na saliva de bovinos. Utilizando dois anticorpos da isoenzima Anidrase Carbônica II, foi possível pela imuno-histoquímica determinar a presença da enzima em

questão no ducto luminal de parótidas bovinas. Sugeriu-se que a ausência das Anidrases Carbônicas em questão (II e VI) pode estar relacionada a acidose em ruminantes.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a relação entre concentração e atividade da isoenzima Anidrase Carbônica VI na saliva de escolares de 7 a 9 anos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimentos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP(No. 018/2012). Os pais ou responsáveis que concordaram com a inclusão das crianças na pesquisa, preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a participação das mesmas na pesquisa.

4.2 Amostra

Para o cálculo amostral foi considerada a variabilidade observada em pesquisa recentemente concluída no laboratório do Odontopediatria da FOP-UNICAMP (Frasseto et al., 2012). Assim, foram selecionadas 50 crianças em idade escolar de 07 a 09 anos, saudáveis, com boa higiene bucal, bom histórico de saúde geral e bucal e que não estavam fazendo uso de medicação. Foram selecionadas crianças que apresentaram gengiva saudável com ausência de vermelhidão, inchaço ou sangramento.

4.3 Calibração do Examinador e Diagnóstico de cárie

O diagnóstico de cárie dentária foi realizado pelo método de inspeção visual, com o auxílio de espelho clínico, sonda CPITN, lanterna portátil, limpeza e secagem dos dentes com gaze, de acordo com o critério da Organização Mundial da Saúde incluindo as lesões iniciais de mancha branca (Assaf et al. 2006). Esses exames foram realizados por um único cirurgião-dentista previamente calibrado. Para isso, cerca de 20% das crianças que compuseram a amostra foram avaliadas pelo examinador que foi calibrado por um gold standard. A seguir, as crianças foram reexaminadas após o intervalo de 01 semana. Após calculada a estatística Kappa, e sendo obtido um coeficiente de concordância, inferior a 0,61% (Lands e Koch, 1977) o examinador foi submetido a um novo processo de calibração.

4.4 Coleta das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas em duplicata na mesma hora do dia (entre 08:30 e 12:00 hs), pelo mesmo dentista em todas as crianças. As crianças foram instruídas a deixarem de comer ou beber por 1 hora antes da coleta das amostras. A secreção salivar foi estimulada com um pedaço de cera de parafina (1 g) por cerca de 6 minutos, sendo a saliva engolida no primeiro minuto e depois coletada cuspidando dentro dos tubos de coleta.

4.5 Determinação do pH e capacidade tamponante da saliva

O volume de saliva estimulada foi calculado pela diferença de peso entre os frascos, vazio e cheio, considerando a densidade da saliva igual a 1 mg/mL.

O pH foi determinado imediatamente com o uso medidor de pH portátil Mpa-210/Mpa-210P, TecnoPON, previamente calibrado com soluções padrão de pH 4 e 7, conforme instruções do fabricante.

As amostras foram então armazenadas em tubos de 1 mL e congeladas a -40° C para as determinações eletrométricas da capacidade tamponante; em alíquotas de 400 μ L para determinação da atividade da AC VI na saliva, pelo método de zimografia e da concentração da AC VI pelo método de Elisa.

Para a avaliação da capacidade tampão, o método descrito por Bouchoucha et al. (1997), foi ajustado para o volume de 400 μ L de saliva, então incrementos de 4 μ L de ácido clorídrico a 0,25 M foram adicionados a estas alíquotas monitoradas por microelétrodo. A cada incremento, o tubo era agitado e o pH determinado, obtendo-se uma curva de queda de pH. O resultado foi expresso pelo cálculo da área sobre a curva (ASC) através do Excel.

4.6 Determinação da concentração de AC VI na saliva

A análise da concentração de AC VI na saliva foi obtida usando o Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit para a anidrase carbônica VI (kit de ELISA de 96 testes SED073Hu - Nuvem - Clone Corp.) seguindo as instruções do fabricante. Após protocolo experimental do kit, a absorvância foi avaliada pela EON espectrómetro (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e a concentração de AC VI foi expressa como nanogramas por microlitro (ng/mL) .

4.7 Determinação da Atividade da AC VI na saliva

Para análise da atividade da enzima anidrase carbônica VI na saliva, esta foi mantida congelada a -70°C . Após a saliva ser descongelada, foram utilizados 200 μL desta e 200 μL de tampão para zimografia, totalizando 400 μL de amostra. Somente 15 μl foram colocadas em cada canaleta do gel. Esse material foi agitado durante 1 minuto, antes de ser colocado no gel de acrilamida a 30% / bisacrilamida a 0,8%, que ficou por 21 horas a 30 volts no refrigerador. Após a eletroforese, o gel foi lavado por 20 minutos em isopropanol a 10% diluído em tampão Tris a 100 mM, pH 8,2 seguido de 2 lavagens de tampão Tris a 100 mM, pH 8,2. O gel foi incubado em azul de bromotimol a 0,1% em tampão Tris a 100 mM, pH 8,2, durante 30 minutos a 4°C . A reação da anidrase carbônica foi evidenciada após imersão do gel em água destilada deionizada saturada com CO_2 . Os géis foram fotografados e a partir da imagem obtida se quantificou as bandas pelo programa Image J[®], o qual calculou a área das bandas que acenderem e assim quantificou a atividade da AC VI e exprimiu a atividade em valor numérico.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada considerando-se dois grupos de crianças com cárie (C) e livres de cárie (CF) como variáveis dependentes. Duas análises de modelagem multivariada foram testadas. As variáveis independentes foram: taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tampão, atividade e concentração de saliva. Todas as variáveis foram dicotomizados independente

com base em seus valores medianos usando o teste t de Student. Além disso, a correlação entre cárie dentária e todas as variáveis em estudo foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Os testes estatísticos foram considerados significativos se os valores de p foram inferiores a 0,05. Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc.)

5 RESULTADOS

5.1 pH da Saliva

Foram selecionadas 25 crianças para o grupo com cárie e 25 crianças para o grupo livre de cárie. A análise do pH da saliva mostrou que não existe diferença entre os grupos com cárie ($8,172 \pm 0,622$ N=22) e livre de cárie ($8,155 \pm 0,509$ N=21), $p= 0,92$ (Figura 1). O n=22 para o grupo com cárie se deve ao fato de 1 criança não ter salivado nada e 2 crianças terem salivado uma quantidade mínima de saliva, não tendo a quantidade mínima suficiente (1 mL) para a análise d pH. Para o grupo livre de cárie, o n=21 deve-se ao fato de 1 criança não ter salivado, 2 não terem a quantidade mínima para análise e 1 criança ter saído da escola no período analisado.

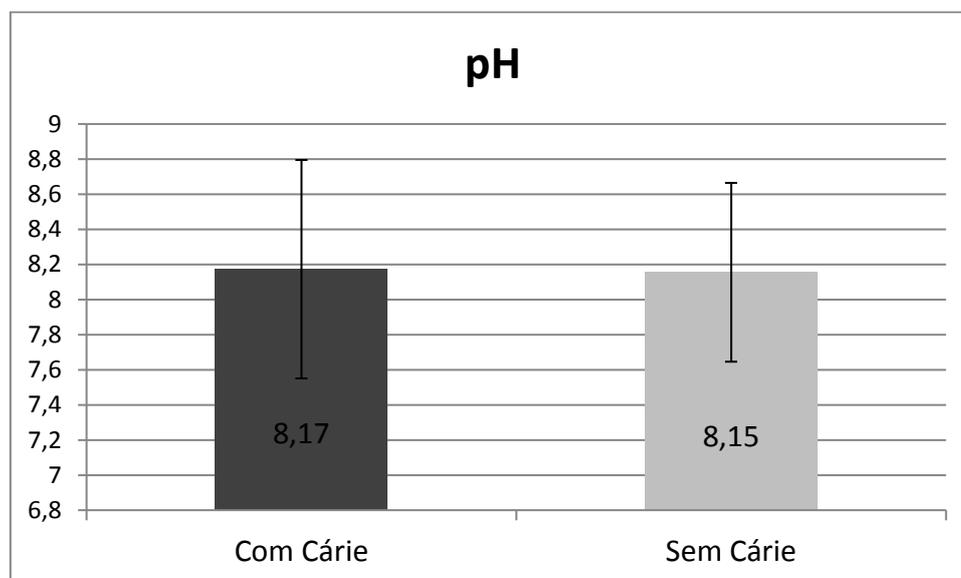


Figura 1 - Média com desvio padrão do pH da saliva expresso em unidades de pH para os grupos com cárie (n=22) e sem cárie (n=21).

5.2 Capacidade Tamponante

A análise da capacidade tamponante salivar (Figura 2), mostrou que existe diferença entre os grupos com cárie ($40,495 \pm 14,952$ N=22) e livre de cárie ($54,371 \pm 12,322$ N=21), $p= 0,0019$, tendo o grupo livre de cárie apresentado capacidade tampão estatisticamente maior.

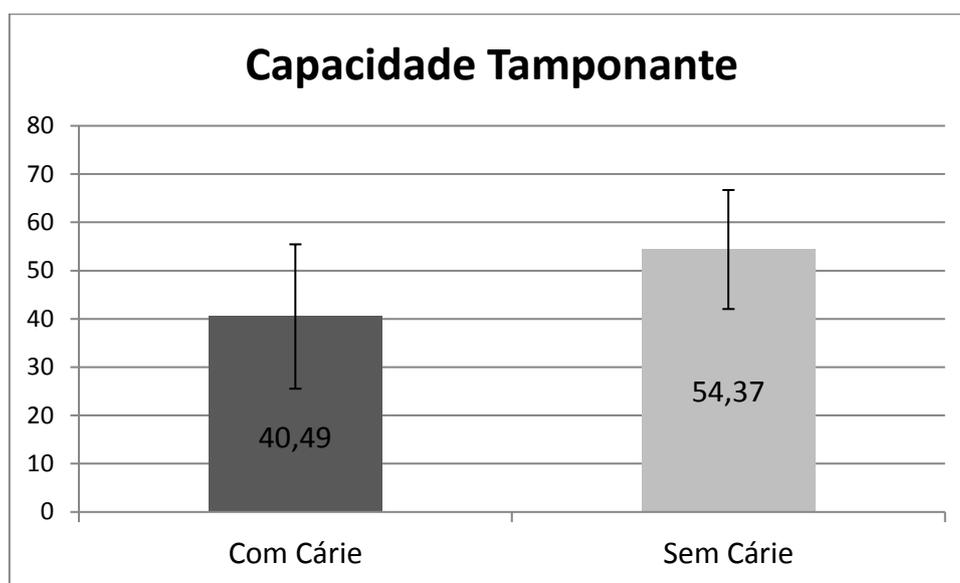


Figura 2 - Média com desvio padrão da Capacidade tampão salivar para os grupos com cárie (n=22) e sem cárie (n=21).

5.3 Concentração de AC VI na saliva

A análise da concentração da AC VI na saliva revelou que o grupo livre de cárie teve uma concentração de AC VI significativamente maior ($0,8363 \pm 0,1160$ N = 21) do que o grupo com cárie ($0,5122 \pm 0,07702$ N=22) .

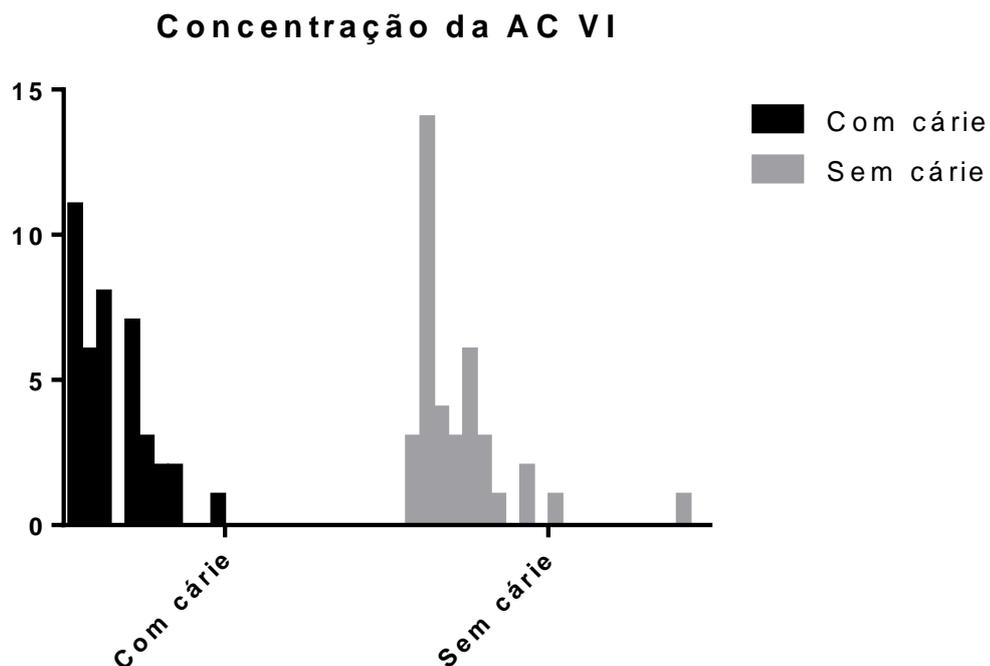


Figura 3 - Concentração de AC VI salivar para os grupos com cárie (n=22) e sem cárie (n=21).

5.4 Atividade da AC VI na saliva

Após a realização da análise da atividade da AC VI (Figura 4), os resultados obtidos mostraram que o grupo com cárie ($16,73 \pm 3,766$ N=22) teve a atividade da AC VI significativamente maior que o grupo sem cárie ($8,622 \pm 1,541$ N=21), $p= 0,0425$.

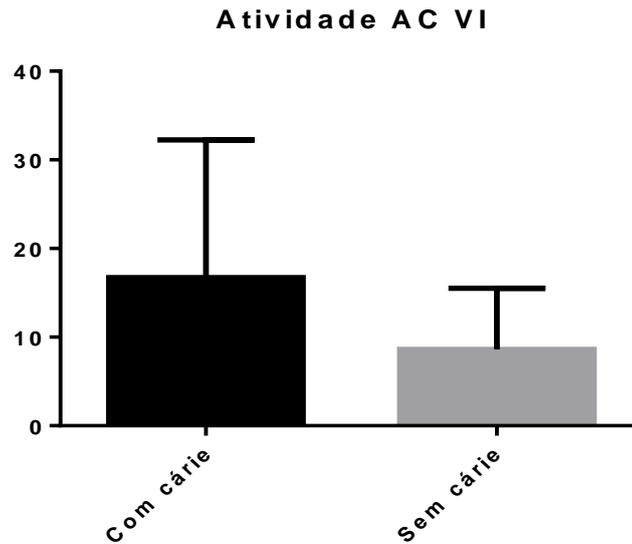


Figura 4 - Atividade da AC VI salivar para os grupos com cárie (n=22) e sem cárie (n=21).

5.5 Correlação entre a cárie dentária e todas as variáveis estudadas

A análise de correlação mostrou que o pH da saliva apresenta uma correlação negativa significativa com a cárie dentária ($r = -0,4243$, $p = 0,0491$). As demais variáveis estudadas não mostraram correlação significativa com a cárie dentária.

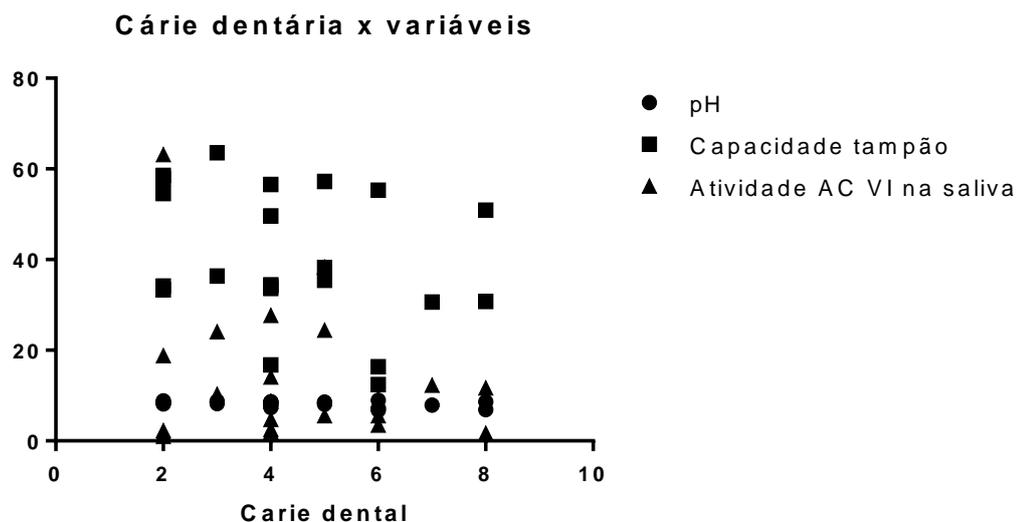


Figura 5 - Relação entre a cárie dental e as variáveis pH, capacidade tampão e atividade AC VI.

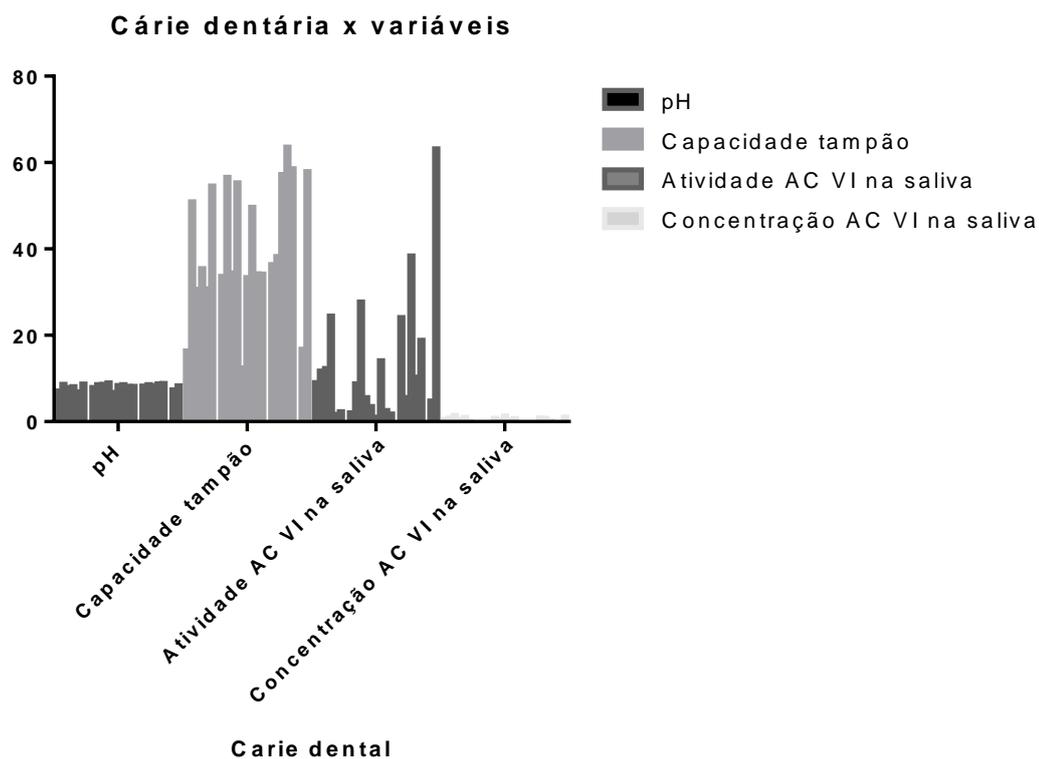


Figura 6 - Relação entre a cárie dental e as variáveis pH, capacidade tampão, atividade e concentração de AC VI.

6 DISCUSSÃO

O pH é o "potencial Hidrogeniônico", uma escala logarítmica que mede o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma determinada solução. A escala compreende valores de 0 a 14, sendo que o 7 é considerado o valor neutro; o valor 0 (zero) representa a acidez máxima e o valor 14 a alcalinidade máxima. As substâncias são consideradas ácidas quando o valor de pH está entre 0 e 7 e alcalinas (ou básicas) entre 7 e 14. O pH da saliva, por exemplo, possui valores entre 6,5 e 7,4.

Dos resultados obtidos, os valores de pH no grupo sem cárie são maiores, pois como não há presença de cárie o meio bucal possui menos micro-organismos atuando sobre carboidratos e, portanto, menos ácidos que causariam a queda no pH.

Já a capacidade tampão é a propriedade de a saliva manter o seu pH constante, graças aos seus tampões, que bloqueiam o excesso de ácidos e de bases. O elevado poder tamponante da saliva mantém a higidez da mucosa bucal e dos dentes. A saliva protege a cavidade bucal de duas maneiras: primeiro, evitando a colonização da boca por microrganismos potencialmente patogênicos, por negar-lhes as condições ambientais ideais, pois muitas bactérias necessitam de um pH específico para seu crescimento máximo; em segundo lugar, os microrganismos da placa podem produzir ácido a partir de açúcares, os quais, não sendo rapidamente tamponados e limpos pela saliva, podem desmineralizar o esmalte.

Da mesma forma que no pH, os resultados obtido da capacidade tampão, mostraram que os indivíduos sem cárie possuem um maior valor, porque devido ao fato de não possuírem uma meio ácido, há um maior efeito de neutralização ácida do meio bucal e, portanto, maior facilidade de se neutralizar o pH quando houver alguma alteração.

A anidrase carbônica VI (AC VI) é uma enzima salivar, responsável pela manutenção da capacidade tampão e remoção de ácidos, pois age na saliva e superfícies dentárias neutralizando os ácidos metabolizados pela ação dos micro-organismos sobre os carboidratos. Neste contexto, estudos previamente realizados tem sido sugerido que o mecanismo pelo qual a AC VI

protege os dentes, dá-se pela aceleração da remoção do ácido do microambiente local tanto da película quanto do biofilme dental (Leinonen et al. 1999; Kimoto et al. 2006). A AC VI presente na saliva é adsorvida à superfície dental e se torna ativa para catalisar a conversão de bicarbonato salivar e íons hidrogênio produzidos por bactérias cariogênicas na película do esmalte (Szabó, 1974), em dióxido de carbono e água (Leinonen et al. 1999). Assim, tem sido sugerido que o mecanismo pelo qual a AC VI protege os dentes, dá-se pela aceleração da remoção do ácido do microambiente local tanto da película quanto do biofilme dental (Leinonen et al. 1999; Kimoto et al. 2006). Neste sentido, pesquisas têm investigado a relação entre a concentração da AC VI salivar e a experiência de cárie (Kivelä et al. 1999b; Leinonen et al. 1999; Oztürk et al. 2008). Em relação à placa dentária, de acordo com Kimoto et al., 2006, a AC VI está concentrada na placa dental e Peres et al., 2010 (25) sugem que a presença de CA VI contribui para a neutralização do ácido da placa, quando a saliva é estimulada, pois neste caso, o tamponamento é realizado principalmente pelo bicarbonato.

A análise da concentração da AC VI mede a quantidade de enzima presente em cada amostra, já a análise da atividade da AC VI mede quantas enzimas estão ativas na saliva de cada criança. Com esses dois resultados, é possível observar a diferença entre as amostras, pois mesmo que a criança possua grande quantidade de enzimas, não significa que todas elas estarão em atividade.

Os resultados do presente estudo mostram que a concentração da AC VI foi significativamente maior na saliva das crianças com cárie quando comparadas com aquelas livres de cárie. No que diz respeito a concentração da AC VI na saliva e sua relação com a cárie dentária, a literatura apresenta resultados conflitantes. O estudo realizado por Oztürk et al. 2008, não encontrou diferença significativa na concentração da AC VI quando adults com cárie e livres de cárie foram comparados. Por outro lado, a investigação realizada por Kivelä et al. 1999, mostrou que uma baixa concentração da AC VI estava associada com um índice de cárie mais alto. Da mesma forma, Szabó em 1974, observou uma concentração mais alta da AC VI na saliva de crianças de 7 a 14 anos livres de cárie quando comparadas a aquelas com cárie.

Devido ao fato de a AC VI possuir esta ação e por essa diferença entre concentração e atividade, os resultados encontrados mostram que a concentração de AC VI é maior no grupo sem cárie, que é o grupo que apresenta o meio menos ácido e, portanto, possui mais enzimas. Já a atividade das enzimas, é maior no grupo com cárie, pois é o grupo que apresenta meio mais ácido e, portanto, requer maior função das enzimas para neutralizar o pH do meio.

7 CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados encontrados, conclui-se que as amostras com cárie e sem cárie apresentam diferenças nos níveis de concentração e atividade de AC VI. A concentração da enzima é maior no grupo sem cárie (meio menos ácido) e a atividade da enzima é maior no grupo com cárie (meio mais ácido), que é o grupo que requer maior atividade para neutralizar os ácidos produzidos pelas bactérias que causam a doença cárie.

REFERÊNCIAS*

- Assaf AV, de Castro Meneghim M, Zanin L, Tengan C, Pereira AC. Effect of different diagnostic thresholds on dental caries calibration - a 12 month evaluation. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006 Jun;34(3):213-9
- Becks H and Wainright WW. Human Saliva. *J Dent Res.* 1939;18:447-56.
- Feldstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J Biol Chem.* 1984 May 10;259(9):5447-53
- Frasseto F, Parisotto TM, Peres RC, Marques MR, Line SR, Nobre Dos Santos M. Relationship among salivary carbonic anhydrase VI activity and flow rate, biofilm pH and caries in primary dentition. *Caries Res.* 2012;46(3):194-200. doi:10.1159/000337275. Epub 2012 Apr 13
- Kaseda M, Ichihara N, Nishita T, Amasaki H, Asari M. Immunohistochemistry of the bovine secretory carbonic anhydrase isozyme (CA-VI) in bovine alimentary canal and major salivary glands. *J Vet Med Sci.* 2006 Feb;68(2):131-5
- Kasuya T, Shibata S, Kaseda M, Ichihara N, Nishita T, Murakami M, Asari M. Immunohistolocalization and gene expression of the secretory carbonic anhydrase isozymes (CA-VI) in canine oral mucosa, salivary glands and oesophagus. *Anat Histol Embryol.* 2007 Feb;36(1):53-7
- Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Arch Oral Biol.* 2006 Feb;51(2):117-22. Epub 2005 Jun 14
- Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Leinonen J, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol.* 1999 Oct 15;520 Pt 2:315-20. Review.
- Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res.* 1999 May-Jun;33(3):178-84

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Kivelä J, Laine M, Parkkila S, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and non-pregnant women. *Arch Oral Biol.* 2003 Aug;48(8):547-51

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159-74

Mau M, Kaiser TM, Südekum KH. Carbonic anhydrase II is secreted from bovine parotid glands. *Histol Histopathol.* 2010 Mar;25(3):321-9.
doi:10.14670/HH-25.321

Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J Med Chem.* 2007 Jan 25;50(2):381-8

Oztürk LK, Furuncuoğlu H, Atala MH, Uluköylü O, Akyüz S, Yarat A. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Nov;41(11):956-9. Epub 2008 Oct 31

Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut.* 1994 May;35(5):646-50

Parkkila S, Parkkila AK, Vierjoki T, Ståhlberg T, Rajaniemi H. Competitive time-resolved immunofluorometric assay for quantifying carbonic anhydrase VI in saliva. *Clin Chem.* 1993 Oct;39(10):2154-7

Szabó I. Carbonic anhydrase activity in the saliva of children and its relation to caries activity. *Caries Res.* 1974;8(2):187-91



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise da concentração e atividade da anidrase carbônica VI (CA VI) na saliva e biofilme de crianças em idade escolar", protocolo CAAE nº 01493112.4.0000.5418, dos pesquisadores Daniele de Cassia Rodrigues Picco, Carolina Vieira Marcondes e Marinês Nobre dos Santos Uchôa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 05 de setembro de 2017.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "Analysis of concentration and activity of carbonic anhydrase VI (CA VI) in saliva and plaque of children in school age", CAAE 01493112.4.0000.5418, of Daniele de Cassia Rodrigues Picco, Carolina Vieira Marcondes and Marinês Nobre Dos Santos Uchôa, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on September 05, 2017.

Prof. Fernanda Miori Pascon
Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparece como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.