



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

DARLLE SANTOS ARAUJO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA SALIVAR DE ADOLESCENTES  
COM SOBREPESO E OBESIDADE

Piracicaba  
2018

DARLLE SANTOS ARAUJO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA SALIVAR DE ADOLESCENTES  
COM SOBREPESO E OBESIDADE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do  
título de Doutora em Odontologia na Área de  
Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Paula Midori Castelo Ferrua

Coorientadora: Profa. Dra. Taís de Souza Barbosa

Este exemplar corresponde à versão final da Tese  
defendida pela aluna Darlle Santos Araujo e  
orientada pela Profa. Dra. Paula Midori Castelo Ferrua.

Piracicaba  
2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2014/24804-4; CNPq, 141062/2016-9

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

Araujo, Darlle Santos, 1988-  
Ar15a Avaliação da composição bioquímica e microbiológica salivar de adolescentes com sobrepeso e obesidade / Darlle Santos Araujo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Paula Midori Castelo Ferrua.  
Coorientador: Taís de Souza Barbosa.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Obesidade. 2. Saliva. 3. Microbiota. 4. Saúde bucal. I. Castelo, Paula Midori, 1978-. II. Barbosa, Taís de Souza, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the biochemical and microbiological composition of salivary adolescents with overweight and obesity

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Saliva

Microbiota

Oral health

**Área de concentração:** Odontopediatria

**Titulação:** Doutora em Odontologia

**Banca examinadora:**

Paula Midori Castelo Ferrua

Luciana Pellegrini Pisani

Luciano José Pereira

Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Carolina Steiner Oliveira Alarcon

**Data de defesa:** 19-02-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata DARLLE SANTOS ARAUJO aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. PAULA MIDORI CASTELO FERRUA

PROF. DR. LUCIANO JOSÉ PEREIRA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LUCIANA PELLEGRINI PISANI

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARINÊS NOBRE DOS SANTOS UCHÔA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CAROLINA STEINER OLIVEIRA ALARCON

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

Dedico o trabalho, o título e os anos de muita dedicação em memória a amiga **Sara Medeiros**, que tive o privilégio de conhecer na minha breve passagem pelo Rio de Janeiro. Sua partida para os braços do Pai me proporcionou um choque de realidade e reflexão a respeito do valor da vida. Você me proporcionou a maior lição de vida que já tive a oportunidade de vivenciar. Descanse em paz!

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Marcelo Knobel**; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**; à coordenadora do programa de pós-graduação da FOP-UNICAMP **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cinthia Pereira Machado Tabchoury**; ao coordenador do programa de pós-graduação em odontologia FOP-UNICAMP **Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim** agradeço a oportunidade de poder fazer parte como aluna de pós-graduação desta conceituada universidade.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), **CNPQ** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa e auxílio concedidos, respectivamente.

Às professoras do Departamento de Odontologia Infantil da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Profa. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Miori Pascon**, **Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Duarte Gavião**, **Profa. Dr<sup>a</sup>. Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, **Profa. Dr<sup>a</sup>. Carolina Steiner de Oliveira Alarcon** e **Profa. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Puppini Rontani** pelos ensinamentos e por toda a atenção e incentivo durante o curso.

Aos funcionários **Marcelo Maistro** e **Shirley Moreto** por se dedicarem a nos ajudar nas tarefas laboratoriais e burocráticas do departamento.

Aos professores e alunos que contribuíram com o trabalho, **Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca**, **Matheus Perez**, **Prof. Dr. Edimar Cristiano Pereira**, **Profa. Dr<sup>a</sup>. Marlise Inês Klein**, **Luana Salles**, **Aline Pedroni**, **Kelly Scudine**.

Aos meus colegas de turma **Micaela Cardoso**, **Lenita Lopes**, **Filipe Martins** e **Jossaria Sousa** pela convivência harmônica e construtiva. A todos os alunos de pós-graduação pelos momentos de incentivo e descontração.

Às amigas **Natália Joaquim**, **Micaela Cardoso**, **Lenita Lopes**, **Camila Nobre**, **Aline Laignier**, **Aline Pedroni** e **Maria Carolina** que de maneira especial me acolheram e ajudaram nos momentos de dificuldade deste longo período.

Às amigas **Catarina Cruz** e **Zanith Viviane** pela amizade de infância incondicional que me proporciona apoio, ânimo e coragem.

Aos amigos **Maísa Tavares** e **Rafael Reis** pela amizade linda que construímos em tão pouco tempo.

Ao meu namorado **Henrique Ordones** pela paciência e entusiasmo a cada passo e conquista da minha vida pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais **Aureliano Araujo Neto** e **Josefa Araujo** pelo apoio emocional forte e incondicional, que me traz paz e tranquilidade para conquistar meus objetivos.

À minha irmã **Dayane Araujo** por ser minha companheira de vida e dividir comigo as angustias e alegrias de todas as etapas de vida.

À minha orientadora, **Profa Dr<sup>a</sup>. Paula Midori Castelo** por ser esse ser humano incrível e acolhedor. Obrigada pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho, e por me proporcionar oportunidades e parcerias neste período. A senhora, com certeza, é fonte de referência e inspiração profissional e pessoal.

## RESUMO

Presume-se que alterações na composição bioquímica e microbiológica salivares podem refletir o estado inflamatório, carências nutricionais e dislipidemias associadas ao excesso de peso. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição salivar em termos de fluxo e pH salivares, colesterol, 7-cetocolesterol, 25-hidroxivitamina D2 e D3, ácido úrico, fósforo, ureia, cálcio, expressão do fator nuclear Kappa B, *Streptococcus mutans* e *Bifidobacteria* em 248 adolescentes (119 meninas/129 meninos) com idades entre 14 e 17 anos. A amostra foi selecionada de escolas públicas de Piracicaba (SP) e o exame físico envolveu as medidas de estatura, peso e porcentagem de gordura corporal por meio de um estadiômetro digital e análise de impedância bioelétrica a fim de classificar a amostra selecionada em eutrofia, sobrepeso e obesidade. Por meio do exame bucal, foi verificada a presença de dentição permanente completa e livre de cavidade de cárie, enquanto a presença de gengivite foi avaliada por meio de parâmetros clínicos e autorrelatado. Coletas de saliva estimulada e não-estimulada foram realizadas para a determinação do pH e fluxo salivar; colesterol, 7-cetocolesterol, ácido úrico e 25-hidroxivitamina D2 e D3 salivares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), enquanto as concentrações de fósforo, uréia e cálcio foram determinadas por método colorimétrico/enzimático e técnica automatizada. Por meio de RT-qPCR, avaliou-se o perfil de expressão do NF-Kappa B e, para análise microbiológica, o DNA extraído de saliva não estimulada foi submetido às reações de qPCR para verificar a proporção da espécie *Streptococcus mutans* e do gênero *Bifidobacteria* em relação à carga bacteriana total. Os dados foram analisados por meio dos testes Kolmogorov-Smirnov, Qui-quadrado, ANOVA de duas e três vias e regressão linear múltipla. Não houve diferença na frequência de sangramento gengival e gengivite entre os adolescentes classificados como eutrofia, sobrepeso e obesidade. Em 38% das amostras salivares foi possível detectar a expressão do NF-KB. Não houve diferença entre os grupos para os parâmetros bioquímicos 25-hidroxivitamina D2 e D3, colesterol, 7-cetocolesterol, fósforo, cálcio e a ureia. O ácido úrico salivar mostrou ser um importante marcador do acúmulo de gordura corporal e um modelo preditivo para porcentagem de gordura de acordo com a concentração de ácido úrico e o sexo foi proposto. O grupo de adolescentes com eutrofia apresentou menor porcentagem de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacteria* em relação a carga bacteriana total salivar quando comparado com os outros dois grupos (sobrepeso e obesidade) considerando os fatores sexo e presença de gengivite. A composição salivar em termos de ácido úrico, *Streptococcus mutans* e *Bifidobacteria* diferiu de

forma significativa entre adolescentes com e sem obesidade, demonstrando a utilidade do uso da saliva na detecção de desvios e monitoramento na prática clínica.

**Palavras-chave:** Obesidade, Saliva, Microbiota, Saúde Bucal

## ABSTRACT

It is assumed that changes in the biochemical and microbiological composition of saliva may reflect the inflammatory state, nutritional deficiencies and dyslipidemia associated with overweight. The objective of this study was to evaluate the salivary composition in terms of salivary flow and pH, cholesterol, 7-cetocholesterol, 25-hydroxyvitamin D2 and D3, uric acid, phosphorus, urea, calcium, NF-Kappa B, *Streptococcus mutans* and *Bifidobacteria* in 248 adolescents (119 girls/129 boys) aged 14 to 17 years. The volunteers were selected from public schools in Piracicaba (SP) and the physical examination involved measures of height, weight and body fat percentage by means of a digital stadiometer and bioelectrical impedance analysis, classifying them in eutrophy, overweight and obesity. Oral examination revealed the presence of a complete permanent dentition and free of decayed cavities, while the presence of gingivitis was evaluated through clinical and self-reported parameters. Stimulated and non-stimulated saliva collections were performed for the determination of pH and salivary flow; cholesterol, 7-cetocholesterol, uric acid and salivary 25-hydroxyvitamin D2 and D3 were determined by high-efficiency liquid chromatography (HPLC), while phosphorus, urea and calcium concentrations were determined by colorimetric/enzymatic method and automated technique. The expression of NF-Kappa B was evaluated by means of RT-qPCR and, for microbiological analysis, DNA extracted from unstimulated saliva was submitted to qPCR reactions to verify the proportion of *Streptococcus mutans* and *Bifidobacteria* in relation to the total bacterial load. Data were analyzed using Kolmogorov-Smirnov, Chi-square, two- and three-way ANOVA and multiple linear regression. There was no difference in the frequency of gingival bleeding and gingivitis among adolescents classified as eutrophy, overweight and obesity. NF-KB expression was detected in 38% of the salivary samples. There were no differences between groups for the biochemical parameters 25-hydroxyvitamin D2 and D3, cholesterol, 7-cetocholesterol, phosphorus, calcium and urea. Salivary uric acid showed to be an important marker of body fat accumulation and a predictive model for body fat percentage according to uric acid concentration and sex was proposed. The group of adolescents with eutrophy presented a lower percentage of *Streptococcus mutans* and *Bifidobacteria* in relation to total salivary bacterial load when compared to the other two groups (overweight and obesity), considering the factors sex and presence of gingivitis. The salivary composition in terms of uric acid, *Streptococcus mutans* and *Bifidobacteria* differed significantly between adolescents with and without obesity, showing the usefulness of saliva in the detection of deviations and monitoring in clinical practice.

**Key-words:** Obesity, Saliva, Microbiota, Oral Health

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral-alfa
NF-KB	- Fator nuclear kappa B
IL	- Interleucina
IFN- $\gamma$	- Interferão-gama
MIP-1 $\beta$	- Proteína inflamatória de macrófagos
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
RPM	- Rotações por minuto
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
TE	- Tris EDTA
PMA	- Propídeo monoazida
Ct	- Critical threshold cycle
QQ-plot	- Quartil-quartil-plot
Ln	- Logaritmo natural
%GC	- Porcentagem de gordura corporal
25-(OH)-D	- 25 hidroxivitamina
IPC	- Índice periodontal comunitário
VIGITEL	- Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>ANEXO 1- CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	75

## 1. INTRODUÇÃO

A prevalência de excesso de peso aumentou rapidamente no mundo, sendo considerado um importante problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Pinheiro et al., 2004). Um estudo liderado pelo *Imperial College London* e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que o número de obesos com idade entre cinco e 19 anos cresceu mais de dez vezes, de 11 milhões em 1975 para 124 milhões em 2016 (NCD Risk Factor Collaboration, 2017). No Brasil, dados publicados pela VIGITEL em 2017 mostraram que mais da metade da população brasileira está com peso acima do recomendado e 18,9% dos brasileiros estão obesos. Além disso, constatou-se o aumento das doenças crônicas como diabetes e hipertensão (Vigitel Brasil, 2016). Uma pesquisa conduzida com crianças entre 8 e 10 anos de idade do município de Piracicaba mostrou que daquelas incluídas no estudo, 38,7% apresentavam excesso de peso (Araujo et al., 2017).

A obesidade é uma condição crônica que envolve fatores sociais, comportamentais, ambientais, culturais, metabólicos e genéticos, sendo caracterizada pelo desequilíbrio energético prolongado que resulta em acúmulo de gordura corporal (Francisch et al., 2000) e está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau, que predispõe à resistência à insulina e ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2. Estudos mostraram que esta condição também pode estar relacionada a alterações nas características orais específicas do indivíduo, como o comportamento mastigatório, secreção e composição salivar (Tremblay et al., 2012; Pedroni-Pereira et al., 2016). O estudo de Pannunzio et al. (2010) observou que crianças com sobrepeso e obesas apresentaram alterações nas concentrações salivares de fosfato, ácido siálico e proteínas, condições estas favoráveis ao desenvolvimento de cárie dentária. Sendo a obesidade uma condição relacionada ao desequilíbrio energético, dislipidemia e carências nutricionais, é de interesse verificar a possibilidade do uso da saliva como meio diagnóstico dessas alterações.

A saliva é produzida principalmente por três pares de glândulas: parótidas, submandibulares e sublinguais. Juntas, essas glândulas secretam de 90 a 93% de toda a saliva. O restante é produzido pelas glândulas salivares menores, as quais estão distribuídas pela cavidade oral (Edgar 1990; Holmberg e Hoffman 2014). A mistura dos fluidos orais é conhecida como saliva total que, além dos constituintes de origem salivar, também contém fluido crevicular, células sanguíneas, bactérias e seus produtos, células epiteliais descamadas, vírus, fungos, restos alimentares e secreções provenientes do trato respiratório (Kaufman e Lamster, 2000). Muitas são as funções dessa secreção: digestão, lubrificação, excreção, manutenção da integridade da mucosa e dos dentes, reparo dos tecidos moles, equilíbrio ecológico, limpeza,

função antimicrobiana, manutenção do pH e controle do nível de hidratação (Carpenter et al 2013). Cerca de 99% da saliva produzida é composta por água e 1% por proteínas, moléculas orgânicas menores e eletrólitos. Esses elementos constituintes estão diretamente envolvidos não apenas nas funções protetoras como lubrificação e controle de microrganismos, mas também nas funções motoras como facilitar a mastigação, a deglutição e a fala (Sreebny et al., 1992; Nicolau, 2009). Também, inúmeras substâncias nocivas ao organismo e alguns medicamentos são excretados pela saliva, que assim funciona como um veículo de desintoxicação (Fenoll-Palomares et al, 2004).

O fluxo salivar é denominado não estimulado quando nenhum estímulo externo ou farmacológico é utilizado; já o fluxo estimulado necessita de estímulos mecânicos, gustatórios ou agentes farmacológicos (Nauntofte et al., 2005). Aproximadamente 60% da saliva total é produzida em condições de repouso e reflete a velocidade do fluxo basal, ou seja, é a mistura de secreções que entram na boca na ausência de estímulos exógenos. Está presente na cavidade oral por cerca de 14 horas diárias e é a secreção que recobre os tecidos orais, fornecendo muito da sua proteção. A saliva estimulada, que também exerce ação de proteção, está presente na cavidade oral por cerca de duas horas no dia e associa-se com a função da saliva sobre os alimentos (Sreebny, 2000). Em 2006, Lewis reportou que para a análise dos componentes bioquímicos da saliva o ideal é utilizar saliva não estimulada.

A secreção salivar total diária varia de 500 a 1500 ml em pessoas saudáveis e o volume médio que está presente na cavidade bucal é de aproximadamente 1,0 ml, porém, com uma grande variabilidade de pessoa para pessoa. Para a saliva não estimulada, a taxa de secreção normal é de 0,25ml/min, enquanto o volume mínimo secretado cresce até a quantia de 1,0ml/min sob estimulação (Humphrey e Williamson, 2001). De acordo com Giannobile (2000), a saliva é uma fonte valiosa de informações clinicamente relevantes, uma vez que seus múltiplos componentes não apenas protegem a integralidade dos tecidos bucais, mas também funcionam como biomarcadores de doenças e condições sistêmicas do indivíduo. Mudanças qualitativas na composição desses biomarcadores têm sido utilizadas na identificação de pacientes com maior susceptibilidade a certas doenças, na identificação de locais com doenças ativas, na predição de locais que tem maior atividade da doença no futuro e/ou servindo como ferramenta de monitoração da efetividade de terapias (Lee et al, 2009; Moura et al, 2007).

A utilização de marcadores salivares no estudo de doenças sistêmicas e do estresse tem obtido crescente interesse em pesquisas da área biomédica e psicológica. Isto porque as amostras de saliva são obtidas por procedimento simples, não invasivo, livre de estresse, podendo ser realizados em ambulatório ou na própria residência do indivíduo, com obtenção de

múltiplas coletas (Castro e Moreira, 2003). Diversos são os analitos investigados e, nos últimos anos, ocorreram avanços no diagnóstico salivar nas áreas bioquímica, genômica, proteômica e metabolômica (Wong, 2006).

O ácido úrico é produzido no organismo como resultado da quebra de moléculas de purina – proteína contida em muitos alimentos - por ação da xantina oxidase; após, as purinas são degradadas e transformadas em ácido úrico. Parte dele permanece no sangue e o restante é eliminado pelos rins. A determinação da concentração de ácido úrico plasmático e salivar reflete o metabolismo proteico do indivíduo e casos de hiperuricemia podem estar associados à adolescência (Cardoso et al., 2013) e à síndrome metabólica (Soukup et al., 2012), predispondo o indivíduo a doenças cardiovasculares.

A vitamina D é um hormônio esteroide com conhecido papel no metabolismo ósseo e do cálcio e seu receptor é encontrado em diversos tecidos do corpo humano. A vitamina D<sub>3</sub> é formada na pele exposta à radiação ultravioleta B, enquanto a vitamina D<sub>2</sub> é derivada de vegetais e produzida exogenamente pela irradiação do ergosterol, entrando na circulação pela dieta (Zhang e Naughton, 2010). A deficiência de vitamina D ocorre por ingestão não apropriada do nutriente ou por falta de exposição solar. Em adultos, a obesidade abdominal e a síndrome metabólica associaram-se significativamente com a deficiência de vitamina D (Moy e Bulgiba, 2011); uma possível explicação seria o fato de a gordura subcutânea, capaz de armazenar vitamina D, venha a sequestrar grande quantidade do esteroide produzido, o que resultaria em menor liberação para a circulação (Wortsman et al., 2000).

Os lipídios biologicamente mais relevantes são os fosfolípidos, o colesterol, triglicérides e ácidos graxos. O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Como lipídio insaturado, o colesterol está sujeito à oxidação gerando óxidos biologicamente ativos que podem participar de processos citotóxicos (Ohtani et al., 1996) e aterogênicos (Peng et al., 1991). O acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) no compartimento plasmático resulta em hipercolesterolemia e estão associadas com a formação de ateromas nas paredes das artérias ainda na infância. Durante o processamento, os alimentos são expostos a vários fatores geradores destes óxidos, como oxigênio, calor, radiação, entre outros (Moura e Tenuta-Filho, 2002).

A obesidade foi primeiramente reconhecida como uma condição de inflamação crônica de baixo grau no início da década de 1990 quando se constatou o aumento da expressão do gene que codifica para a citocina pró-inflamatória no tecido adiposo, denominada fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), e redução da sensibilidade à insulina (Hotamisligil et al., 1993; Bastos

et al., 2009). Em indivíduos com obesidade, o tecido adiposo aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatória; entre os mecanismos moleculares envolvidos destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB), que pode ser ativado por meio de espécies reativas de oxigênio, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1) ou ácidos graxos saturados e, assim, aumenta a expressão de diversos genes no adipócito que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória. Sendo assim, o desequilíbrio do NF-KB pode elevar a produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando um grande número de desordens crônicas relacionadas à inflamação (Beinke e Ley, 2004).

A obesidade também tem sido associada à microbiota oral e, mais especificamente, à doença periodontal (Pischon et al., 2007). Dentre os poucos estudos encontrados, verificou-se que indivíduos com obesidade apresentaram alterações na microbiota oral em relação aos eutróficos; o estudo de Zeigler et al. (2012) observou alterações na contagem de bactérias do fluido crevicular de adolescentes, enquanto alterações específicas na composição bacteriana salivar foram encontradas em mulheres com sobrepeso (Goodson et al., 2009). O estudo de Arimatsu et al. (2014) mostrou que a inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis* em modelos experimentais levou a alterações na microbiota intestinal, resistência à insulina e produção de fatores inflamatórios. Goodson et al. (2009) sugeriram três hipóteses a serem testadas para se verificar a participação da microbiota oral no ganho de peso: aumento da eficiência metabólica, aumento do apetite ou, ainda, o redirecionamento do metabolismo energético.

Sendo assim, é de interesse verificar quais marcadores salivares estão mais fortemente associados com o excesso de peso na adolescência, dentre eles os marcadores do metabolismo de proteínas e lipídios, níveis de vitamina D, marcadores inflamatórios e da microbiota oral, e quais deles seriam capazes de detectar desvios e monitorar o estado nutricional do adolescente.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### *Caracterização da saúde periodontal e expressão de citocinas inflamatórias na obesidade*

Em um estudo que avaliou jovens, indivíduos de meia idade e idosos observou-se que na população mais jovem a obesidade geral e abdominal estava associada ao aumento da prevalência da doença periodontal, concluindo que a obesidade poderia ser um fator de risco potencial para esta doença (Al-Zahrani et al., 2003). Um estudo transversal com indivíduos de 18 anos ou mais encontrou correlação positiva entre obesidade e doença periodontal, corroborando estes achados (Wood et al., 2003). O mecanismo biológico proposto se apoia no aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 encontrados no líquido crevicular de adolescentes com obesidade em comparação com indivíduos com peso normal, o que refletiria uma reação hiperinflamatória no tecido periodontal destes indivíduos (Lundin et al., 2004; Modéer et al., 2009). Por outro lado, alguns autores (Saito e Shimazaki, 2007; Ylöstalo et al., 2008) ressaltaram que as evidências até agora disponíveis que apoiam a presença de um mecanismo biológico comum entre o excesso de peso e a doença periodontal não são totalmente convincentes.

Entre crianças e adolescentes, a doença periodontal mais prevalente é a gengivite induzida por biofilme (Lopez et al., 2006); porém, a relação entre periodontite e obesidade em jovens não foi suficientemente investigada na literatura. Reeves et al. (2006) analisaram esta possível relação em adolescentes e adultos jovens com idades entre 17 e 21 anos; observaram que o aumento de 1 kg no peso associou-se ao aumento de 6% no risco de doença periodontal. Da mesma forma, cada aumento de 1 cm na circunferência da cintura associou-se ao aumento de 5% no risco de periodontite. Entretanto, não houve relação entre esses parâmetros nos indivíduos de 13 a 16 anos.

Uma revisão sistemática sobre obesidade pediátrica e doença periodontal conduzida por Katz et al., em 2010, relatou associações não conclusivas porque apenas alguns artigos foram elegíveis para inclusão. Adicionalmente, uma meta-análise mostrou uma associação positiva entre a obesidade e o desenvolvimento da doença periodontal (Chaffee et al., 2010); no entanto, o autor ressaltou como limitação a existência de poucos estudos longitudinais de qualidade. Saxlin et al. (2010) conduziram um estudo longitudinal no qual observaram não haver evidências de que o sobrepeso e a obesidade pudessem ser fatores de risco significativos para o surgimento da doença periodontal. Estudos prospectivos adicionais para quantificar ou mesmo entender os mecanismos desta associação são necessários e não há evidências

suficientes para fornecer diretrizes aos clínicos sobre o manejo da periodontite em indivíduos com sobrepeso e obesidade.

Por outro lado, Modéer et al. (2010) investigaram se a obesidade pediátrica estaria associada à doença periodontal e propuseram o IMC ajustado para idade e sexo como fator de risco para doenças periodontais, incluindo a presença de bolsas periodontais; adicionalmente, Franchini et al. (2011) apresentaram resultados que sublinharam o efeito negativo do excesso de peso e do *status* da obesidade na saúde do tecido gengival de indivíduos jovens. Uma revisão sistemática de Suvan et al. (2011) observou heterogeneidade entre os estudos, mas todos relataram uma maior probabilidade de periodontite entre os indivíduos obesos. Em 2015, Li et al. conduziram uma meta-análise e sugeriram que a obesidade pode estar relacionada a alguns sinais de doenças periodontais em crianças e adolescentes, particularmente no que diz respeito à inflamação gengival.

Por fim, Saxlin et al. (2011) mostraram, em uma ampla pesquisa, que a obesidade está associada à doença periodontal, mas que a obesidade não era um risco para o desenvolvimento de infecção periodontal para os 396 indivíduos obesos incluídos em um subgrupo e seguidos por 4 anos. Como afirmado por Moura-Grec et al. (2014), os fatores de risco que predispõem indivíduos com obesidade à doença periodontal devem ser melhor esclarecidos para elucidar a direção dessa associação e mais estudos são necessários para saber se de fato a obesidade agrava o processo inflamatório gengival (Franks & Atabaki-Pasdar, 2017).

Visser (1999) observou que um maior IMC estava associado a maiores concentrações séricas de proteína C-reativa, mesmo entre adultos jovens de 17 a 39 anos, o que foi posteriormente corroborado por outros estudos (Rexrode et al., 2003, Nazmi et al., 2008), sugerindo assim um estado de inflamação sistêmica de baixo grau em indivíduos com excesso de peso. Pischon et al. (2007) sugeriram que a secreção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo poderia ser desencadeada por lipopolissacarídeos de bactérias periodontais gram-negativas, levando a dislipidemia hepática e redução na sensibilidade à insulina. Esta reação seria aumentada em indivíduos com maiores quantidades de tecido adiposo e agravaria a condição inflamatória sistêmica predisponente ao estabelecimento ou agravamento de doenças inflamatórias, como a periodontite. No estudo de Nazmi (2008) que avaliou diversas variáveis correlacionadas a níveis de proteína C reativa encontrou associações significativas com a idade indicadores socioeconômicos, *status* de obesidade, tabagismo, ingestão de gordura e álcool e transtorno psiquiátrico menor. As evidências mostram, dentre outras vias de inflamação, o caminho de sinalização de cadeia leve de do NF-KB.

Tantiwong (2010) e Oliveira (2011) afirmaram estar bem estabelecido que a via IKK $\beta$ /NF-KB é ativada em tecidos de indivíduos e animais obesos. Um estudo que avaliou a obesidade abdominal e inflamação sistêmica, concluiu que as medidas clínicas da adiposidade abdominal fornecem dados que elucidam o estado inflamatório sistêmico dos pacientes (Brooks et al., 2010). Um estudo com ratos obesos conduzido por Mozaffari (2011) mostrou que estes ratos possuíam menor sensibilidade à insulina, aumento da proporção de NF-KB e aumento do nível de molécula de adesão intercelular-1. No estudo de Kaïdashev et al. (2012) os autores afirmaram que a correlação entre a resistência à insulina, inflamação crônica, hipertensão arterial, disfunção endotelial e dislipidemia tem sido indicada como manifestações de um processo patológico, cuja base molecular central é a ativação do NF-KB. Um estudo com camundongos adultos relatou que a via IKK $\beta$ /NF-KB interrompe as células-tronco neuronais hipotalâmicas adultas para mediar um mecanismo neurodegenerativo de obesidade e pré-diabetes (Li et al., 2012).

Em 2012, Williamson et al. descreveram a presença de 27 biomarcadores da inflamação, incluindo IL-1 $\beta$ , agonista do receptor de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17; estes mesmos autores observaram que, dentre as 27 citocinas testadas, três citocinas (IL-6, IFN- $\gamma$  e MIP-1 $\beta$ ) encontradas em amostras de saliva apresentaram correlação significativa com níveis plasmáticos. Em 2013, sugeriu-se que a falta de correlação entre alguns biomarcadores de citocinas encontrados na saliva e no plasma pode ser devido ao impacto do ambiente oral e à influência da imunidade local. Também foi indicado que a variabilidade nos níveis de citocinas pode ser devido a padrões diurnos distintos, refletindo o tempo de coleta de saliva (Izawa et al., 2013; Riis JL et al., 2014). Um estudo em adolescentes saudáveis (11-17 anos) observou que citocinas, incluindo GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , adiponectina e cotinina eram detectáveis na saliva. No entanto, as concentrações de citocinas, exceto IL-8 e IL-1 $\beta$ , foram inferiores aos valores séricos (Riis et al., 2014).

### ***Caracterização fisicoquímica salivar em indivíduos com excesso de peso***

O fluxo salivar, a capacidade tampão e as concentrações de cálcio, fosfato e fluoreto são importantes para a saúde bucal e prevenção de doenças bucais (Hashizume et al., 2015). No entanto, alterações metabólicas podem influenciar a síntese, composição e secreção de saliva. Alguns estudos com base em número limitado de indivíduos com obesidade relataram um padrão salivar normal em comparação com indivíduos com eutrofia (Powers et al., 1982; Epstein et al., 1996). Segundo Navazesh et al. (1996), as doenças sistêmicas, assim como a

presença e a duração de tratamentos farmacológicos afetam significativamente o fluxo salivar estimulado e não estimulado. De acordo com outro estudo, crianças com obesidade apresentaram menor pH na saliva estimulada em comparação com crianças com sobrepeso, embora os valores de pH salivar encontrados nos três grupos avaliados estivessem dentro da faixa considerada normal (Humphrey e Williamson, 2001).

Em 2004, Fenoll-Palomares et al. encontraram valores normais para a capacidade tampão da saliva e taxa de fluxo salivar em pacientes com obesidade. No entanto, afirmaram que uma taxa de fluxo salivar reduzida nestes pacientes poderia estar relacionada aos efeitos colaterais de vários medicamentos utilizados para tratar doenças concomitantes à obesidade. Uma taxa de fluxo salivar muito baixa associada ao  $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$  foi encontrada em uma coorte de adultos com menos de 50 anos de idade (Flink et al., 2008). Os fatores que influenciam o fluxo e a composição salivares não estimulados incluem hidratação individual, postura corporal, iluminação, tabagismo, ritmos circadianos e medicamentos. Marsicano et al. (2008) analisaram o fluxo salivar de pacientes candidatos a gastroplastia (cirurgia bariátrica) e a média encontrada foi de 0,66 m/L por minuto. Foi encontrada uma relação significativa entre a redução do fluxo salivar e o sexo, sendo o feminino o mais afetado. De acordo com Flink (2008), a hipossalivação foi prevalente em adultos jovens de IMC elevado, e em indivíduos com mais de 50 anos, essa alteração está associada ao uso de medicamentos. Em crianças e adolescentes portadores de diabetes do tipo 1, observou-se redução tanto no pH salivar quanto no fluxo de saliva não estimulada (Moreira et al., 2009).

O estudo de Modéer et al. (2010) encontrou alteração no fluxo salivar de adolescentes com obesidade e os resultados indicaram que a obesidade infantil esteve associada a uma taxa de fluxo reduzida de saliva estimulada. Um estudo envolvendo 90 escolares brasileiros de 7 a 10 anos não encontrou diferença na taxa de fluxo de saliva entre os grupos sobrepeso, obesidade e controle; no entanto, apenas o grupo controle mostrou um valor médio considerado dentro da faixa normal (Pannunzio et al., 2010). Um estudo que avaliou o fluxo salivar e secreção de citocinas pró-inflamatórias sugeriu que as alterações nas propriedades da saliva eram mais evidentes nos casos em que o diabetes estava associado por um período longo de tempo (Surdacka et al., 2011). Grec (2012) avaliou o fluxo salivar de pacientes candidatos a cirurgia bariátrica encontrou hipossalivação em 46,7% dos indivíduos e apenas 28,9% apresentaram fluxo salivar normal. Um estudo realizado em mulheres avaliou a associação entre o pH e componentes da síndrome metabólica (Tremblay et al., 2012). Os resultados mostraram que o pH salivar diminuiu quando o número de componentes associados à síndrome metabólica aumentou e a correlação entre pH salivar e as variáveis da síndrome metabólica foi mais forte

em mulheres no período de pré-menopausa. Yamashita (2013) ao estudar obesidade mórbida em pacientes com média de idade de 37 anos, encontrou menor fluxo salivar no grupo obesidade quando comparado aos indivíduos eutróficos. Este tipo de investigação é importante pois em indivíduos com parâmetros salivares inorgânicos alterados, baixo pH salivar e taxa de fluxo salivar reduzida, o biofilme pode ser mais acidogênico, podendo ocorrer desmineralização do esmalte; portanto, esses indivíduos são mais propensos a uma saúde bucal comprometida (Fiyaz et al., 2013).

Campos et al. (2014) compararam a secreção salivar de crianças de pouca idade com eutrofia, sobrepeso e obesidade e encontraram que o fluxo de saliva e o pH não diferiram entre os grupos. Corroborando estes achados, Tong et al. (2014) não encontraram diferenças significativas no fluxo de saliva e capacidade tampão em crianças com diferentes composições corporais. Um estudo que avaliou pacientes submetidos a gastroplastia não observou diferença no pH salivar antes e após seis meses de cirurgia (Hashizume et al., 2015), enquanto em indivíduos com obesidade mórbida, observou-se um fluxo de saliva estimulada e não estimulada reduzidos (Knaš et al., 2016). O estudo conduzido por Matczuk et al. (2016) observou que uma dieta rica em gordura foi capaz de alterar significativamente a composição lipídica das glândulas salivares, causando redução do pH salivar.

Em 2008, o estudo de Higashi et al. afirmou existir uma relação linear positiva entre o nível sérico de 25-(OH)-D<sub>3</sub>, que é convencionalmente usado como meio de avaliação do estado da vitamina D e o nível salivar de 25-(OH)-D<sub>3</sub> medido utilizando-se a cromatografia líquida sensível de eletro-pulverização - método de espectrometria de massa. O método também permitiu a detecção do aumento do nível salivar de 25-(OH)-D<sub>3</sub> após a suplementação de vitamina D<sub>3</sub>. Um estudo que avaliou a concentração de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> em saliva estimulada e não estimulada pontuou que a utilização de saliva estimulada deveria ser feita com precaução, já que a concentração salivar do analito poderia sofrer modificação (Higashi et al., 2013). Sadiya et al. (2014) encontraram associação de 25-(OH)-D no sangue com o IMC, circunferência da cintura, massa gorda, marcadores de homeostase de cálcio e parâmetros cardiometabólicos sugerindo um papel da vitamina D no desenvolvimento de processos relacionados à doença cardiometabólica. Um estudo piloto realizado por Shah (2015) visou determinar se a suplementação de vitamina D poderia reduzir marcadores de inflamação e risco cardiovascular. Os resultados permaneceram inconclusivos e o autor destacou a necessidade de novos estudos dose-resposta. Um editorial sobre vitamina D e obesidade ressaltou que a relação entre a obesidade e insuficiência de vitamina D deveriam continuar a ser examinados e

estudados, ao passo que a melhor abordagem era reduzir o problema o quanto antes, evitando o desenvolvimento da obesidade adolescente por completo (Bialo et al., 2015).

Um estudo conduzido em adultos porto-riquenhos afirmou que aqueles com maior IMC, circunferência da cintura apresentaram concentrações plasmáticas de vitamina D significativamente menor (González et al., 2015). Shantavasinkul (2015) afirmou a necessidade de estudos que relacionassem a vitamina D e massa muscular esquelética já que, segundo o autor, os estudos anteriores demonstraram apenas relação entre vitamina D e adiposidade. Os resultados afirmaram que a vitamina D era um preditor independente da porcentagem de massa muscular esquelética de acordo com a porcentagem de gordura corporal. Outra pesquisa sugeriu que a insuficiência de 25-(OH)-D estava relacionada à síndrome metabólica através do distúrbio do metabolismo do triacilglicerol (Kwon et al., 2015).

Cunha (2015) afirmou que os estudos encontrados na literatura indicavam uma associação entre cálcio e vitamina D com obesidade infantil. Outro estudo conduzido por Wang (2016) que avaliou a relação entre resistência à insulina e vitamina D foi encontrado em pessoas com obesidade, tanto em adultos como em crianças. No entanto, o autor afirmou que poucas investigações similares se concentraram na população com peso normal e os dados permaneceram escassos em pediatria, além de apresentarem resultados contraditórios. Estudos atuais consideram que a obesidade está significativamente associada a baixa concentração de 25-(OH)-D séricas (Liu et al., 2016; Moore et al., 2016), mesmo em crianças e adolescentes. Um estudo realizado em adultos brasileiros entre 20-59 anos sugere que o IMC interage com níveis séricos de 25-(OH)-D, modulando a resposta inflamatória e afetando os níveis plasmáticos de IL-6, TNF- $\alpha$  e adiponectina.

Um estudo que avaliou o nível de colesterol sérico e salivar de adultos saudáveis concluiu que em adultos saudáveis, a concentração de colesterol salivar refletia a concentração sérica em certa medida e pode ser usada para selecionar indivíduos com altos níveis de colesterol sérico (Karjalainen et al., 1997). O estudo de Al-Rawi et al. (2011) que avaliou a saliva de voluntários com diabetes tipo 2 afirmou que as concentrações de colesterol e triglicérides no soro e na saliva foram superiores no grupo com diabetes em comparação com o grupo controle. Outra pesquisa conduzida por Giuseppe et al., em 2015, determinou a presença de colesterol em amostras salivares e evidenciou a correlação entre os níveis salivares de colesterol e no soro, além de mostrar maiores níveis salivares de colesterol nos indivíduos com sobrepeso/obesidade em relação aos controles. Portanto, concluiu que a amostra salivar pode ser funcionalmente equivalente ao soro no monitoramento do risco cardiovascular em indivíduos com sobrepeso/obesidade.

Subramaniam et al. (2015) concluíram que os níveis de colesterol salivar e triglicérides foram significativamente maiores em crianças (12 a 16 anos) com diabetes mellitus tipo 1. Em 2016, Liu et al. encontraram que a concentração sérica de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baixa densidade, glicemia e insulina em jejum e 25-(OH)-D apresentaram diferenças significativas entre os grupos de crianças e adolescentes com e sem obesidade.

Mesmo durante a adolescência autores têm demonstrado os prejuízos à saúde causados pela adiposidade corporal elevada. Bouet et al. (2012) observaram alterações na pressão arterial, ácido úrico e outros marcadores em adolescentes que apresentavam peso elevado. Tsunoda et al. (2002) verificaram os efeitos da dieta hipocalórica em indivíduos portadores de sobrepeso. Esse tipo de dieta diminuiu de maneira indireta as concentrações séricas de ácido úrico por ter melhorado a sensibilidade à insulina nestes indivíduos, e isso ocorreu independentemente da mudança no peso corporal ou na pressão arterial. Um estudo que visou determinar a concentração de ácido úrico na saliva humana por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica amperométrica concluiu que o método pode ser usado na rotina para determinação diagnóstica de ácido úrico na saliva humana. O estudo cita a importância da quantificação precisa do ácido úrico na saliva humana para diagnóstico e terapia de gota, hiperuricemia, síndrome de Lesch-Nyhan, dentre outras patologias (Inoue et al., 2003).

O estudo de Kim et al. (2009) obteve sucesso ao determinar simultaneamente metabólitos de ácido úrico na urina humana, utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massa, concluindo que os métodos podem ser úteis na identificação de caminhos de estresse oxidativo em outras amostras biológicas (Kim et al., 2009). Um estudo que avaliou a prevalência da obesidade infantil e sua associação com alterações em marcadores séricos em uma população de escolares do interior de São Paulo encontrou diferença significativa na concentração de ácido úrico entre os grupos com e sem sobrepeso (Pereira et al., 2009). Em 2011, Barbosa et al. afirmaram que maiores concentrações de ácido úrico se associaram ao pior perfil de risco cardiovascular e ao pior perfil de função renal em uma amostra populacional não referenciada. Também, em um estudo que avaliou as concentrações séricas de ácido úrico e parâmetros dietéticos, antropométricos e bioquímicos de adultos selecionados para um programa de mudança de estilo de vida, encontrou que indivíduos com IMC e porcentagem de gordura elevados tinham maiores chances de apresentar ácido úrico elevado, medido em soro pelo método química seca (Oliveira et al., 2010). Soukup et al. (2012) observaram que a concentração de ácido úrico foi significativamente maior em pacientes adultos com síndrome metabólica.

Em pacientes com diabetes tipo 2, a avaliação salivar também encontrou concentrações de ácido úrico significativamente elevadas (Pendyala et al., 2013). Um estudo transversal que incluiu 129 crianças e adolescentes observou uma associação entre os níveis de ácido úrico plasmático com componentes da síndrome metabólica e pressão arterial sistólica (Cardoso et al., 2013). Desai et al. (2014) afirmaram que os marcadores salivares de estado antioxidante, incluindo o ácido úrico, são promissores e precisam ser mais bem explorados. No estudo de Miranda et al. (2015) que incluiu 245 crianças e adolescentes entre 8 e 18 anos com obesidade, o aumento no nível sérico de ácido úrico apresentou correlação positiva com a resistência insulínica em crianças e adolescentes obesos.

Silva et al. (2015) encontraram que as concentrações de ácido úrico estavam positivamente relacionadas à ocorrência de síndrome metabólica e seus componentes, com diferenças entre os sexos. Os resultados do estudo indicaram também que o ácido úrico sérico é um potencial biomarcador para pacientes com risco cardiometabólico (Silva et al., 2015). Uma metanálise que avaliou a concentração de ácido úrico sérico e a presença de diabetes tipo 2 concluiu que o ácido úrico sérico estava associado de forma independente ao desenvolvimento de diabetes melitos tipo 2, tanto em homens como em mulheres, em idosos e jovens, e a resistência à insulina aumentou à medida que a concentração de ácido úrico sérico basal aumentou (Xu et al., 2016). Em contrapartida, Knaš et al. (2016) observaram que o valor médio de ácido úrico na saliva não estimulada e estimulada em pacientes obesos mórbidos foi significativamente menor do que no grupo controle.

Um estudo recente que utilizou saliva e soro de 129 adultos jovens divididos em eutrofia, sobrepeso e obesidade mostraram uma correlação entre os níveis de ácido úrico salivares e séricos (Chielle et al. 2017). Valores altos de ácido úrico sérico foram observados em adolescentes com sobrepeso e obesos (Ghomari-Boukhatem et al., 2017). Barroso (2017), em um estudo que avaliou o ácido úrico em saliva por meio do método enzimático de pacientes hipertensos antes e após o tratamento, padronizou a utilização do ácido úrico como marcador do estresse oxidativo na saliva. Um estudo recente conduzido por Martínez et al. (2017) examinou as diferenças do sexo, idade, ácido úrico salivar e IMC em uma amostra de crianças e adultos de origem mexicana. Com os resultados, os autores criaram um modelo consistente de interação para examinar se o sexo modificou o efeito do IMC e ácido úrico salivar em jovens e adultos, controlando-se para a idade (Martínez et al., 2017).

Speirs, em 1966, em um estudo realizado em modelo animal observou que a alimentação rica em açúcar tem impacto sobre o fosfato salivar e plasmático uma vez que os tecidos precisam de fosfato para assimilar carboidrato. Pannunzio et al. (2010) observaram que crianças

com sobrepeso e obesas apresentaram alterações nas concentrações salivares de fosfato, ácido siálico livre e proteínas, condições estas que poderiam levar ao desenvolvimento de lesões de cárie em indivíduos propensos (Goodson et al., 2009, Matias et al., 2012, Zeigler et al., 2012). No estudo de Campos et al. (2014), as concentrações de proteína total, amilase, ureia, fosfato, triglicerídeos e cálcio não diferiram entre os grupos com diferentes composições corporais em crianças de 5 a 12 anos. Dos eletrólitos salivares, o cálcio, fosfato, bicarbonato e fluoreto são de particular importância para a saúde bucal (Dawes et al., 2008) e em indivíduos com composição salivar inorgânica alterada, baixo pH salivar e menor fluxo salivar, seu biofilme torna-se mais acidogênico e a desmineralização do esmalte pode ocorrer mais prontamente.

### ***A composição microbiológica salivar e a obesidade***

Um estudo que avaliou a ingestão de alimentos doces e contagem de microrganismos cariogênicos em mulheres mostrou que aquelas com obesidade apresentaram contagens mais altas de *Streptococcus Mutans* que não se alterou após 10 semanas de um programa dietético de redução do peso (Barkeling et al., 2001). Barkeling et al (2002) relataram ainda uma correlação positiva entre o número de *Streptococos Mutans* na saliva e o IMC em mulheres. Entretanto, Vågstrand (2007) avaliou as evidências para uma associação entre a ingestão de açúcar e a contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* salivares e concluiu que a base científica para essa associação era ainda limitada e, devido a muitos fatores confundidores, a contagem de bactérias não poderia ser usada como uma medida precisa da ingestão de açúcar (Vågstrand et al., 2007).

Em adultos, a microbiota salivar foi associada à obesidade em mulheres americanas (Goodson et al., 2009), enquanto a abundância celular bacteriana destes microrganismos em biofilmes subgingivais orais foi associada à obesidade em adolescentes suecos (Zeigler et al., 2012). De acordo com Yeo et al. (2018), os lactobacilos salivares e a contagem de *Streptococos mutans* de mulheres da Malásia foram associados à obesidade central, mas não ao comportamento alimentar doce e às variáveis menstruais. A análise dos microbiomas salivares pode ser útil para o melhor entendimento e acompanhamento de doenças crônicas como a obesidade (Yeo et al., 2018) e, uma vez que quantidades consideráveis de células bacterianas são deglutidas diariamente juntamente com saliva (Socransky et al., 2005), a microbiota salivar pode ter influência na composição da microbiota intestinal e relacionar-se com o ganho de peso (Arimatsu et al., 2014; Yeo et al., 2018).

Hashizume et al. (2015) avaliaram o impacto da gastroplastia na composição salivar de pacientes com obesidade mórbida e sugeriu que os níveis salivares de *Streptococcus mutans* aumentaram após a cirurgia; houve também um aumento significativo nos níveis de *Streptococcus mutans* na saliva desses pacientes após 6 meses em comparação com a contagem antes da cirurgia. Por outro lado, no estudo de Tong et al. (2014), crianças com obesidade não mostraram diferenças significativas nos índices de cárie dentária, taxas de fluxo de saliva, capacidade tampão, *Streptococcus mutans* e contagem de unidades formadoras de lactobacilos salivares em comparação com crianças com peso normal.

Santacruz et al. (2009) conduziram um estudo da influência de um programa de perda de peso na microbiota intestinal de adolescentes com idades entre 13 e 15 anos; a intervenção levou ao aumento das contagens do grupo *Bacteroides fragilis* e do grupo *Lactobacillus*, além de uma diminuição nos grupos de *Clostridium coccoides*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium*. O grupo com maior perda de peso apresentou níveis menores de *Bifidobacterium* quando comparado ao grupo que perdeu menos peso após a intervenção.

Balamurugan et al. (2010) examinaram a composição da microbiota fecal em crianças com e sem obesidade de 11-14 anos. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos na quantificação de *Bacteroides-Prevotella*, espécies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* ou *Eubacterium rectale*, enquanto a quantidade de *Faecalibacterium prausnitzii* estava aumentada em crianças com obesidade. Shillitoe et al. (2012) destacaram que embora a associação clínica entre obesidade e suas comorbidades seja consistente com alterações na flora intestinal, seus mecanismos permanecem obscuros. A interpretação dos dados é complicada pelo fato de os pacientes ganharem e perderem peso lentamente e, em contrapartida, mudanças na adiposidade, controle glicêmico, flora microbiana e os marcadores inflamatórios ocorrem simultaneamente. O autor destacou ainda que os níveis de *Bifidobacteria* na boca parecem refletir aqueles do trato gastrointestinal inferior; porém, afirmam a necessidade de mais estudos e com melhor delineamento.

Outro estudo que visou destacar a contribuição da microbiota intestinal para a modulação do metabolismo do hospedeiro utilizando-se de prebiótico em mulheres com obesidade concluiu que o tratamento, ao contrário do placebo, levou ao aumento de *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii*; ambas as bactérias se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de lipopolissacarídeos. No entanto, o prebiótico levou a mudanças sutis na microbiota intestinal que poderiam afetar de forma importante vários outros metabolitos importantes implicados na obesidade e/ou diabetes (Dewulf et al., 2013).

Larsen et al. (2013) avaliaram o efeito do *Lactobacillus salivarius* Ls-33 sobre a microbiota fecal em adolescentes obesos. Como resultado, o autor sugeriu que o número de células de bactérias fecais, incluindo *Bifidobacterium*, não se alteraram com a intervenção, porém outros microrganismos apresentaram resultados significativos concluindo que *L. salivarius* Ls-33 pode modificar a microbiota fecal em adolescentes obesos de forma não relacionada à síndrome metabólica. Outro estudo que determinou variações na concentração de ácidos graxos de cadeia curta fecal em mulheres com obesidade tratadas com prebióticos do tipo Inulina concluiu que o consumo do prebiótico modulou seletivamente *Bifidobacterium spp.* e diminuiu a concentração de ácidos graxos de cadeia fecal (Salazar et al., 2015).

Hollister et al. (2015) compararam o microbioma intestinal pediátrico saudável com o de adultos saudáveis e observaram que, dentre outros achados, as crianças apresentaram taxas superiores de *Bifidobacterium spp.* e *Faecalibacterium spp.* Os resultados sugerem que o microbioma de intestino pediátrico saudável possui composição funcional que difere da de adultos saudáveis (Hollister et al. 2015).

Ao afirmar que hábitos alimentares influenciavam fortemente a microbiota intestinal, Mayorga Reyes et al. (2016) compararam e correlacionaram a abundância de *Firmicutes* e *Bacteroidetes phyla*, algumas bactérias representativas desses filos, como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum* e *Bifidobacterium longum*, *Actinobacteria phylum* em adultos jovens com a ingestão de seus alimentos e sugeriu que a dieta rica em ácidos graxos insaturados e fibras promoveu uma abundante população de bactérias consideradas benéficas, como *B. longum* e *Bacteroidetes*. No entanto, ressaltaram que os resultados deveriam ser considerados com cautela devido ao número de indivíduos estudados e que só poderiam ser válidos para a população estudada.

Hou et al. (2017) investigaram as diferenças na microbiota intestinal de crianças com obesidade, comparando-as com um grupo saudável em uma coorte; as quantidades de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* aumentaram entre as crianças durante o processo de perda de peso e, com isso, os autores sugeriram que estes gêneros poderiam ser utilizados como indicadores de saúde entre crianças obesas, bem como poderiam ser incorporados a prebióticos ou probióticos no tratamento da obesidade. De acordo com Baskaran et al. (2018), alterações genéticas, epigenéticas e na microbiota influenciam a obesidade infantil; a microbiota intestinal é um importante regulador do peso corporal e as espécies de *Bifidobacterium* melhoram o estado metabólico. Adicionalmente, mudanças no estilo de vida permanecem ainda como principal forma de manejo da obesidade infantil.

A partir da literatura revista, pode-se perceber a falta de estudos que tivessem avaliado as diferenças nas características da microbiota oral em indivíduos com e sem excesso de peso, em especial em indivíduos jovens. As condições de saúde bucal impactam a composição microbiana oral e deve ser considerada.

### 3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a saúde bucal e a composição salivar de adolescentes classificados como tendo eutrofia, sobrepeso e obesidade e verificar, dentre os parâmetros avaliados, quais seriam capazes de detectar desvios e/ou monitorar o estado nutricional do adolescente.

Especificamente, foram avaliados:

- composição corporal em termos de estatura, peso, porcentagem de gordura e massa de músculo esquelético;
- presença de gengivite;
- fluxo e pH salivares;
- expressão do fator nuclear Kappa B em saliva;
- concentração salivar de colesterol, 7-cetocolesterol, 25-hidroxitamina D2 e D3 e ácido úrico;
- concentração salivar de fósforo, ureia e cálcio;
- quantificação de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacteria* em saliva não estimulada.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra**

O tamanho amostral foi definido com base em dois estudos que avaliaram a deficiência de vitamina D em adultos obesos (Moy e Bulgida, 2011) e a contagem de bactérias do biofilme subgingival de adolescentes obesos (Zeigler et al., 2012). Levando-se em consideração os resultados obtidos nos dois estudos, poder do teste de 80% e nível alfa de 0,05, um mínimo de 200 indivíduos deveria compor o estudo, os quais seriam classificados de acordo com a presença ou ausência de excesso de peso e quanto ao sexo.

Foram incluídos um total de 248 adolescentes, selecionados em 12 escolas públicas do município de Piracicaba (SP) entre os anos de 2014/2015 e que entregaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento devidamente preenchidos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), sob protocolo n. 152/2014

### **Anamnese**

A ficha de anamnese foi estruturada com o objetivo de verificar o histórico dentário e médico e perfil de uso de medicamentos. Além disso, os voluntários do sexo feminino foram questionados quanto à data da menarca e ao uso e tipo de medicamento contraceptivo.

Os fatores de inclusão foram: adolescentes de ambos os sexos e meninas que tivessem passado pela menarca. Os fatores de exclusão da amostra foram: presença de cavidades de cárie e perdas dentárias, doença periodontal, doenças crônicas como epilepsia, câncer, artrite reumatoide, hipertensão ou diabetes mellitus; uso crônico de medicamentos, tais como benzodiazepínicos, antiinflamatórios, corticoide, antidepressivo e contraceptivo oral, uso de tabaco ou drogas ilícitas, uso de antibióticos nos últimos três meses e comportamento inadequado e/ou recusa em colaborar com as atividades propostas. O uso de anticoncepcional também foi considerado critério de exclusão.

### **Exame Bucal**

O exame clínico bucal foi realizado na escola, em uma sala bem iluminada, utilizando-se espelho, sonda de ponta romba, além de equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, jaleco e luvas). Para a avaliação da presença de cárie, foi utilizado o índice CPO-D (total de dentes cariados, perdidos e obturados) seguindo os critérios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997), por uma examinadora calibrada (coeficiente Kappa = 0,97). O critério de

inclusão foi a presença de dentição permanente completa e hígida, com exceção dos terceiros molares.

Diagnóstico de gengivite: a autopercepção de gengivite foi avaliada por meio de entrevista com o adolescente, apresentando duas perguntas qualitativas (sim ou não), sendo considerados os relatos referentes ao período atual. As questões abrangerão informações sobre:

- Sangramento gengival espontâneo (sim/não);
- Sangramento gengival ao escovar os dentes (sim/não).

Estas questões foram baseadas em estudos prévios realizados em crianças e adolescentes (Kallio et al., 1994 e 1996; Taani e Alhaija, 2003). A forma de aplicação das questões e os termos utilizados influenciam na validade dos dados obtidos (Blicher et al., 2005). Para avaliação do autorrelato nesta população, a literatura sugere a utilização do termo “sangramento gengival” ao invés do termo “gengivite” (Kallio et al., 1994) e aplicação simples (p.ex., perguntas qualitativas) para indivíduos de baixo nível socioeconômico (Blicher et al., 2005).

O relato dos sujeitos sobre a presença de gengivite foi complementado pelo exame clínico da condição gengival. O diagnóstico clínico de gengivite foi constatado pela presença de sangramento à sondagem, utilizando-se o Índice Periodontal Comunitário (IPC) (WHO, 1997). Os dentes índices (16, 11, 26, 36, 31, 46) representativos de cada sextante bucal foram examinados por meio da inserção da sonda periodontal da OMS (20 gramas, o que equivale a colocar a ponta da sonda sobre a unha do polegar e pressionar até obter ligeira isquemia) no sulco gengival dos elementos dentários acima, com a finalidade de detectar a presença de sangramento. O tempo de observação utilizado após a sondagem para o sangramento foi de 10 a 30 segundos. Seis pontos de cada elemento foram examinados: distovestibular, mediovestibular, mesiovestibular, distolingual, mediolingual e mesiolingual. Os dentes que apresentaram sangramento em qualquer um destes pontos recebeu escore 1. A ausência de sangramento recebeu o escore zero.

Assim, o diagnóstico de gengivite somente foi considerado quando obteve resultado positivo em pelo menos uma questão subjetiva e na presença de sangramento à sondagem em ao menos um sextante (Lang et al., 1990).

### **Avaliação Nutricional**

A avaliação antropométrica e nutricional envolveu as medidas de estatura, peso, massa de gordura e massa de músculo esquelético corporal por meio de um estadiometro digital e análise de impedância bioelétrica. O índice de massa corporal ( $IMC=Kg/m^2$ ) foi determinado a

fim de classificar a amostra selecionada em eutrofia, sobrepeso e obesidade de acordo com os dados de referência IMC-para-idade e sexo (5-19 anos) (WHO, 2007).

Para quantificar a massa de gordura, massa de músculo esquelético corporal e massa de água intra e extracelular foi utilizada a análise por impedância bioelétrica (InBody 230, Biospace Co. Ltd., Gangnan-gu, Seul, Coréia do Sul). O sistema de medição é tetra-polar com oito eletrodos tácteis, dois conjuntos de eletrodos na forma de placas metálicas para cada pé, sobre os quais o sujeito se posiciona. No alto da coluna da balança encontram-se duas peças para as mãos que foram apreendidas pelo sujeito no momento da análise. Os adolescentes foram posicionados em pé, com os braços e pernas estendidos, de acordo com o manual do equipamento. As análises foram realizadas pela manhã, sem que o sujeito tivesse se exercitado ou se alimentado previamente (pelo menos duas horas após a última refeição).

A classificação da amostra também foi realizada de acordo com a porcentagem de gordura corporal avaliada pela impedância bioelétrica seguindo os parâmetros propostos pelo estudo de Ramírez-Vélez et al. (2017), o qual incluiu jovens estudantes colombianos. Os seguintes pontos de corte foram adotados: 38,95% de gordura corporal para meninas e 25,55% de gordura corporal para meninos (Ramírez-Vélez et al., 2017).

### **Coleta Salivar**

Coletas de saliva não estimulada e estimulada foram realizadas nas escolas pela manhã, entre 8:00 e 10:00 horas, pelo menos 2 horas após a última refeição e 1 hora após a higiene oral, pelo método da drenagem.

*Saliva não estimulada:* O sujeito, sentado confortavelmente numa cadeira, num ambiente bem ventilado e arejado e com a cabeça ligeiramente inclinada para frente, sem deglutir, permitiu que a saliva acumulada no assoalho da boca por cinco minutos gotejasse num tubo previamente pesado acoplado a um funil e mergulhado em gelo picado. 1,0 ml misturado com 1 ml de solução preservante (RNAlater, Ambion) para isolamento de RNA e avaliação do perfil de expressão de NF-KB; 1 ml para isolamento de DNA para análise microbiológica; o volume de saliva excedente foi armazenado como amostra reserva contendo solução preservante (RNAlater, Ambion).

Para determinação de de colesterol, 7-cetocolesterol, ácido úrico e 25-hidroxivitamina D2 e D3 salivares os voluntários realizaram coleta de saliva com 12 horas de jejum. As amostras de saliva foram coletadas em casa por mastigação de roletes de algodão por dois minutos, até serem saturados com saliva (Salivettes, Sarstedt, Numbrecht, Alemanha). Depois de mastigar, os rolos de algodão foram colocados no tubo de plástico de uma salivette. As amostras foram transportadas em gelo

para o laboratório no mesmo dia e foram centrifugadas (a 3500 rpm por 5 min) e armazenadas a -80 °C até a análise.

*Saliva estimulada:* A coleta de saliva mista por estímulo foi realizada por via mecânica, pela mastigação de 0,3g de Parafilm (Parafilm, Merifield, EUA), numa frequência de aproximadamente 70 mastigações por minuto, por 5 minutos. Em seguida à avaliação do fluxo salivar, o pH da saliva sobrenadante foi mensurado digitalmente por meio de pHmetro portátil (Thermo Scientific Orion 3 Star, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Inicialmente, foi realizada à calibração do aparelho usando-se soluções-tampão com pH 4,0 e 7,0. A seguir, o ponteiro mensor do aparelho foi mergulhado no tubo de Falcon contendo a saliva durante 30 segundos, sendo feita a leitura automática do pH (Eckley e Costa, 2006).

Os tubos *ependorfs* contendo as alíquotas de saliva foram levados para armazenamento em freezer -40°C (análise microbiológica) e -80°C (análise bioquímica e de expressão gênica). As voluntárias do sexo feminino foram avaliadas na semana mais estável do ciclo menstrual, ou seja, a fase folicular (3. ao 5. dia do ciclo). Todos os voluntários foram orientados a evitar o consumo de álcool e a prática de exercícios físicos no dia anterior ao da coleta.

### **Determinação da concentração de colesterol, 7-cetocolesterol e ácido úrico salivar**

A concentração do colesterol e 7-cetocolesterol na saliva dos voluntários foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para o preparo da amostra, 200 µL de saliva e 300 µL de água foram homogeneizados no vórtex por 1 minuto com 3000 µL clorofórmio/metanol (2:1) gelado e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. A fase contendo o clorofórmio foi retirada e transferida para um tubo novo o qual foi secado sob fluxo de nitrogênio no banho-maria a 37°C. Após a secagem, a amostra foi ressuspendida em 200 µL de fase móvel e transferida para o *vial* do HPLC. O colesterol e 7-cetocolesterol foram quantificados por HPLC utilizando o sistema analítico da Shimadzu constituído pelo controlador CBM-20A, bomba LC-10Ai, injetor automático SIL-10Ai e detector DAD SPD-M20A. A coluna utilizada foi a ODS C18 (159 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por hexano:isopropanol (90:10). A corrida se deu com fluxo de 1 ml/min com a coluna sob a temperatura de 35°C e detector ajustado para leitura em 206 nm (colesterol) e 233 nm (7-cetocolesterol). As concentrações foram então expressas em µg/mL de saliva.

Para a determinação de ácido úrico, as amostras de saliva foram desproteinizadas com ácido perclórico 10%, centrifugadas e o sobrenadante injetado no HPLC. O sistema de cromatografia líquida consistiu de uma bomba quaternária, detector UV/Vis, injetor automático, porta-amostra com temperatura controlada, forno para coluna e software para

aquisição dos dados. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm com poro de 5 µm de diâmetro de partícula) e pré-coluna (5 x 4 mm, 5 µm de diâmetro de partícula). A fase móvel foi composta por 25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,00125% de NaN<sub>3</sub> e ajustada a pH 2,5 com ácido orto-fosfórico. As análises foram realizadas com a coluna a 30°C, fluxo de 1 mL/min e leitura em 245 nm. As concentrações foram expressas em mg/dL de saliva.

### **Determinação da concentração 25-hidroxivitamina D2 e 25 hidroxivitamina D3 salivares**

As concentrações de 25-hidroxivitamina D2 e D3 também foram quantificadas na saliva dos voluntários por cromatografia líquida de alta eficiência. Para o preparo da amostra, foram adicionados em um tubo de ensaio 500 µL de amostra de saliva e 500 µL da mistura metanol:isopropanol. A mistura resultante foi homogeneizada em *vórtex* por 30 segundos e mantida em repouso por 10 minutos no gelo. Na sequência foram adicionados 4 mL de hexano, seguido de nova homogeneização em *vórtex* por 30 segundos e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase orgânica foi transferida para um novo tubo e secada sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 37°C. Em seguida, o tubo seco foi ressuspenso em 100 µL de fase móvel. A fase móvel foi composta por metanol: água (80:20) e a corrida se deu com um fluxo de 1,0 mL/min com leitura em 263 nm. O sistema cromatográfico foi composto pelo sistema analítico da Shimadzu constituído pelo controlador CBM-20A, bomba LC-10Ai, injetor automático SIL-10Ai, detector DAD SPD-M20A e coluna ODS C18 (159 mm x 4,6 mm). O limite de detecção do método foi de 0,5 ng/mL, considerando que a amostra foi concentrada 5 vezes para quantificação.

### **Determinação das concentrações de fósforo, cálcio e ureia**

A análise bioquímica foi realizada em duplicata utilizando-se técnica automatizada (Flexor E6002-190 Clinical Chemistry Analyzer, Vital Scientific, Dieren, Suíça), no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina do ABC (Santo André, SP). A concentração de ureia foi determinada pelo método enzimático, enquanto as concentrações de fósforo e cálcio foram determinadas por métodos colorimétricos (ELI Tech, Seppim SA, SEES, França). Amostras de concentrações conhecidas fornecidas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina de Laboratório foram utilizadas como padrão para calibrar o sistema automatizado. Os parâmetros adotados foram: média de fósforo sérico=3,89 mg/dL / faixa = 3,31-447 mg/dL; média de cálcio sérico=8,20 mg/dL / faixa = 7,21-9,18 mg/dL; média ureia sérica = 44,3 mg/dL / faixa = 37,6–50,9 mg/dL (Campos et al., 2014).

### Perfil de expressão de NF-Kappa B

Cerca de 1,0 mL de saliva com solução preservante foi transferida para um tubo cônico e a extração foi realizada com o reagente TRIzol, de acordo com as recomendações do fabricante.

A massa e a pureza do RNA foram mensuradas por espectrofotometria. Foram consideradas válidas amostras com razão 260/230 e 260/280 entre 1,8 e 2,0. O cDNA foi sintetizado com o Kit QuantiNova Reverse Transcription (Quiagen), a partir de 1µg de RNA total. A expressão gênica foi avaliada por meio do RT-qPCR com uso de SYBR Green.

Os *primers* foram confeccionados utilizando-se a plataforma Primer-Blast disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. A sequência do primer encontra-se descrita no quadro 1. As seguintes condições de reação para RT-qPCR foram utilizadas: 7,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (SABioscience), 0,3 µl dos *primers forward* e reverse (0,25µM), 5,9 µl água e 1 µl de cDNA, com a seguinte condição de ciclagem: 95°C, 10 minutos; 40 ciclos de (95 °C, 15 segundos; 60°C, 60 segundos). O equipamento utilizado foi o Applied Biosystem 7500.

O gene referência utilizado para normalização dos valores de expressão do NF-Kappa B foi o β-Actina, cuja sequência do primer encontra-se descrita no quadro 1.

	Forward	Reverse	Pb
NF-KB	CATCCCATGGTGGACTACCT	CTCTGTCATTCGTGCTTCCA	100
B-actina	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG	CAATGCCAGGGTACATGGTG	100

**Quadro1. Sequências dos *primers* utilizados no estudo para o fator NF-Kappa B.**

### Avaliação microbiológica salivar

Para a detecção e quantificação de microrganismos, o DNA das amostras de saliva não estimulada foi isolado e submetido à reações de PCR quantitativo (qPCR). Para o isolamento de DNA genômico, 1 ml de saliva foi centrifugado (13,000 x g / 10 minutos/ 4°C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso com 500 µl de TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0) e 1,5 µl de propídio monoazida (PMA: 20 mM em 20% dimetilsulfóxido; Biotium, Hayward, CA) (Nocker et al., 2007). Após incubação por 5 min no escuro, as amostras foram expostas à luz (600W) por 3 min. Após a ligação cruzada induzida por luz, as amostras foram centrifugadas (5,000 x g / 5 min) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso com 100 µl de tampão TE, 10,9 µl lisozima (estoque 100 mg/mL) e 5 µl mutanolisina (estoque 5 U/µL). Esta suspensão foi incubada a 37°C por 30 min.

Em seguida, o DNA foi isolado com o MasterPure DNA purification kit (Epicenter Technologies, Madison, Wis.) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada com gel de agarose. A quantidade e a pureza do DNA foram avaliadas por OD260nm e pela razão OD260/280nm, respectivamente. Para quantificação microbiana, dez pictogramas de DNA genômico de cada amostra e os controles negativos (sem DNA) foram misturados com iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories) e *primers* espécie específicos (para cada um dos microrganismos listados no quadro 2) e amplificados com o sistema CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, BioRad.

As curvas padrão foram baseadas no tamanho do genoma de cada microrganismo a ser detectado, segundo descrição por Doležel et al. (2003); especificamente, uma cópia do genoma representa uma célula de cada organismo. Esta curva foi utilizada para transformar os valores do *critical threshold cycle (Ct)* em relação ao número de células. As curvas padrão foram construídas usando DNA genômico das cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection). Os dados foram apresentados como proporção de cada espécie em relação à carga bacteriana total, a qual foi determinada pelo uso de *primer* universal da região 16S rRNA.

<b>Microrganismo</b>	<b>Sequência dos Primers</b>	<b>Importância na cavidade oral e na obesidade</b>	<b>Primers</b>
<i>“Todas as bactérias” ou carga bacteriana total</i>	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	Referência para o cálculo da proporção dos microrganismos em estudo	Fierer et al., 2005
<i>Bifidobacteria</i>	F: CTCCTGGAAACGGGTGG R: GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	Este gênero está associado com a microbiota do trato gastrointestinal, incluindo microbiota oral em pacientes sem quadro de obesidade ou quando da melhora do quadro desta condição crônica (Shillitoe et al., 2012)	Guo et al., 2008
<i>Streptococcus mutans</i>	F: TCGCGAAAAAGATAAACAAACA R: GCCCCTTCACAGTTGGTTAG	Um dos principais patógenos da cárie dentária.	Chen et al., 2007

**Quadro 2. Microrganismos de interesse para detecção e quantificação via qPCR.**

## Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio dos softwares SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Alemanha) e SPSS 24.0 (IBM Corp., NY, EUA), considerando-se um nível alfa de 5%.

A estatística exploratória consistiu de médias, desvio padrão, medianas e quartis. A normalidade foi testada pelo teste Shapiro Wilk ou Kolmogorov-Smirnov, além da observação dos gráficos Quartil-quartil-plot (QQ-plot); as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pelo logaritmo natural (ln).

A análise da saúde bucal foi realizada pela frequência de sangramento e gengivite nos grupos de eutrofia, sobrepeso e obesidade utilizando-se o teste Qui-quadrado de independência, enquanto o número de sextantes que apresentaram sangramento à sondagem foi comparado entre estes grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando-se os sexos separadamente.

Para a avaliação fisicoquímica salivar, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias (e pós-teste de Bonferroni) para verificar o efeito *grupo* (considerado como abaixo ou acima do ponto de corte para porcentagem de gordura corporal) e *sexo* (masculino e feminino) e a interação entre estes fatores na variância observada dos marcadores salivares em estudo; foram também obtidos o tamanho do efeito (*Eta* parcial quadrado) e poder do teste. Previamente, os resultados do teste de homogeneidade (teste de Levene) foram avaliados como premissa da análise de variância.

Adicionalmente, um modelo de regressão linear múltipla foi ajustado pelo método hierárquico para obter um modelo preditivo da porcentagem de gordura corporal (como variável dependente), considerando como variáveis explicativas a idade, sexo (masculino=0 e feminino=1) e os marcadores salivares em estudo. Para o ajuste do modelo final, foram consideradas as mudanças no  $R^2$  e na estatística F a cada nova variável independente adicionada, assim como as premissas do teste: normalidade, colinearidade (VIF e tolerância) e homocedasticidade (avaliação de resíduos).

Os resultados da análise microbiológica salivar foram analisados utilizando-se o teste ANOVA de três vias (e pós-teste de Bonferroni) para verificar o efeito *grupo* (considerado como tendo eutrofia, sobrepeso ou obesidade), *sexo* (masculino e feminino) e presença de *gengivite* e a interação entre estes três fatores, tendo como variáveis dependentes a porcentagem de *S. mutans* e a porcentagem de *Bifidobacteria* em relação à carga bacteriana total.

## 5. RESULTADOS

### *Caracterização da amostra quanto à composição corporal, saúde bucal e expressão do fator nuclear Kappa B em saliva*

A Tabela 1 mostra as características físicas e da composição corporal dos voluntários incluídos e classificados como tendo eutrofia, sobrepeso e obesidade.

**Tabela 1. Caracterização da amostra quanto à composição corporal**

Grupos	Idade	N	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	% de gordura corporal	% de gordura do tronco	Massa muscular esquelética (Kg)	Massa de água intracelular (Kg)	Massa de água extracelular (Kg)
	Média (DP)	( <i>n total/ n válido</i> )	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
<b>Meninas eutrofia</b>	15,69 (0,86)	66/65	20,22 (2,23)	26,23 (5,48)	26,26 (5,93)	20,98 (2,73)	17,62 (2,09)	10,88 (1,27)
<b>Meninos eutrofia</b>	15,53 (0,68)	76/73	20,17 (2,18)	13,95 (5,67)	13,12 (6,68)	28,80 (4,89)	23,61 (3,74)	14,33 (2,04)
<b>Meninas sobrepeso</b>	16,06 (0,54)	30/29	26,27 (2,04)	38,31 (4,23)	39,78 (5,54)	22,45 (5,29)	27,27 (3,69)	13,02 (5,99)
<b>Meninos sobrepeso</b>	15,12 (0,51)	32/32	25,58 (1,40)	23,37 (4,89)	25,60 (5,07)	33,56 (4,80)	18,75 (4,05)	16,34 (2,10)
<b>Meninas obesidade</b>	16,32 (1,00)	23/21	33,51 (4,46)	45,83 (3,74)	45,65 (2,75)	26,83 (3,77)	22,10 (2,90)	13,47 (1,64)
<b>Meninos obesidade</b>	15,70 (1,12)	21/21	31,26 (3,54)	33,12 (5,26)	35,46 (4,75)	36,57 (5,55)	29,57 (4,26)	17,73 (2,52)

As características dos grupos quanto à presença de sangramento gengival e à presença de gengivite segundo os critérios adotados pelo estudo estão mostradas na Tabela 2. Não houve diferença na frequência de sangramento gengival nem de gengivite entre os grupos, considerando-se o fator *sexo* separadamente. Também não houve diferença no número de sextantes com sangramento entre os grupos.

**Tabela 2. Caracterização da saúde bucal quanto à presença de sangramento gengival, gengivite e expressão do marcador inflamatório NF Kappa B salivar**

Grupos	Sangramento gengival espontâneo	Sangramento gengival ao escovar os dentes	Gengivite (autorrelato e clínico)	Número de sextantes com sangramento à sondagem	Fator de transcrição de inflamação NF-KB 2 <sup>Δ</sup> -ΔCt
				Média (DP)	Média (DP)
	(n total-n válido)	(n total-n válido)	(n total-n válido)	(n total-n válido)	(n total-n válido)
<b>Meninas eutrofia</b>	15,38% (66-66)	32,31% (66-66)	18,46% (66-66)	0,57 (0,79) (66-66)	0,006 (0,009) (51-18)
<b>Meninos eutrofia</b>	2,63% (76-76)	27,63% (76-76)	9,33% (76-76)	0,46 (0,70) (76-76)	0,203 (1,004) (48-28)
<b>Meninas sobrepeso</b>	13,79% (30-30)	51,72% (30-30)	24,14% (30-30)	1,03 (1,27) (30-30)	0,002 (0,003) (23-5)
<b>Meninos sobrepeso</b>	6,25% (32-32)	43,75% (32-32)	15,63% (32-32)	0,66 (1,00) (32-32)	0,008 (0,020) (30-8)
<b>Meninas obesidade</b>	16,00% (23-23)	48,00% (23-23)	20,00% (23-23)	0,80 (1,04) (23-23)	0,006 (0,016) (20-8)
<b>Meninos obesidade</b>	14,29% (21-21)	42,86% (21-21)	28,57% (21-21)	0,76 (0,94) (21-21)	0,002 (0,003) (20-6)

2<sup>Δ</sup>-ΔCt: método de análise de expressão gênica  
p>0,05

Os resultados obtidos para o fator de transcrição de inflamação NF-KB não foram testados estatisticamente devido ao número pequeno de amostras que amplificaram por grupo (38% do total de amostras). A proporção entre o número de amostras testadas e o número de amostras amplificadas foi mostrado na Tabela 2. Entretanto, a expressão de  $\beta$ actina foi observada em todas as amostras salivares, validando a técnica e a qualidade do RNA utilizados.

#### ***Avaliação físicoquímica salivar e obtenção de modelo preditivo para porcentagem de gordura***

A Tabela 3 mostra os resultados da análise univariada de variância (ANOVA de duas vias) utilizada no estudo dos marcadores salivares de acordo com a porcentagem de gordura corporal, tendo como fatores o *grupo* e o *sexo*. O efeito de interação entre os fatores também foi avaliado, assim como o tamanho do efeito (*Eta* parcial quadrado) e poder do teste para os modelos.

Os resultados encontrados indicaram um efeito significativo do fator *grupo* no fluxo salivar estimulado, que foi menor no grupo de voluntários que estavam acima do ponto de corte para a porcentagem de gordura, embora com um tamanho do efeito pequeno ( $\eta^2$  parcial quadrado = 0,019) e baixo poder do teste (52,3%). É importante mencionar que ambos os grupos apresentaram um fluxo salivar médio acima de 1 mL por minuto, portanto deve-se considerar este resultado dentro do contexto clínico.

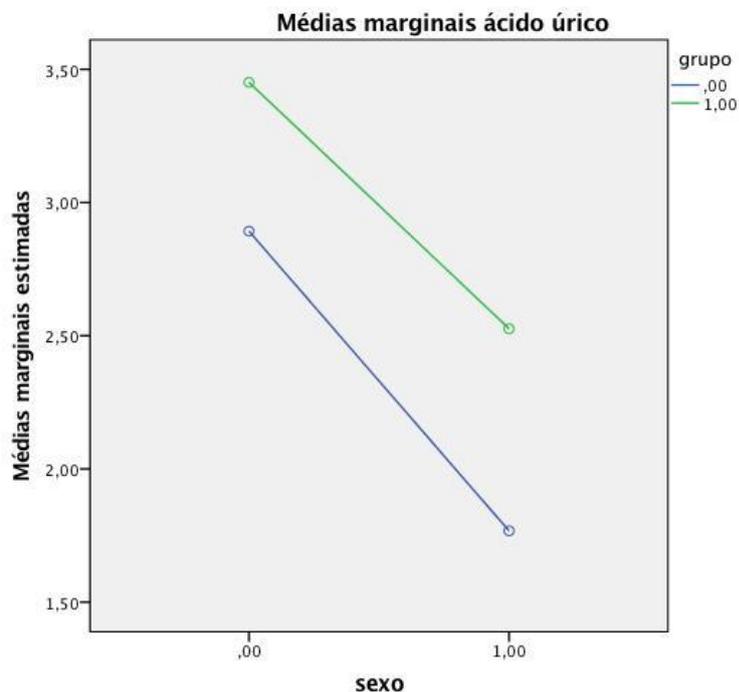
Os resultados mostraram também um efeito moderado do fator *sexo* e do fator *grupo* sobre a concentração salivar de ácido úrico (tamanho do efeito = 0,086 e poder do teste = 99% para o fator *sexo* e tamanho do efeito = 0,038 e poder do teste = 78% para o fator *grupo*), cujas concentrações estavam aumentadas em adolescentes com maior porcentagem de gordura e naqueles do sexo masculino. Não houve interação sobre os fatores, o que significa que o efeito do *sexo* e do *grupo* são independentes para o ácido úrico salivar. O gráfico de interação obtido corresponde à Figura 1.

**Tabela 3. Efeito grupo\*sexo na concentração de marcadores salivares segundo a porcentagem de gordura corporal (% GC): modelo linear geral de duas vias**

<i>Grupo segundo %GC</i>		pH salivar	Fluxo salivar estimulado (mL/min)	25-hidroxi-vitamina D2 (ng/mL)	25-hidroxi-vitamina D3 (ng/mL)	Colesterol (µg/L)	Óxido do colesterol (µg/L)	Ácido úrico (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Cálcio (mg/dL)
<b>Abaixo do ponto de corte</b>	n válido/n total	172/150	172/149	172/76	172/99	172/137	172/137	172/140	172/116	172/114	172/106
	<i>Média (DP)</i>	7,21 (0,46)	1,33 (0,64)	1,67 (0,71)	4,08 (3,15)	1433,21 (1476,87)	61,69 (54,52)	2,39 (1,60)	11,02 (4,13)	28,66 (17,82)	1,10 (0,87)
<b>Acima do ponto de corte</b>	n válido/n total	67/62	67/62	67/35	67/39	67/56	67/56	67/56	67/42	67/42	67/39
	<i>Média (DP)</i>	7,35 (0,56)	1,13 (0,57)	1,74 (0,58)	4,00 (2,56)	1727,85 (2093,18)	49,60 (37,24)	3,01 (1,60)	10,61 (4,13)	27,71 (10,44)	0,95 (0,64)
<i>Efeito grupo</i>	p-valor	0,056	<b>0,044</b>	0,657	0,823	0,586	0,600	<b>0,007</b>	0,660	0,757	0,235
<i>Efeito sexo</i>	p-valor	0,401	0,054	0,884	0,462	0,066	0,517	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,026</b>	<b>0,008</b>	0,179
<i>Efeito de interação</i>	p-valor	0,800	0,662	0,109	0,111	0,272	0,669	0,678	0,583	0,661	0,917
<i>F</i> †	-	1,547	2,736	1,162	1,707	1,285	0,452	10,226	1,917	2,692	1,286
<i>Eta parcial quadrado</i> †	-	0,022	0,038	0,032	0,037	0,020	0,007	0,138	0,036	0,050	0,027
<i>Poder do teste</i> †	-	0,405	0,657	0,305	0,438	0,340	0,140	0,998	0,488	0,646	0,338

DP, desvio padrão;

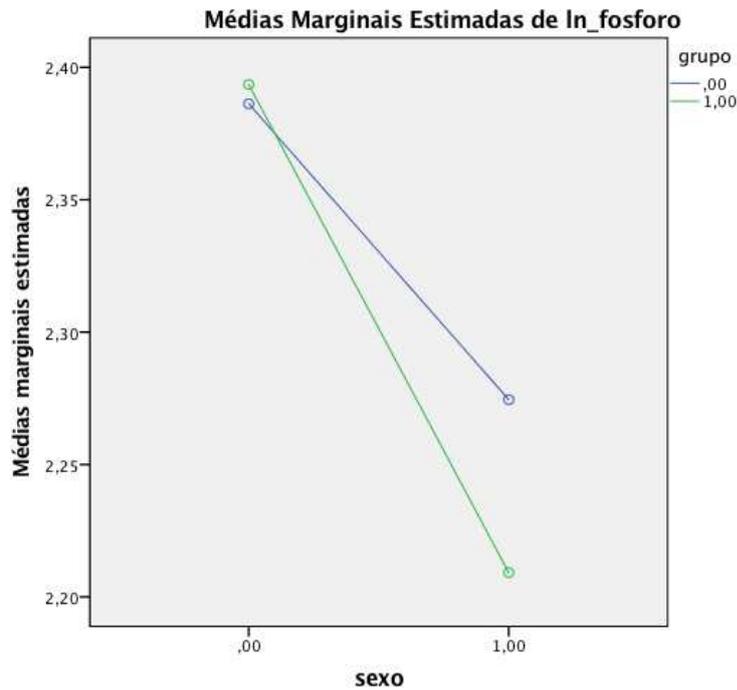
† Parâmetros obtidos do Modelo linear geral /ANOVA de duas vias



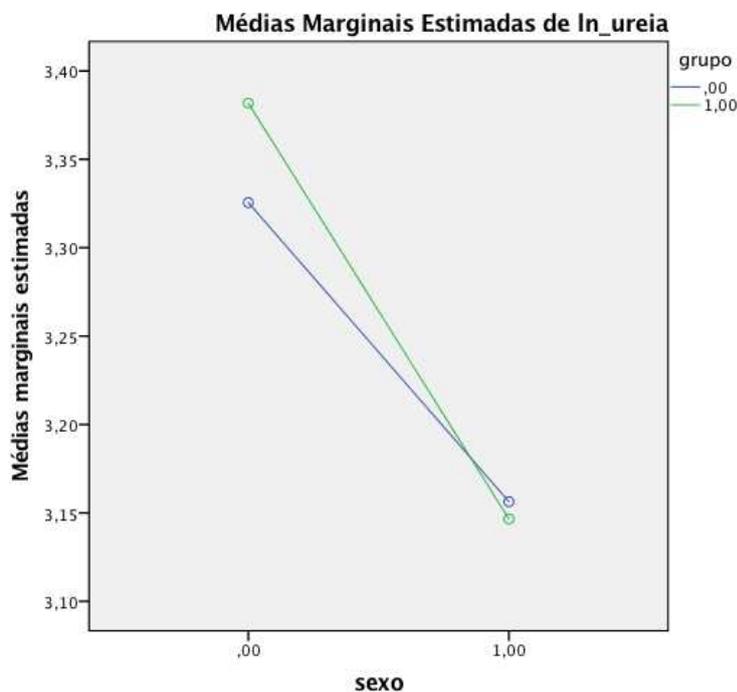
**Figura 1. Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= Acima do ponto de corte para %GC; 2= Abaixo do ponto de corte) sobre a concentração salivar de ácido úrico (eixo Y).**

Na Figura 1, as linhas em verde e azul correspondem aos indivíduos que estão acima e abaixo do ponto de corte para gordura corporal, respectivamente. O gráfico mostra que a concentração de ácido úrico salivar estava aumentada no grupo com maior porcentagem de gordura (verde) e nos adolescentes do sexo masculino (*sexo* ,00). O fato das linhas não se cruzarem demonstra a ausência de interação entre os fatores *grupo* e *sexo*, ou seja, estes fatores explicam a concentração de ácido úrico salivar de forma independente.

O fator *sexo* teve efeito significativo sobre as concentrações salivares de fósforo e uréia, que foram menores entre as adolescentes do sexo feminino, embora com tamanho do efeito pequeno ( $\eta^2$  parcial quadrado = 0,032 para fósforo e 0,045 para ureia) e poder do teste abaixo de 80% em ambos os casos. Os gráficos de interação obtidos para fósforo e ureia correspondem às Figuras 2 e 3.



**Figura 2.** Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= Acima do ponto de corte para %GC; 2= Abaixo do ponto de corte) sobre a concentração salivar de fósforo (eixo Y – ln, transformação logarítmica).



**Figura 3.** Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= Acima do ponto de corte para %GC; 2= Abaixo do ponto de corte) sobre a concentração salivar de ureia (eixo Y – ln, transformação logarítmica).

Nas Figuras 2 e 3 as linhas em verde e azul correspondem aos indivíduos que estão acima e abaixo do ponto de corte para gordura corporal, respectivamente. Os gráficos mostram que as concentrações de fósforo e uréia salivares estavam aumentadas nos adolescentes do sexo masculino (sexo ,00), mas não eram diferentes entre os grupos que estavam abaixo ou acima do ponto de corte para gordura corporal. Também não houve interação entre os fatores *grupo* e *sexo*, ou seja, estes fatores são independentes para a concentração de fósforo e uréia salivares.

Um modelo preditivo para a porcentagem de gordura (%GC) foi obtido pelo método hierárquico para prever a porcentagem de gordura corporal tendo como variáveis explicativas os parâmetros em estudo. Neste método, foram inseridas as variáveis em estudo e observadas as mudanças nos parâmetros do modelo (estatística F e R<sup>2</sup>); observou-se que a adição da variável *ácido úrico* ao modelo que continha apenas a variável *sexo* mostrou uma mudança em R<sup>2</sup> de 0,47 para 0,53. O modelo final tem como variáveis explicativas o sexo e a concentração salivar de ácido úrico (Tabela 4):

$$\%GC = 12,53 + 18,19 * \text{sexo feminino} + 1,69 * \text{ácido úrico}$$

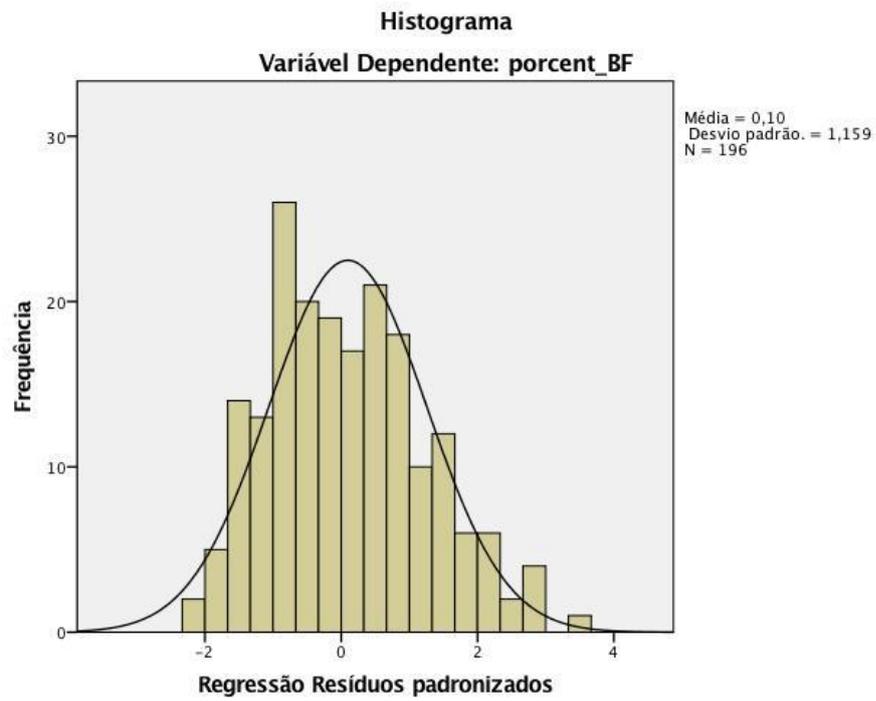
(sexo feminino = 1)

**Tabela 4. Modelo preditivo obtido pelo método hierárquico para estimação da porcentagem de gordura corporal (%GC)**

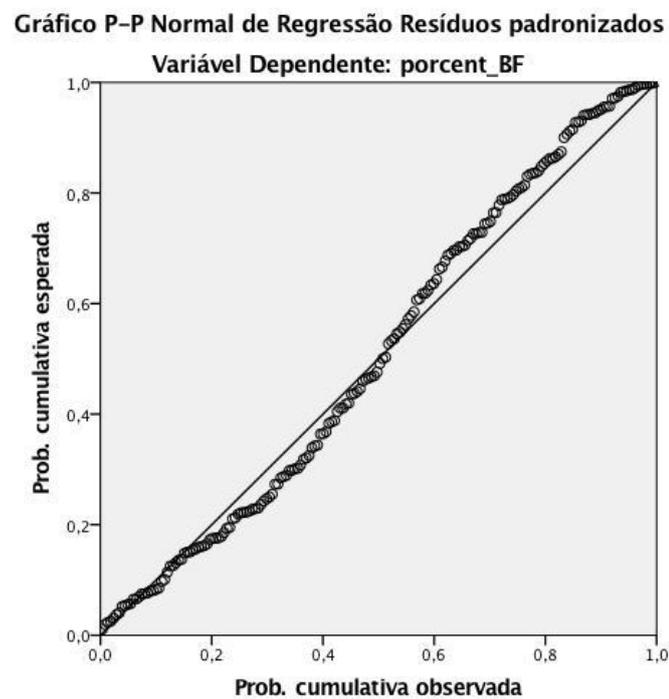
%GC	B	B IC (95%)	T	Sig	Estatística do modelo		
					F (p-valor)	R <sup>2</sup> ajustado	Poder
constante	12,532	(7,47-17,59)	4,942	-	37,546		
Sexo feminino	18,194	(13,98-22,41)	8,616	0,000	(0,000)	0,511	0,841
Ácido úrico	1,690	(0,44-2,94)	2,690	0,009			

Tolerância = 0,831; VIF = 1,203

O modelo apresentou bom ajuste, como observado pelos parâmetros de tolerância, VIF, análise de resíduos, poder do teste (84%) e R<sup>2</sup> ajustado de 0,511, o que equivale dizer que o modelo explica 51% da variação na porcentagem de gordura. As Figuras 4 e 5 correspondem à análise de resíduos do modelo preditivo ajustado. É possível observar que os resíduos seguem uma distribuição normal, cumprindo uma das premissas do teste para obtenção de um bom modelo.



**Figura 4. Análise de resíduos do modelo preditivo: histograma de resíduos padronizados.**



**Figura 5. Análise de resíduos do modelo preditivo: gráfico PP dos resíduos padronizados.**

*Composição microbiológica salivar quanto a Streptococcus mutans e Bifidobacteria*

A Tabela 5 sumariza os resultados encontrados na análise microbiológica salivar dos grupos classificados como tendo eutrofia, sobrepeso e obesidade.

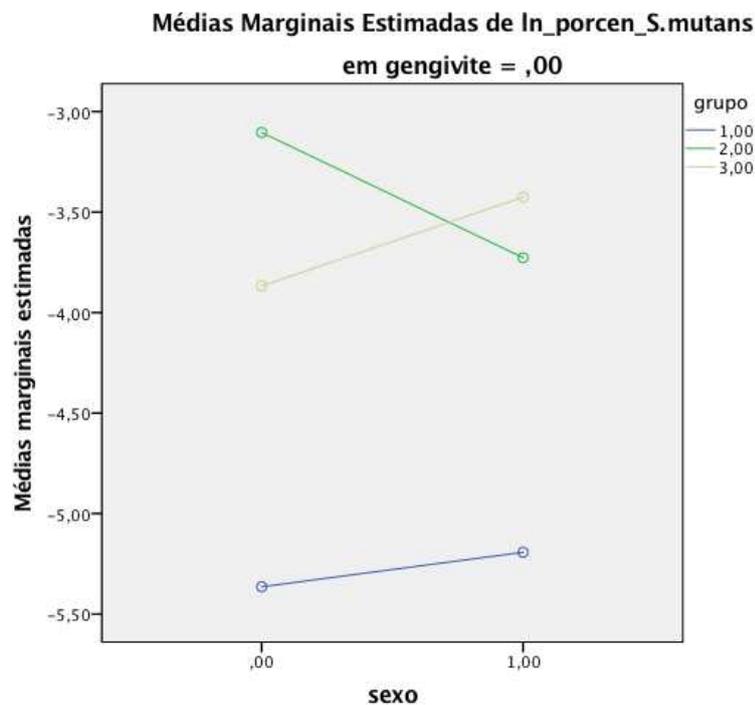
**Tabela 5. Porcentagem de *Streptococcus mutans* e Bifidobacteria em relação à carga bacteriana total: modelo linear geral de três vias**

Grupos	% <i>Streptococcus mutans</i>	% <i>Bifidobacteria</i>
	Média (DP)	Média (DP)
	(n total – n válido)	(n total – n válido)
<b>Meninas eutrofia</b>	2,79 (5,16) (51-50)	3,97 (7,54) (51-51)
<b>Meninos eutrofia</b>	2,05 (4,62) (69-67)	1,86 (5,44) (69-69)
<b>Meninas sobrepeso</b>	5,11 (10,79) (26-25)	8,66 (30,04) (26-26)
<b>Meninos sobrepeso</b>	5,46 (12,43) (30-29)	1,40 (2,77) (30-30)
<b>Meninas obesidade</b>	3,42 (4,85) (18-17)	6,36 (17,76) (18-17)
<b>Meninos obesidade</b>	1,44 (2,30) (19-19)	2,96 (5,34) (19-19)
<i>Efeito grupo (p)</i>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
<i>Efeito sexo (p)</i>	0,194	0,955
<i>Efeito gengivite (p)</i>	0,398	0,762
<i>Efeito grupo*sexo*gengivite (p)</i>	0,594	0,863
<i>F †</i>	0,285	0,147
<i>Eta parcial quadrado †</i>	0,002	0,002
<i>Poder do teste †</i>	0,083	0,072

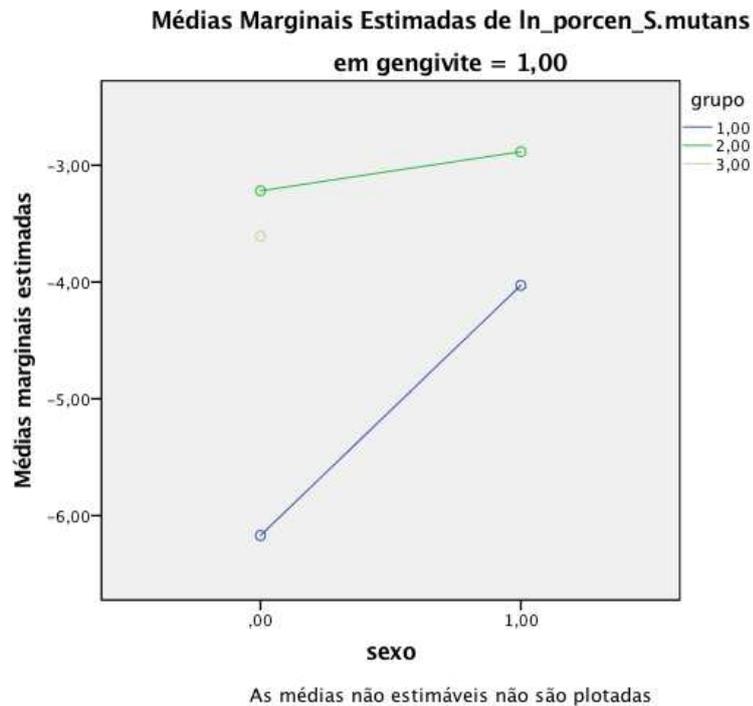
† parâmetros da interação grupo\*sexo\*gengivite - modelo linear geral de três vias

O efeito *grupo* foi significativo para a % *S. mutans*, com tamanho do efeito moderado e poder do teste maior que 80% ( $F=11,993$ ;  $Eta$  parcial quadrado= 0,14; poder do teste=0,995); o pós teste de Bonferroni mostrou que houve diferença entre os grupos eutrofia e sobrepeso e eutrofia e obesidade ( $p<0,05$ ) para a % *S. mutans*, com médias marginais menores para o grupo eutrofia (Tabela 5).

A análise dos gráficos abaixo mostra que o grupo eutrofia (linha azul) apresentou uma porcentagem de *S. mutans* menor que os grupos sobrepeso (linha verde) e obesidade (linha amarela), tanto em indivíduos sem gengivite (Figura 6) e com gengivite (Figura 7). O fator *sexo* não teve influência na % *S. mutans*.

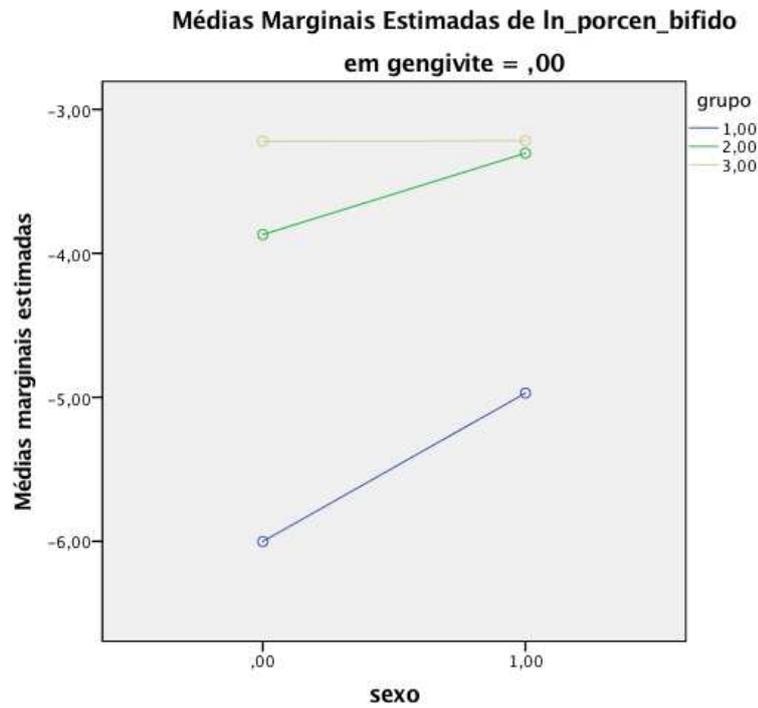


**Figura 6.** Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= eutrofia; 2= sobrepeso; 3= obesidade) sobre a % *S. mutans* (eixo Y) em indivíduos sem gengivite.

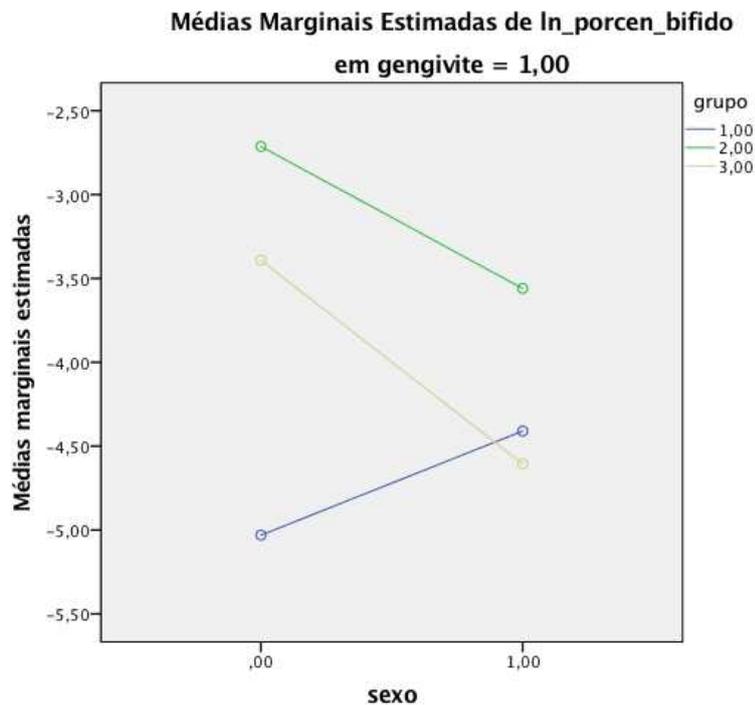


**Figura 7. Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= eutrofia; 2= sobrepeso; 3= obesidade) sobre a % *S. mutans* (eixo Y) em indivíduos com gengivite.**

A Tabela 5 mostra que o efeito *grupo* também foi significativo para a % *Bifidobacteria*, com tamanho do efeito pequeno mas poder do teste maior que 80% ( $F=7,467$ ;  $\eta^2$  parcial quadrado=0,095; poder=0,938); o pós teste de Bonferroni também encontrou diferenças entre os grupos eutrofia e sobrepeso e eutrofia e obesidade, com médias marginais menores para o grupo eutrofia. Pela análise gráfica é possível ver que o grupo eutrofia (linha azul) apresentou uma porcentagem de *Bifidobacteria* menor que os grupos sobrepeso (linha verde) e obesidade (linha amarela), tanto em indivíduos sem gengivite (Figura 8) e com gengivite (Figura 9). O fator *sexo* não teve influência na % *S. mutans*.



**Figura 8.** Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= eutrofia; 2= sobrepeso; 3= obesidade) sobre a % *Bifidobacteria* (eixo Y) em indivíduos sem gengivite.



**Figura 9.** Gráfico de interação obtido entre os fatores *sexo* (1=mulheres; 0= homens) e *grupo* (1= eutrofia; 2= sobrepeso; 3= obesidade) sobre a % *Bifidobacteria* (eixo Y) em indivíduos com gengivite.

## 6. DISCUSSÃO

### *Caracterização da amostra quanto à composição corporal, saúde bucal e expressão do fator nuclear Kappa B em saliva*

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995) sugeriu o uso do Índice de Massa Corporal (IMC = peso/estatura<sup>2</sup>) para triagem de adolescentes com sobrepeso e obesidade por ser bem correlacionado com a gordura corporal, ser de fácil obtenção, ter referências para comparações e ainda permitir uma continuidade do critério utilizado para avaliação de adultos (Must et al., 1991). Porém, estabelecer um critério antropométrico universal para avaliação da obesidade em adolescentes é muito mais complexo do que para outros grupos etários por causa da grande variação no processo de crescimento e desenvolvimento durante a puberdade entre os indivíduos e entre as populações (Pietrobelli et al., 1998; Dietz e Bellizzi, 1999). Na verdade, o IMC é um índice para aferir excesso de peso e não de gordura corporal, por isso continua a discussão em torno da sua capacidade preditiva na identificação de jovens com gordura corporal elevada (Freedman et al., 2004). A impedância bioelétrica tem sido uma alternativa atraente na avaliação da composição corporal pela possibilidade de se trabalhar com equipamento não invasivo, portátil, de fácil manuseio e, portanto, mais viável para estudos populacionais (Houtkooper et al., 1996). Em adolescentes, a bioimpedância apresentou maior exatidão do que as dobras cutâneas (Schaefer et al., 1994) e uma boa conformidade na predição de massa livre de gordura e gordura corporal (Schaefer et al., 1994; Houtkooper et al., 1992; Wu et al., 1993) sendo analisada a sua utilização em outros estudos de validação do IMC em crianças e adolescentes (Mei et al., 2002; Veiga et al., 2001; Reilly et al., 2000).

Neste estudo, os adolescentes foram classificados como tendo eutrofia, sobrepeso ou obesidade com base no critério IMC para idade e sexo (WHO, 2007), assim como foi utilizada a porcentagem de gordura avaliada por impedância bioelétrica para comparar os grupos de adolescentes que se posicionaram acima ou abaixo do ponto de corte, proposto para jovens estudantes colombianos (Ramírez-Vélez et al., 2017). Em adolescentes, a impedância bioelétrica mostrou maior precisão do que o uso de dobras cutâneas e uma boa acurácia na predição de massa livre de gordura e gordura corporal (Houtkooper et al., 1992; Wu et al., 1993; Schaefer et al., 1994), sendo verificada a sua utilização em estudos de validação do IMC em crianças e adolescentes (Reilly et al., 2000; Veiga et al., 2001; Mei et al., 2002). Porém, a proposição de pontos de corte e referências mais precisas para identificar adolescentes com gordura corporal elevada continua sendo um desafio. Estudos observaram que entre meninos e meninas com valores semelhantes de IMC, as meninas tiveram médias maiores de percentual

de gordura corporal que meninos e, estes últimos, maior quantidade de massa livre de gordura (Taylor et al., 2000; Lindsay et al., 2001; Veiga et al., 2001; Taylor et al., 2002).

A frequência de sangramento gengival e gengivite não diferiu entre os voluntários classificados como tendo eutrofia, sobrepeso e obesidade. De acordo com alguns autores (Saito e Shimazaki 2007, Ylöstalo et al., 2008), as evidências disponíveis naquele momento que apoiavam a existência de um mecanismo biológico comum – a inflamação - entre o excesso de peso e a doença periodontal não são totalmente convincentes e sugeriram a existência de um fator mediador deste processo: o estilo de vida, que pode relacionar-se a uma menor preocupação com a saúde bucal e uma dieta pouco saudável adotada por estes indivíduos. Além disso, a obesidade também se mostra associada a outros fatores de risco para a doença periodontal como, por exemplo, o consumo de carboidratos (Hujoel, 2009). Assim, a obesidade pode ser um marcador de um comportamento arriscado para a doença periodontal, não um fator de risco (Hujoel 2009).

Modèer et al. (2010) investigaram um grupo de 104 crianças e adolescentes classificados como tendo eutrofia ou obesidade, com idades entre 11 e 17 anos. Além de um pior comportamento de higiene, indivíduos com obesidade apresentaram uma frequência significativamente maior de bolsas periodontais e de locais com sangramento à sondagem em relação aos controles, enquanto não houve diferença no número de sextantes com sangramento à sondagem entre os grupos estudados. Uma metanálise realizada em 2015 sugeriu que a obesidade pode estar relacionada a alguns sinais de doenças periodontais em crianças e adolescentes, particularmente no que diz respeito à inflamação gengival (Li et al., 2015). Também, outra metanálise publicada em 2017 corroborou o estudo anterior, concluindo que as evidências disponíveis sugeriam uma associação positiva entre a doença periodontal e a obesidade em crianças (Martens et al., 2017).

Em adultos, uma metanálise conduzida em 2010 afirmou existir associação positiva coerente e um papel biologicamente plausível para a obesidade no desenvolvimento da doença periodontal (Chaffee et al., 2010). Mas é importante enfatizar que poucos estudos prospectivos foram realizados, em especial no Brasil. Conforme apontado por Winning e Linden (2017), este tipo de estudo é necessário para saber se realmente existe uma relação de causalidade entre a obesidade e a doença periodontal. Estudos recentes (Pink et al., 2015; Pitchika et al., 2017) citam alterações nos níveis plasmáticos da proteína C reativa, fibrinogênio e leucócitos circulantes como possíveis fatores em comum entre a periodontite e a obesidade, diabetes e outras condições inflamatórias. Mas, como afirmado por outro estudo recente, mais estudos são

necessários para saber se de fato a obesidade exacerba o processo inflamatório gengival (Franks & Atabaki-Pasdar, 2017).

O diagnóstico, prognóstico e terapêutica da inflamação incluem a mensuração de marcadores biológicos (biomarcadores) em espécimes biológicos; vários espécimes podem ser estudados, como o sangue, urina, saliva, cabelo e fezes. A dosagem plasmática ou sérica é a prática padrão atual para o diagnóstico clínico; entretanto, novos meios diagnósticos como a saliva e urina têm se tornado atraentes e cada vez mais populares por suas naturezas não invasivas (Prasad et al., 2016). Os principais marcadores inflamatórios incluem o fator de necrose tumoral, interleucinas IL1, IL6 e IL8, proteína C reativa, entre outros, os quais são regulados pelo fator nuclear Kappa B e podem ser quantificados em saliva. Enquanto alguns testes diagnósticos em saliva já estão bem estabelecidos, outros ainda estão nas fases iniciais do seu desenvolvimento e requerem mais estudos para se determinar sua viabilidade e utilidade na prática clínica (Desai et al., 2014).

O fator NF-KB é expresso em muitos tipos celulares e, quando não estimulado, encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória; este complexo impede a translocação do NF-KB para o núcleo e a fosforilação e degradação do I $\kappa$ B são necessárias para que ocorra a translocação, que ocorre com um estímulo celular (por ex., lipopolissacarídeos, citocinas pró-inflamatórias e infecção viral). Este é o primeiro estudo que buscou quantificar o fator nuclear NF-KB em saliva e os resultados mostraram um número reduzido de amostras em que foi possível dosar a expressão deste fator de transcrição, provavelmente advindo de células da mucosa oral, do ligamento periodontal e glândulas salivares. A expressão de  $\beta$  actina foi observada em todas as amostras salivares, validando a técnica. Cada glândula salivar é altamente permeável e envolvida por capilares, permitindo a troca de moléculas entre o sangue e as células acinares, embora os mecanismos pelos quais muitos dos biomarcadores chegam à saliva são ainda obscuros e mais estudos são necessários (Yoshizawa et al., 2013).

#### ***Avaliação físicoquímica salivar e obtenção de modelo preditivo para porcentagem de gordura***

A produção de saliva é um processo complexo que envolve um controle autonômico (simpático e parassimpático) e a regulação endócrino/parácrina. Este controle é vital para a manutenção dos tecidos intraorais, pois alterações na quantidade e na qualidade dos fluidos orais são deletérias para a saúde bucal (Yoshizawa et al., 2013). O presente estudo observou que o fluxo salivar estimulado foi menor no grupo de adolescentes que estava acima do ponto de corte para a porcentagem de gordura, embora com tamanho de efeito pequeno e pouco

significado clínico, já que os valores encontrados se situam dentro da faixa considerada como normal. A diminuição do fluxo salivar em crianças com excesso de peso pode ser explicada devido ao descontrole metabólico no qual a desidratação aumenta os gradientes osmóticos dos vasos sanguíneos em relação às glândulas salivares, limitando a secreção de saliva. Uma taxa de fluxo salivar reduzida em pacientes obesos adultos pode também estar relacionada a efeitos colaterais de vários medicamentos utilizados para tratar doenças concomitantes à obesidade (Fenoll-Palomares et al., 2004).

Estudos prévios encontraram uma forte correlação entre o ácido úrico sérico e o salivar (Nunes et al., 2011; Soukup et al. 2012; Zhao et al., 2015), possibilitando o uso do ácido úrico como um biomarcador promissor no estudo da obesidade e na identificação do risco de doenças crônicas e metabólicas. O ácido úrico é um composto orgânico, produzido endogenamente no fígado sendo o principal antioxidante hidrofílico do organismo que, dessa forma, inibe a ação de radicais livres sobre moléculas orgânicas. No entanto, altos níveis de ácido úrico podem ser causados pela ingestão de grandes quantidades de açúcar, jejum, perda rápida de peso ou redução na função excretora renal e seu aumento crônico está associado ao risco de doenças crônicas não transmissíveis (Tsouli et al., 2006). Ter, ao mesmo tempo, alto índice de adiposidade e altos níveis de ácido úrico em jovens está associado à síndrome metabólica em crianças e adolescentes (Ford et al., 2007; Tailor et al., 2010).

Este trabalho é o primeiro a propor um modelo preditivo para porcentagem de gordura de acordo com a concentração de ácido úrico e sexo em adolescentes brasileiros, que explica 51% da variação na porcentagem de gordura da amostra estudada. Apenas um estudo recente fez abordagem semelhante em crianças (Martínez et al., 2017), o qual utilizou um modelo de equações estruturais para avaliar a concentração salivar de ácido úrico a partir de uma amostra de indivíduos de origem mexicana (n=65), com idades entre 2 meses e 18 anos. Corroborando os resultados do presente estudo, Martinez et al. (2017) encontraram uma relação positiva entre maior quantidade de massa corporal e ácido úrico salivar, particularmente entre meninas e mulheres; similarmente ao ácido úrico sérico, os níveis salivares parecem aumentar entre a adolescência e a fase adulta para ambos os sexos, mas seus níveis são mais altos em homens na fase adulta. No presente estudo, o efeito do *sexo* também foi observado entre os adolescentes incluídos, cujas idades variaram entre 14 e 17 anos, corroborando estudos anteriores que mostraram o efeito de andrógenos sobre o ácido úrico sérico (Garbagnati e Boschetti, 1994; Garbagnati, 1996). Ainda de acordo com dois estudos prévios (Soukup et al. 2012; Martinez et al., 2016), a variância nos níveis de ácido úrico salivar parece não depender do fluxo de saliva

e estes achados mostram a significância clínica do uso deste marcador nos estudos relacionados à obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, mesmo em indivíduos jovens.

Os achados do presente estudo também estão de acordo com Choromańska et al. (2015), os quais observaram que o ácido úrico salivar estava aumentado em pessoas com obesidade e que o mesmo poderia fornecer um índice útil do risco cardiometabólico. Outro estudo também mostrou que a concentração de ácido úrico foi significativamente maior em pacientes com síndrome metabólica, com diferenças com relação ao sexo. A relação entre a concentração de ácido úrico salivar e síndrome metabólica foi mais forte nas mulheres do que nos homens e também foi observada uma correlação entre o ácido úrico sérico e salivar, pressão arterial sistólica e diastólica, circunferência da cintura, IMC, glicemia, triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade e o número de fatores de risco cardiometabólicos (Soukup et al. 2012).

A vitamina D e seus metabólitos têm grande importância para a saúde e bem-estar devido ao seu papel na homeostase do cálcio e no metabolismo ósseo, sendo que a determinação do seu *status* pode ser realizada por cromatografia líquida, imunoenensaio, espectrometria de massa, entre outras técnicas. De acordo com uma metanálise, a prevalência da deficiência de vitamina D é 35% maior em indivíduos com obesidade quando comparados aos indivíduos com eutrofia, e 24% maior naqueles com sobrepeso, independentemente da idade (Pereira-Santos et al., 2015). Os resultados do presente estudo não encontraram diferença nos níveis de 25-hydroxivitamina D2 e 25-hydroxivitamina D3 dosados em saliva entre os grupos eutrofia, sobrepeso e obesidade, o que pode ser devido ao limite de detecção do método de cromatografia líquida de alta eficiência, que foi de 0,5 ng/ml, considerando que a amostra foi concentrada 5 vezes para quantificação. Um estudo afirmou existir uma relação linear positiva entre o nível sérico 25-(OH)-D3, que é convencionalmente usado como meio de avaliação do estado da vitamina D e o nível salivar de 25-(OH)-D3, porém utilizou método cromatografia líquida sensível de eletro-pulverização - método de espectrometria de massa, considerados metodologias mais sensíveis (Higashi et al., 2008) O método do estudo de Higashi et al. (2008) também permitiu a detecção do aumento do nível salivar de 25-(OH)-D3 após a suplementação de vitamina D3.

Também não foi observada diferença nos níveis salivares de colesterol e óxido de colesterol entre os grupos. Estudos prévios que utilizaram diferentes metodologias para dosagem afirmaram existir uma correlação entre os níveis séricos e salivares de marcadores do perfil lipídico, podendo este fluido corporal refletir o estado fisiológico do corpo, incluindo variações metabólicas (Karjalainen et al., 1997; Singh et al., 2014; De Giuseppe et al., 2015; Al-Rawi e Shahid, 2017). O estudo de De Giuseppe et al. (2015) avaliou a composição salivar

e sérica de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, que constituem um fator de risco cardiovascular, encontrando correlação significativa entre as concentrações desses dois fluidos corporais, as quais também foram superiores em indivíduos com sobrepeso e obesidade. A concentração de parâmetros lipídicos encontrada em saliva foi consistentemente inferior à sérica em dois estudos encontrados (Singh et al., 2014; De Giuseppe et al., 2015), levando muitas vezes à perda de sensibilidade da técnica, o que pode ter ocorrido na técnica utilizada no presente estudo justificando, assim, o fato de não ter sido encontrada diferença nos parâmetros avaliados do perfil lipídico entre os grupos com diferentes composições corporais. Há que se considerar também, tanto para os resultados encontrados para a vitamina D2 e D3 e para o colesterol salivares, que este se trata de um estudo que envolveu indivíduos jovens de 14 a 17 anos, enquanto os estudos citados incluíram adultos que tinham não só excesso de peso, mas, também, comorbidades.

As concentrações de fósforo, cálcio e ureia analisadas em saliva não apresentaram diferenças significativas relacionadas à obesidade; porém, as concentrações de fósforo e ureia mostraram-se dependentes do *sexo* e foram maiores entre adolescentes do sexo masculino. Estes achados concordam com o estudo de Campos et al. (2014) que avaliaram as concentrações desses analitos em crianças com sobrepeso e obesidade, utilizando a mesma metodologia, e não encontraram diferenças significativas. Um estudo realizado em 2017 também não encontrou diferença na concentração de ureia em soro de adolescentes com excesso de peso (Ghomari-Boukhatem et al., 2017).

A ureia salivar é um indicador da síntese protéica nas células acinares; é um componente orgânico normal da saliva que causa uma rápida elevação no pH do biofilme dentário e, quando sua concentração está elevada na saliva, pode indicar uma alteração sistêmica, principalmente em indivíduos idosos (Pajukoski et al., 1997). Por fim, devido à alta variabilidade nos parâmetros avaliados neste estudo entre indivíduos com sobrepeso e obesidade, além das diferenças inerentes ao sexo como a porcentagem de gordura, por exemplo, vê-se a necessidade de uma abordagem abrangente do indivíduo na prática clínica, afim de identificar corretamente os desvios e estabelecer programas preventivos e terapêuticos adequados.

### ***Composição microbiológica salivar em termos de S. mutans e Bifidobacteria***

Segundo Palacios et al. (2009), a sacarose consumida várias vezes ao dia em pequenas quantidades pode aumentar os níveis salivares de *S. mutans*. No presente estudo e considerando os fatores *sexo* e *presença de gengivite*, o grupo eutrófico apresentou uma menor porcentagem de *S. mutans* em relação aos outros dois grupos (sobrepeso e obesidade). Estudos prévios

associaram a ingestão de alimentos açucarados e o IMC com diferenças na contagem de microrganismos cariogênicos (Barkeling et al., 2001; Barkeling et al., 2002; Nigro et al., 2015). Por outro lado, no estudo de Tong et al. (2014), crianças com obesidade não mostraram diferenças significativas de *Streptococcus mutans* e contagem de unidades formadoras de lactobacilos salivares em comparação com crianças com peso normal.

Entretanto, alguns pontos devem ser ponderados. O risco de cárie dentária aumentaria na presença de altos níveis de *S. mutans* no biofilme dentário associada à frequência de consumo de açúcar, principalmente quando o açúcar é mantido na boca por longos períodos (Karjalainen et al., 2015). Ainda, Vågstrand et al. (2007), em uma revisão, ressaltaram que devido a muitos fatores confundidores a contagem de bactérias não deve ser usada de forma isolada como uma medida precisa da ingestão de açúcar. Um estudo conduzido por Goodson et al., em 2017, apóia a idéia de que o aumento das concentrações de glicose salivar pode ser a principal causa de alterações no microbioma oral.

Estudos recentes têm afirmado que a microbiota intestinal é um importante regulador do peso corporal e as espécies de *Bifidobacterium* melhorariam o estado metabólico. Neste sentido, os probióticos têm sido usados com objetivo de modular a microbiota intestinal; probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde, melhorando a barreira imunológica do intestino e diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias associadas a alergia sistêmica ou local (Inoue e Shimojo, 2015). A maioria dos probióticos são compostos por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Embora não tivessem sido descobertos patógenos gastrointestinais específicos que induzissem à obesidade ou diabetes em camundongos, estas condições estiveram associadas à redução da abundância de *Bifidobacteria* intestinal em estudos prévios (Cani et al., 2007; Kondo et al., 2010).

Um estudo que propôs que o diabetes mellitus e obesidade estariam relacionadas as características específicas da microflora da boca e do trato gastrointestinal inferior utilizou amostras orais, fecais e plasmáticas para avaliar a microflora de pacientes submetidos à gastroplastia (Shillitoe et al., 2012). Os autores observaram que antes da cirurgia os pacientes obesos com diabetes mellitus tipo 2 apresentaram uma carga bacteriana total levemente superior à daqueles que não tinham diabetes e aqueles com níveis de hemoglobina glicada >6,5% apresentaram níveis bastante baixos de *Bifidobacteria* na boca e nas fezes. Duas semanas após a cirurgia, os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 foram capazes de reduzir ou interromper seus medicamentos hipoglicêmicos; os níveis de Bifidobactérias orais aumentaram 10 vezes enquanto os níveis TNF $\alpha$  diminuíram (Shillitoe et al., 2012). Os autores destacaram ainda que os níveis de *Bifidobacteria* na boca pareciam refletir aqueles no trato gastrointestinal inferior.

Em contrapartida, no presente estudo o grupo com eutrofia apresentou uma menor porcentagem de *Bifidobacteria* em relação à carga bacteriana total salivar quando comparado aos outros dois grupos de adolescentes (sobrepeso e obesidade). Mais estudos que tenham avaliado a composição salivar em termos de *Bifidobacteria* não foram encontrados.

No estudo de Gao et al. (2015), crianças com obesidade apresentaram uma menor razão *Bifidobacteria*/*E. coli* intestinal em comparação com crianças sem obesidade; este achado, juntamente com os achados de Kalliomäki et al. (2008), sugerem que a obesidade em crianças pode estar associada ao desequilíbrio na microbiota intestinal.

Por outro lado, o estudo de Yin et al. (2010) mostrou que a suplementação da dieta com diferentes cepas de *Bifidobacteria* em um modelo experimental levou a diferentes respostas do metabolismo energético (glicêmico e lipídico), com ganho ou perda de peso corporal. Ainda, Santacruz et al. (2009) conduziram um estudo da influência de um programa de perda de peso na microbiota intestinal de adolescentes com idades entre 13 e 15 anos; o grupo com maior perda de peso apresentou níveis menores de *Bifidobacterium* quando comparado ao grupo que perdeu menos peso após a intervenção.

Dada a complexa relação que cada espécie bacteriana tem entre si e entre diferentes compartimentos do corpo (boca e intestino, por exemplo), vê-se a importância de aprofundar o entendimento desta interação, em especial em uma condição multifatorial como a obesidade.

## 7. CONCLUSÃO

A frequência de sangramento gengival e gengivite não diferiu entre os adolescentes classificados como eutrofia, sobrepeso e obesidade.

Não houve diferença entre os grupos para os parâmetros bioquímicos 25-hidroxivitamina D2 e D3, colesterol, 7-cetocolesterol, fósforo, cálcio e a ureia. Entretanto, o ácido úrico salivar mostrou ser um importante marcador do acúmulo de gordura corporal e um modelo preditivo para porcentagem de gordura corporal de acordo com a concentração de ácido úrico salivar e o sexo foi proposto.

O grupo de adolescentes com eutrofia apresentou menor porcentagem de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacteria* em relação à carga bacteriana total salivar quando comparado com os outros dois grupos (sobrepeso e obesidade), considerando os fatores sexo e presença de gengivite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidante status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diab Vasc Dis Res.* 2011; 8(1):22-8.
- Al-Rawi NH, Shahid AM. Oxidative stress, antioxidants, and lipid profile in the serum and saliva of individuals with coronary heart disease: is there a link with periodontal health? *Minerva Stomatol.* 2017; 66(5):212-225.
- Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawskit EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *J Periodontol* 2003; 74:610–615.
- Araujo DS, Marquezin M, Barbosa TS, Fonseca F, Fegadolli C, Castelo PM. Assessment of quality of life, anxiety, socio-economic factors and caries experience in Brazilian children with overweight and obesity. *Int J Dent Hyg.* 2017 Nov; 15(4):e156-e162
- Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci. Rep.* 2014; 4:4828.
- Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandragunasekaran AM, Ramakrishna BS. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* 2010; 103(3),335–338.
- Barbosa MCC, Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC, Campana EMG; Fonseca FL, Pizzi OL, Freitas EV, Brandão AP. Associação entre ácido úrico e variáveis de risco cardiovascular em uma população não hospitalar. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.96 no.3 São Paulo Mar. 2011; Epub01-26.
- Barkeling B, Andersson I, Lindroos AK, Birkhed D, Rössner S. Intake of sweet foods and counts of cariogenic microorganisms in obese and normal-weight women. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55:850-5.
- Barkeling B, Linné Y, Lindroos AK, Birkhed D, Rooth P, Rössner S. Intake of sweet foods and counts of cariogenic microorganisms in relation to body mass index and psychometric variables in women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26:1239-44.
- Barroso HC. Influência do Nebivolol sobre o estresse oxidativo em pacientes hipertensos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.
- Baskaran C, Kandemir N. Update on endocrine aspects of childhood obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018; 25(1):55-60.

- Bastos MCF, Ceotto H, Coelho MLV, Nascimento JS. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009; 10(1): 38-61.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382(2):393-409.
- Bialo SR, Gordon CM. The Weight of Vitamin D on Obesity Outcomes: What Do We Know? *J Adolesc Health*. 2015; 57(1):1-2.
- Blicher B, Joshipura K, Eke P. Validation of self-reported periodontal disease: a systematic review. *J Dent Res*. 2005; 84(10):881-90.
- Bouet P, Arlabosse T, Viswanathan B, Mybs G. Association between obesity indices and cardiovascular risk factor in late adolescence in the Seychelles. *BMC Pediatrics* 2012; 12, 176
- Brooks, G. C., Blaha, M. J. & Blumenthal, R. S. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. *American Journal of Cardiology* 2010; 106, 56–61.
- Campos MM, Kobayashi FY, Barbosa TdeS, Costa SdaS, Lucas Bde L, Castelo PM. Characteristics of salivary secretion in normal-weight, overweight and obese children: a preliminary study: salivary composition and excessive fat tissue. *Odontology*. 2014; 102(2):318-24.
- Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007; 50(11):2374-83.
- Cardoso AS, Gonzaga NC, Medeiros CC, Carvalho DF. Association of uric acid levels with components of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in overweight or obese children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2013; 89(4):412-8.
- Castro M, Moreira AC. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(4):358-367.
- Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013; 4:267-76.
- Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2010; 81:1708–24.

- Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 272(2):154-62.
- Chielle EO, Casarin JN. Evaluation of salivary oxidative parameters in overweight and obese young adults. *Arch Endocrinol Metab.* 2017; 61(2):152-159.
- Choromańska K, Choromańska B, Dąbrowska E, Bączek W, Myśliwiec P, Dadan J3, Zalewska A4. Saliva of obese patients - is it different? *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015; 2;69:1190-5.
- Cunha KA, Magalhães EI, Loureiro LM, Sant'Ana LF, Ribeiro AQ, Novaes JF. Calcium intake, serum vitamin D and obesity in children: is there an association? *Rev Paul Pediatr.* 2015; 33(2):222-9.
- Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 2008; 139:18S-24S.
- De Giuseppe R, Cossellu G, Vigna L, Dicorato F, De Vita C, Venturelli G, Bamonti F, Maiavacca R4 Farronato G. Correlation between salivary and serum oxidized LDL levels: a pilot study on overweight/obese subjects. *J Oral Pathol Med.* 2015; 44(10):884-7.
- Desai DG, Mathewa ST. Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World J Diabetes.* 2014; 15;5(6):730-8.
- Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PG, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut* 2012; 62(8):1112–21.
- Dietz WH, Bellizzi MC. Introduction: the use of body mass index to assess obesity in children. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:123-5.
- Eckley CA, Costa HO. Comparative study of salivary pH and volume in adults with chronic laryngopharyngitis by gastroesophageal reflux disease before and after treatment. *Braz J Otorhinolaryngol* 2006; 72(1):55-60.
- Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J.* 1990; Aug 11-25;169 (3-4): 96-8.
- Epstein LH, Paluch R, Coleman KJ. Differences in salivation to repeated food cues in obese and nonobese women. *Psychosom Med* 1996; 58:160–164.
- Fenoll-Palomares C, Muñoz-Montagud JV, Sanchiz V. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004; 96:773–83.

- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7):4117-20.
- Fiyaz M, Ramesh A, Ramalingam K, Thomas B, Shetty S, Prakash P. Association of salivary calcium, phosphate, pH and flow rate on oral health: A study on 90 subjects. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17(4):454-60.
- Flink H, Bergdahl M, Tegelberg A, Rosenblad A, Lagerlöf F. Prevalence of hyposalivation in relation to general health, body mass index and remaining teeth in different age groups of adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 2008; 36:523–531.
- Ford ES, Li C, Cook S, Choi HK. Serum concentrations of uric acid and the metabolic syndrome among US children and adolescents. *Circulation*. 2007; 115(19):2526-32.
- Franchini R, Petri A, Migliario M, Rimondini L. Poor oral hygiene and gingivitis are associated with obesity and overweight status in paediatric subjects. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 1021–1028.
- Francisch RPP, Pereira LO, Freitas CS, Klopfer M, Santos R C, Vieira P et al. Obesidade: Atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Revista de Nutrição* 2000; 13(1):17-28.
- Franks PW, Atabaki-Pasdar N. Causal inference in obesity research. *J Intern Med*. 2017; 3;281(3):222-232.
- Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Interrelationships among childhood BMI childhood height and adult obesity: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes*. 2004; 28:10-6.
- Gao X, Jia R, Xie L, Kuang L, Feng L, Wan C. Obesity in school-aged children and its correlation with gut E.coli and Bifidobacteria: a case-control study. *BMC Pediatr*. 2015; 30;15:64.
- Garbagnati E, Boschetti M. Uric acid homeostasis in lean and obese girls during pubertal development. *Metabolism*. 1994; 43(7):819-21.
- Garbagnati, E. Urate changes in lean and obese boys during pubertal development. *Metabolism* 1996; 45,203–205.
- Ghomari-Boukhatem H, Bouchouicha A, Mekki K, Chenni K, Belhadj M, BouchenakM. Blood pressure, dyslipidemia and inflammatory factors are related to body mass index in scholaradolescents. *Arch Med Sci*. 2017; 1;13(1):46-52.
- Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology* 2000; 50p. 52-64.

- González L, Ramos-Trautmann G, Díaz-Luquis GM, Pérez CM, Palacios C. Vitamin D status is inversely associated with obesity in a clinic based sample in Puerto Rico. *Nutr Res.* 2015; 35(4):287-93.
- Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? *J. Dent. Res.*, 2009; 88: 519-523.
- Goodson JM, Hartman ML, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, Song X, Cugini M, Barake R, Alsmadi O, Al-Mutawa S, Ariga J, Soparkar P, Behbehani J, Behbehani K. The salivary microbiome is altered in the presence of a high glucose concentration. *PLoS One.* 2017; Mar1;12(3):e0170437.
- Grec PGM. Impacto da cirurgia bariátrica na condição periodontal e quantificação de bactérias periodontopatogênicas por meio de q-PCR: Estudo longitudinal. Bauru:Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo; 2012.
- Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47(5):367-73.
- Hashizume LN, Bastos LF, Cardozo DD, Hilgert JB, Hugo FN, Stein AT, Souto KE, Meinhardt NG. Impact of Bariatric Surgery on the Saliva of Patients with Morbid Obesity. *Obes Surg.* 2015; 25(8):1550-5.
- Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. *Monogr Oral Sci.* 2014; 24:1-13.
- Higashi T, Hijikuro M, Yamagata K, Ogawa S. Overestimation of salivary 25-hydroxyvitamin D3 level when using stimulated saliva with gum-chewing. *Steroids.* 2013; 78(9):884-7.
- Higashi T, Shibayama Y, Fuji M, Shimada K. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D3: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391(1):229-38
- Hollister EB, Riehle K, Luna RA, Weidler EM, Rubio-Gonzales M, Mistretta TA, Raza S, Doddapaneni HV, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, Petrosino JF, Shulman RJ, Versalovic J. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome.* 2015; 26;3:36.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091):87-91.

- Hou YP, He QQ, Ouyang HM, Peng HS, Wang Q, Li J, Lv XF, Zheng YN, Li SC, Liu HL, Yin AH. Human Gut Microbiota Associated with Obesity in Chinese Children and Adolescents. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:7585989.
- Houtkooper LB, Going SB, Lohman TH, Roche AF, van Loan M. Bioelectrical impedance estimation of fat-free body mass in children and youth: a cross validation study. *J Appl Physiol*. 1992; 72:366-73.
- Houtkooper LB, Lohman TG, Going SB, Howell WH. Why bioelectrical impedance analysis should be used for estimating adiposity. *Am J Clin Nutr*. 1996; 64:436-8.
- Hujoel P. Dietary carbohydrates and dental-systemic diseases. *Journal of Dental Research* 2009; 88,490–502.
- Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001; 85(2):162-9.
- Inoue K, Namiki T, Iwasaki Y, Yoshimura Y, Nakazawa H. Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2003; 785,57–63.
- Inoue Y, Shimojo N. Microbiome/microbiota and allergies. *Semin Immunopathol*. 2015; 37(1):57-64.
- Izawa S, Miki K, Liu X, Ogawa N. The diurnal patterns of salivary interleukin-6 and C-reactive protein in healthy young adults. *Brain Behav Immun*. 2013; 27:38-41.
- Kaïdashev IP. NF-κB activation as a molecular basis of pathological process by metabolic syndrome. *Fiziol Zh*. 2012; 58(1):93-101.
- Kallio P, Nordblad A, Croucher R, Ainamo J. Self-reported gingivitis and bleeding gums among adolescents in Helsinki. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1994; 22(5 Pt 1):277-82.
- Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(3):534-8.
- Karjalainen S, Sewon L, Söderling E, Larsson B, Johansson I, Simell O, Lapinleimu H, Seppänen R. Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J Dent Res*. 1997; 76(10):1637-43.
- Karjalainen S, Tolvanen M, Pienihäkkinen K, Söderling E, Lagström H, Simell O, Niinikoski H. High sucrose intake at 3 years of age is associated with increased salivary counts of mutansstreptococci and lactobacilli, and with increased caries rate from 3 to 16 years of age. *Caries Res*. 2015; 49(2):125-32.

- Katz J, Bimstein E. Periodontal disease and obesity in children. *Isr Med Assoc J.* 2010; Dec;12(12):775-6.
- Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol.* 2000; Jul;27(7):453-65.
- Kim KM, Henderson GN, Frye RF, Galloway CD, Brown NJ, Segal MS, Imaram W, Angerhofer A, Johnson RJ. Simultaneous determination of uric metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 1;877(1-2):65-70.
- Knaś M, Maciejczyk M, Sawicka K, Hady HR, Niczyporuk M, LadnyJR, Matczuk J, Waszkiel D, Zendzian-Piotrowska M, Zalewska A. Impact of morbid obesity and bariatric surgery on antioxidant/oxidant balance of the unstimulated and stimulated human saliva. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45(6):455-64.
- Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, Odamaki T, Takahashi S, Sugahara H, Yaeshima T, Iwatsuki K, Kamei A, Abe K. Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74(8):1656-61. Epub 2010 Aug 7.
- Kwon JH, Lee SE, Lee HÁ, Kim YJ, Lee HY, Gwak HS, Park EA, Cho SJ, Oh SY, Há EH, Park H, Kim HS. Relationship of serum 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels and components of metabolic syndrome in prepubertal children. *Nutrition.* 2015; 31(11-12):1324-7.
- Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing: an indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 1990; 17(10):714-21.
- Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clin Nutr.* 2013; 32(6):935-40.
- Lewis JG. Steroid analysis in saliva: an overview; *ClinBiochem Rev.* 2006; v.27,n.3,p.139-146,
- Li J, Tang Y, Cai D. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol.* 2012; 10;14(10):999-1012.
- Li LW, Wong HM, Sun L, Wen YF, McGrath CP. Anthropometric Measurements and Periodontal Diseases in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr.* 2015; 13;6(6):828-41.
- Lindsay RS, Hanson RL, Roumain J, Knowler ERWC, Tataranni A. Body mass index as a measure of adiposity in children and adolescents: relationship to adiposity by dual energy

- x ray absorptiometry and to cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4061-7.
- Liu X, Xian Y<sup>2</sup>, Min M<sup>3</sup>, Dai Q<sup>2</sup>, Jiang Y<sup>2</sup>, Fang D<sup>4</sup> Association of 25 hydroxyvitamin D status with obesity as well as blood glucose and lipid concentrations in children and adolescents in China. *Clin Chim Acta*. 2016; 1;455:64-7.
- Lopez R, Fernandez O, Baelum V. Social gradients in periodontal diseases among adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2006; 34:184–96.
- Lundin M, Yucel-Lindberg T, Dahllöf G, Marcus C, Modéer T. Correlation between TNF $\alpha$  in gingival crevicular fluid and body mass index in obese subjects. *Acta Odontol Scand* 2004; 62:273–277.
- Marsicano J. Avaliação das condições bucais de pacientes obesos e submetidos a cirurgia bariátrica. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP; 2008.
- Martens L, S. De Smet S, Yusof MY, Rajasekharan S. Association between overweight/obesity and periodontal disease in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Paediatr Dent* 2017; 18:69–82
- Martínez AD, Ruelas L, Granger DA. Association between body mass index and salivary uric acid among Mexican-origin infants, youth and adults: Gender and developmental differences. *Dev Psychobiol*. 2017; Mar;59(2):225-234.
- Matzuk J, Zalewska A, Łukaszuk B, Knaś M, Maciejczyk M, Garbowska M, Ziembicka DM, Waszkiel D, Chabowski A, Żendzian-Piotrowska M, Kurek K. Insulin Resistance and Obesity Affect Lipid Profile in the Salivary Glands. *J Diabetes Res*. 2016; 8163474.
- de Miranda JA<sup>1</sup>, Almeida GG<sup>2</sup>, Martins RI<sup>2</sup>, Cunha MB<sup>2</sup>, Belo VA<sup>3</sup>, dos Santos JE<sup>3</sup>, Mourão-Júnior CA<sup>2</sup>, Lanna CM<sup>2</sup>. [The role of uric acid in the insulin resistance in children and adolescents with obesity]. *Rev Paul Pediatr*. 2015; Dec;33(4):431-6.
- Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12(3):206-11.
- Matias I, Gatta-Cherifi B., Tabarin A., Clark S., Leste-Lasserre T., Marsicano G., Piazza P.V., Cota D.: Endocannabinoids measurement in human saliva as potential biomarker of obesity. *PLoS One* 2012; 7:e42399.
- Mayorga Reyes L, González Vázquez R, Cruz Arroyo SM, Melendez Avalos A, Reyes Castillo PA, Chavaro Pérez DA, Ramos Terrones I, Ramos Ibáñez N, Rodríguez Magallanes MM, Langella P, Bermúdez Humarán L, Azaola Espinosa A. Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. *Int J Food Sci Nutr*. 2016; 67(4):470-8.
- Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran IM, Dietz HW. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the

- assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75:978-85.
- Modéer T, Blomberg C, Wondimu B, Lindberg TY, Marcus C. Association between obesity and periodontal risk indicators in adolescents. *Int J Pediatr Obes.* 2009; Jun;6(2-2):e264-70.
- Modéer T, Cecilia C. Blomberg, Biniyam Wondimu, Annika Julihn and Claude Marcus. Association Between Obesity, Flow Rate of Whole Saliva, and Dental Caries in Adolescents. *Obesity* 2010; 18 12:12.
- Moore CE, Liu Y. Low serum 25 hydroxyvitamin D concentrations are associated with total adiposity of child in the United States: National Health and Examination Survey 2005 to 2006. *Nutr Res.* 2016; 36(1):72-9.
- Moreira AR, Passos IA, Sampaio FC, Soares MSM, Oliveira RJ. Flow rate, pH and calcium concentration of saliva of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(8):707-711.
- Moura AFP, Tenuta-Filho A. Efeito do processamento sobre os níveis de colesterol e 7-cetocolésterol em camarão-rosa. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2002; 22(2): 117-121.
- Moura-Grec PG, Marsicano JA, Carvalho CA, Sales-Peres SH. Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet.* 2014; 19:1763–72.
- Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PHd, Oliveira Filho SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007; 7(2):187-94.
- Moy FM, Bulgiba A. High prevalence of vitamin D insufficiency and its association with obesity and metabolic syndrome among Malay adults in Kuala Lumpur, Malaysia. *BMC Public Health.* 2011; 11:735.
- Mozaffari MS, Abdelsayed R, Zakhary I, El-Salanty M, Liu JY, Wimborne H, El-Marakby A. Submandibular gland and caries susceptibility in the obese Zucker rat. *J Oral Pathol Med.* 2011; 2;40(2):194-200.
- Must A, Dallal GE, Dietz WH. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht<sup>2</sup>) and triceps skinfold thickness. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:839-46.
- Nauntofte B, Bardow A, Hofer E, Nyvad B, Ten Cate JM. Effect of saliva composition on experimental root caries. *Caries Res.* 2005; V.39,n.1,71-77.
- Navazesh M, Brightman VJ, Pogoda JM. Relationship of medical status, medications, and salivary flow rates in adults of different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 81(2):172-6.

- Nazmi A, Oliveira IO, Victora, CG. Correlates of C-reactive protein levels in Young adults: a population-based cohort study of 3827 subjects in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2008; 41, 357–367.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-Risc). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128-9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017; Dec16;390(10113):2627-2642.
- Nicolau J. Fundamentos de bioquímica oral. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
- Nigro E, Piombino P, Scudiero O, Monaco ML, Schettino P, Chambery A, Daniele A. Evaluation of salivary adiponectin profile in obese patients. *Peptides*. 2015; 63:150-5.
- Nunes LA, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. *Clin Biochem*. 2011; 44(17-18):1440-4.
- Ohtani K, Miyabara K, Okamoto E, Kamei M., Matsui-Yuasa I. Cytotoxicity of 7-ketocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996; 60(12):1989-1993.
- Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, Guadagnini D, Carvalheira JB and Saad MJ. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* 2011; 784-796, 2011. 93.
- Oliveira EP. Associações das concentrações séricas de ácido úrico com as variáveis dietéticas, antropométricas e bioquímicas de adultos clinicamente selecionados para programa de mudança de estilo de vida / Erick Prado de Oliveira. – Botucatu, 2010.
- Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Gröhn S, Keinänen S, Sulkava R. Salivary flow and composition in elderly patients referred to an acute care geriatric ward. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 84(3):265-71.
- Palacios C, Joshipura K, Willett W. Nutrition and health: guidelines for dental practitioners. *Oral Dis*. 2009; 15:369–81.
- Pannunzio E, Amancio OM, Vitalle MS, Souza DN, Mendes FM, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56: 32-36.
- Pedroni-Pereira A, Araujo DS, Scudine KGO, Prado DGA, Lima DANL, Castelo PM. Chewing in adolescents with overweight and obesity: An exploratory study with behavioral approach. *Appetite*. 2016 Dec 1;107:527-533.

- Pendyala G, Thomas B, Joshi SR. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Type 2 Diabetic Patients with and without Periodontal Disease: A Case-Control Study. *N Am J Med Sci* 2013; 5:51-57.
- Peng S, Hu B, Morin, RJ. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J Clin Labor Anal.* 1991; 5:144-152.
- Pereira A, Guedes A, Verreschi ITN, Santos RD, Martinez TLR. Obesity and Its Association with Other Cardiovascular Risk Factors in School Children in Itapetinga, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2009; v.93, n.3, p.253-260.
- Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA, Santos DB. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2015; 16(4):341-9.
- Pietrobelli A, Faith MSM, Allinson DB, Gallagher D, Chiumello G, Heymsfield SB. Body mass index as a measure of adiposity among children and adolescents: a validation study. *J Pediatr.* 1998; 132:204-10.
- Pinheiro ARO, Freitas SFT, Corso ACT. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Rev Nutr.* 2004; 17(4):523-533.
- Pink C, Kocher T, Meisel P, Dörr M, Markus MR, Jablonowski L, Grotevendt A, Nauck M, Holtfreter B. Longitudinal effects of systemic inflammation markers on periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2015; 11;42(11):988-97.
- Pischon N, Heng N, Bernimoulin, JP, Kleber, BM, Willich, SN, Pischon T. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *Journal of Dental Research* 2007; 86, 400–409.
- Pitchika V, Thiering E, Metz I, Rothmaier K, Willenberg A, Hickel R, Standl M, Kocher T, Heinrich J, Kühnisch J. Gingivitis and lifestyle influences on high-sensitivity C-reactive protein and interleukin 6 in adolescents. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(4):372-381.
- Powers HP. Salivation patterns of obese and normal subjects. *Int J Obes* 1982; 6:267–270.
- Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Exp Biol Med* 2016; 241(8):783-99.
- Ramírez-Vélez R, Correa-Bautista JE, Sanders-Tordecilla A, Ojeda-Pardo ML, Cobo-Mejía EA, Castellanos-Vega RDP, García-Hermoso A, González-Jiménez E8, Schmidt-RioValle J, González-Ruíz K. Percentage of Body Fat and Fat Mass Index as a Screening Tool for Metabolic Syndrome Prediction in Colombian University Students. *Nutrients.* 2017; 13;9(9):E1009.

- Reeves AF, Rees JM, Schiff M., Hujoel P. Total body weight and waist circumference associated with chronic periodontitis among adolescents in the United States. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 2006; 160, 894–899.
- Reilly JJ, Dorosty AR, Emmett PM. Identification of the obese child: adequacy of the body mass index for clinical practice and epidemiology. *Int J Obes.* 2000; 24:1623-7.
- Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Relacionamento da adiposidade total e abdominal com CRP e IL-6 em mulheres. *Annals of Epidemiology* 2003; 13,674-682.
- Riis JL, Out D, Dorn LD, Beal SJ, Denson LA, Pabst S, Jaedicke K, Granger DA. Salivary cytokines in healthy adolescent girls: Intercorrelations, stability, and associations with serum cytokines, age, and pubertal stage. *Dev Psychobiol* 2014; 56: 797-811.
- Sadiya A, Ahmed SM, Skaria S, Abusnana S. Vitamin D status and its relationship with metabolic markers in persons with obesity and type 2 diabetes in the UAE: a cross-sectional study. *J Diabetes Res.* 2014; 2014:869307.
- Saito T, Shimazaki, Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontology* 2007; 43,254–26.
- Salazar N, Dewulf EM, Neyrinck AM, Bindels LB, Cani PD, Mahillon J, de Vos WM, Thissen JP, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clin Nutr.* 2015; 34(3):501-7.
- Santacruz A, Marcos A, Warnberg J et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(10), 1906–1915.
- Saxlin T, Ylostalo P, Suominen-Taipale L, Aromaa A, Knuuttila, M. Overweight and obesity weakly predict the development of periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology* 2010; 37, 1059–1067.
- Saxlin T, Ylostalo P, Suominen-Taipale, L, Mannisto S. & Knuuttila, M. Association between periodontal infection and obesity: results of the Health 2000 Survey. *Journal of Clinical Periodontology* 2011; 38, 236–242.
- Schaefer F, Georgi M, Zieger A, Scharer K. Usefulness of bioelectric impedance and skinfold measurements in predicting fat-free mass derived from total body potassium in children. *Pediatr Res.* 1994; 35:617-24.

- Shah S, Wilson DM, Bachrach LK. Large Doses of Vitamin D Fail to Increase 25-Hydroxyvitamin D Levels or to Alter Cardiovascular Risk Factors in Obese Adolescents: A Pilot Study. *J Adolesc Health*. 2015; 57(1):19-23.
- Shantavasinkul PC, Phanachet P, Puchaiwattananon O, Chailurkit LO, Lapananon T, Chanprasertyontin S, Ongphiphadhanakul B, Warodomwicht D. Vitamin D status is a determinant of skeletal muscle mass in obesity according to body fat percentage. *Nutrition*. 2015; 31(6):801-6.
- Shillitoe E, Weinstock R, Kim T, Simon H, Planer J, Noonan S, Cooney R. The oral microflora in obesity and type-2 diabetes. *J Oral Microbiol*. 2012; 4.
- Silva HA, Carraro JCC, Bressan J, Hermsdorff HHM. Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. *Einstein*. 2015; 13(2):202-8.
- Singh S, Ramesh V, Oza N, Balamurali PD, Prashad KV, Balakrishnan P. Evaluation of serum and salivary lipid profile: A correlative study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014; 18(1):4-8.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol*. 2005; 38:135-87.
- Soukup M, Biesiada I, Henderson A, Idowu B, Rodeback D, Ridpath L, Bridges EG, Nazar AM, Bridges KG. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2012; 4(1):14.
- Speirs RL. The blood sugar level and phosphate concentrations in plasma and saliva in rats fed diets with different carbohydrate and protein contents. *Arch Oral Biol* 1966; 11:717-27.
- Sreebny LM, Banoczy J, Baum BJ. Saliva: its role in health and disease. *Int Dent J*. 1992; 42: 287–304.
- Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int. Dent. J*. 2000; June v.50n3p.140-161.
- Subramaniam P, Sharma A, Kaje K. Association of salivary triglycerides and cholesterol with dental caries in children with type 1 diabetes mellitus. *Spec Care Dentist*. 2015; 35(3):120-2.
- Surdacka A, Ciężka E, Pioruńska-Stolzmann M, Wender-Ożegowska E, Korybalska K, Kawka E, Kaczmarek E, Witowski J. Relation of salivary antioxidant status and cytokine levels to clinical parameters of oral health in pregnant women with diabetes. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 428-436.
- Suvan J, D'Aiuto F, Moles DR, Petrie A, Donos N. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev* 2011; 12(5):e381–404.

- Taani DQ, Alhaija ES. Self-assessed bleeding as an indicator of gingival health among 12-14-year-old children. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(1):78-81.
- Tantiwong P, Shanmugasundaram K, Monroy A, Ghosh S, Li M, DeFronzo RA, Cersosimo E, Sriwijitkamol A, Mohan S and Musi N. NF- $\kappa$ B activity in muscle from obese and type 2 diabetic subjects under basal and exercise-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299: E794-801
- Taylor, A. M., Peeters, P. H., Norat, T., Vineis, P., & Romaguera, D. An update on the prevalence of the metabolic syndrome in children and adolescents. *International Journal of Pediatric Obesity* 2010; 5,202–213.
- Taylor RW, Jones IE, Willians SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference waist-to-hip and the conicity index as screening tool for high trunk fat mass as measured by dual-energy x-ray absorptiometry in children aged 3-19y. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:490-5.
- Taylor WR, Jones IE, Willians SM, Goulding A. Body fat percentages measured by dual energy xray absorptiometry corresponding to recently recommended body mass index cutoffs for overweight and obesity in children and adolescents aged 3-18y. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:1416-21.
- Tong HJ, Rudolf MC, Muyombwe T, Duggal MS, Balmer R. An investigation into the dental health of children with obesity: an analysis of dental erosion and caries status. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014; 15(3):203-10.
- Tremblay M, Brisson D, Gaudet D. Association between salivary ph, and metabolic syndrome in women: a cross-sectional study. *BMC Oral health.* 2012; 12:40.
- Tsouli SG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Athyros VG, Elisaf MS. Elevated serum uric acid levels in metabolic syndrome: an active component or an innocent bystander? *Metabolism.* 2006; 55(10):1293-301.
- Tsunoda S, Kamide K, Minami J, Kawano Y. Decreases in serum uric acid by amelioration of insulin resistance in overweight hypertensive patients: effect of a low-energy diet and an insulin-sensitizing agent. *Am J Hypertens* 2002; 15:697-701.
- Vågstrand KE, Birkhed D. Cariogenic bacteria as biomarkers for sugar intake. *Nutr Rev.* 2007; 65(3):111-21.
- Veiga GV, Dias PC, Anjos LA. A comparison of distribution curves of body mass index from Brazil and United States for assessing overweight and obesity in Brazilian adolescents. *Rev Panam Salud Pública* 2001; 10:79-85.
- Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de

- risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017; 160p.: il. ISBN 978-85-334-2479-1
- Visser M, Bouter LM, Mcquillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Journal of the American Medical Association* 1999; 282, 2131–2135.
- Wang L, Wang H, Wen H, Tao H, Zhao X. Relationship between HOMA-IR and sérum vitamin D in Chinese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016; 1;29(7):777-81.
- Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick RK. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nurs Res Pract* 2012; 246178.
- Winning L, Linden GJ. Periodontitis and Systemic Disease: Association or Causality? *Curr Oral Health Rep.* 2017; 4(1):1-7.
- Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(3):313-21.
- Wood N, Johnson, RB, Streckfus, C F. Comparison of body composition and periodontal disease using nutritional assessment techniques: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30,321-327.
- World Health Organization. Growth reference data for 5-19 years, 2007. (<http://www.who.int/growthref/en/>).
- World Health Organization. Oral health surveys. Basic methods. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1997.
- World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995. (WHO Technical Report Series, 854).
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:690-693.
- Wu Y, Nielsen DH, Cassady SL, Cook JS, Janz KF, Hansen JR. Cross-validation of bioelectrical impedance analysis of body composition in children and adolescents. *Phys Ther.* 1993; 73:320-7.
- Xu Y, Xu K, Bai J, Liu Y, Yu R, Liu C, Shen C, Wu X. Elevation of serum uric acid and incidence of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 2016; 81,91.

- Yamashita JM. Estudo transversal sobre problemas bucais em pacientes obesos mórbidos [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.
- Yeo WZ, Lim SP, Say YH. Salivary cariogenic bacteria counts are associated with obesity in student women at a Malaysian university. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2018; 27(1):99-106.
- Yin YN, Yu QF, Fu N, Liu XW, Lu FG. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol*. 2010; 21;16(27):3394-401.
- Ylöstalo P, Suominen-Taipale L, Reunanen A, Knuuttila M. Association between body weight and periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35, 297–304.
- Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(4):781-91.
- Zhao, J., & Huang, Y. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker for monitoring the efficacy of urate-lowering therapy in a patient with chronic gouty arthropathy. *Clinica Chimica Acta*, 2015; 450, 115–120.
- Zeigler CC, Persson GR, Wondimu B, Marcus C, Sobko T, Modéer T. Microbiota in the oral subgingival biofilm is associated with obesity in adolescence. *Obesity*, 2012; 20:157-164.
- Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr J*. 2010; 9:65.

## ANEXO



**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 "**Avaliação da composição salivar e da qualidade da função mastigatória de adolescentes com sobrepeso e obesidade**", protocolo nº 152/2014, dos pesquisadores Paula Midori Castelo Ferruá, Aline Pedroni Pereira, Darlle Santos Araujo, Kelly Guedes de Oliveira Scudine e Taís de Souza Barbosa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 27/02/2015.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "**Evaluation of salivary composition and mastigatory function in overweight and obese adolescents**", register number 152/2014, of Paula Midori Castelo Ferruá, Aline Pedroni Pereira, Darlle Santos Araujo, Kelly Guedes de Oliveira Scudine and Taís de Souza Barbosa, 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 Feb 27, 2015.

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP