



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
INTEGRADA COM ÊNFASE EM PERIODONTIA**

CARLOS ANTONIO SCHÄFFER PENTEADO

**PROTEÍNAS SALIVARES CANDIDATAS A
BIOMARCADORES PARA ALTERAÇÕES BUCAIS EM
USUÁRIOS DE ÁLCOOL E TABACO**

Curitiba

2019

CARLOS ANTONIO SCHÄFFER PENTEADO

**PROTEÍNAS SALIVARES CANDIDATAS A
BIOMARCADORES PARA ALTERAÇÕES BUCAIS EM
USUÁRIOS DE ÁLCOOL E TABACO**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Odontologia, Área
de Concentração em Clínica Odontológica
Integrada com ênfase em Periodontia.**

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Reis
Azevedo Alanis.**

**Curitiba
2019**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

P419p
2019 Penteado, Carlos Antonio Schäffer
 Proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais em
usuários de álcool e tabaco / Carlos Antonio Schäffer Penteado ; orientador:
Luciana Reis Azevedo Alanis. – 2019.
 37 f. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2019

 Inclui bibliografias

 1. Odontologia. 2. Proteínas e peptídeos salivares. 3. Biomarcadores.
4. Proteômica. 5. Alcoolismo. 6. Tabagismo. I. Alanis, Luciana Reis Azevedo.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

CARLOS ANTONIO SCHAFER PENTEADO

PROTEÍNAS SALIVARES CANDIDATAS A BIOMARCADORES PARA ALTERAÇÕES BUCAIS EM USUÁRIOS DE ÁLCOOL E TABACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Clínica Odontológica Integrada com Ênfase em Periodontia**.

Orientador(a):


Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Maria Angela Naval machado
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 25 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná e seu corpo docente que desde a graduação me oportunizaram o aprendizado e crescimento profissional e pessoal.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Luciana Reis Azevedo Alanis, por todo o suporte, pelas suas correções e incentivos.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, principalmente ao Thiago Beltrami Dias Batista e ao Cassiano Lima Chaiben.

Ao Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA), toda a equipe e especialmente ao ex-diretor André Luiz Betin de Lacerda, que abriu as portas para a nossa pesquisa.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em especial à professora Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Talita Mendes Oliveira Ventura e Aline Dionizio.

Aos professores da banca de qualificação Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e Paulo Henrique Couto Souza.

Aos professores da disciplina de Periodontia, em especial ao professor Vinicius Augusto Tramontina.

À minha família, pelo amor, incentivo e esforço para possibilitarem meus estudos.

À minha companheira Gabriella Gaspar Pellegrini, que está diariamente ao meu lado, me apoiando e incentivando em cada passo.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

ARTIGO	1
Proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais em usuários de álcool e tabaco.....	1
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	4
Resultados	7
Discussão	12
Conclusões.....	15
Referências.....	16
ANEXOS	28
Parecer de comitê de ética.....	28
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido	32
Normas para publicação – Journal of Applied Oral Science.....	33

ARTIGO

Proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais em usuários de álcool e tabaco.

Resumo

Introdução: O consumo de álcool é comumente associado ao uso de tabaco. As duas drogas agem em sinergismo causando alterações no meio bucal. A identificação de biomarcadores salivares no rastreio de lesões bucais pode ajudar na prevenção de doenças em usuários de álcool e tabaco. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo avaliar a condição bucal de usuários de álcool e tabaco, e identificar proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais. **Materiais e métodos:** Foram avaliados 33 voluntários homens internados para reabilitação por abuso de álcool, entre os quais, nove foram selecionados para análise proteômica. Foi realizado exame odontológico, com avaliação dos índices gengival, de placa e CPO-D, e coleta de saliva não estimulada. A análise dos peptídeos trípticos foi conduzida por meio de espectrômetro de massas. Uma lista de proteínas identificadas nas amostras salivares foi gerada a partir de banco de dados e revisada manualmente, obtendo-se o número total de proteínas candidatas a biomarcadores para alterações bucais. **Resultados:** A média de idade da amostra (n=33) foi $42,94 \pm 8,61$ anos, com CPO-D médio de $22,24 \pm 8,28$. 31 (93%) voluntários apresentaram placa bacteriana e inflamação gengival. Foram encontradas 282 proteínas na saliva nos voluntários (n=9), das quais 26 foram identificadas como candidatas a biomarcadores para alterações bucais. Após revisão manual, 21 proteínas foram selecionadas. As alterações bucais com o maior número de proteínas candidatas a biomarcadores foram “Carcinoma of head and neck” (n=10), “Nasopharyngeal carcinoma” (n=6) e “Periodontal disease” (n=6). **Conclusão:** A condição bucal de usuários de álcool e tabaco mostrou-se insatisfatória. Foram identificadas 282 proteínas na saliva, das quais 21 se mostraram candidatas a biomarcadores para alterações bucais. As duas principais doenças em número de proteínas salivares candidatas a biomarcadores foram câncer de cabeça e pescoço e doença periodontal.

Palavras-chave: Proteínas e Peptídeos Salivares; Proteômica; Biomarcadores; Alcoolismo; Tabagismo.

Introdução

O álcool é uma substância psicoativa consumida por cerca de 2,3 bilhões de pessoas no mundo, e está associado com mais de 200 doenças (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são estimadas três milhões de mortes por ano no mundo causadas pelo uso crônico do álcool (1). O consumo de álcool está aumentando a nível mundial e é comumente associado ao uso de tabaco; as duas drogas lícitas agem em sinergismo causando alterações no meio bucal, aumentando o risco para o desenvolvimento de câncer de boca e outras afecções (1,2).

Usuários crônicos de álcool e tabaco tem alta prevalência de cárie, gengivite, periodontite, lesões na mucosa bucal e halitose (3–7), o que é agravado pela diminuição do fluxo salivar (7,8). A saliva contém mais de 2000 proteínas e peptídeos, que participam de vários processos, como digestão, formação da película adquirida do esmalte, lubrificação local e regulação do sistema imune (9,10). Algumas proteínas presentes na saliva podem sofrer alterações de concentração na presença de doenças e estar intimamente relacionadas com o estado de saúde de um indivíduo, possibilitando serem utilizadas como biomarcadores (10). Proteínas biomarcadoras são moléculas usadas para detectar ou confirmar a presença de uma doença ou condição de interesse, ou até mesmo monitorar a evolução de uma doença ou tratamento (11).

Proteínas geralmente encontradas no sangue podem estar presentes na saliva, que pode ser coletada mais facilmente e sem procedimentos invasivos (10). Novos métodos de identificação de proteínas, como espectrometria de massas, aliados a protocolos refinados de extração e processamento de saliva, facilitam a identificação e quantificação de biomarcadores, tornando a saliva uma substância promissora na identificação precoce de doenças (10).

A identificação de biomarcadores salivares no rastreio de lesões bucais pode ajudar na prevenção de doenças e promoção da saúde bucal em usuários de álcool e tabaco. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a condição bucal de usuários de álcool e tabaco, e identificar proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais.

Material e Métodos

Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (parecer número 1.825.659).

Amostra

Foram recrutados indivíduos internados na Associação de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo, localizada na cidade de Campo Largo (sul do Brasil) para reabilitação pelo uso de drogas. No estudo, foram incluídos homens, maiores de 18 anos, internados para reabilitação por abuso de álcool, com um período de abstinência de, no máximo, 15 dias. Foram excluídos do estudo os participantes que fizeram uso de drogas ilícitas, portadores de doenças sistêmicas, que estivessem fazendo uso de antibióticos ou anti-inflamatórios, ou que apresentaram sintomas clínicos de infecções agudas. Todos os participantes foram informados sobre as disposições da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente ao início da coleta de dados e exame físico. Todos os participantes faziam uso pesado de tabaco. Entre os 33 voluntários avaliados, nove foram selecionados para a análise proteômica (10).

Coleta de dados

Inicialmente, foi realizada entrevista em sala fechada para garantir a privacidade do participante, onde foram coletados dados socioeconômicos, perfil de uso de drogas, condição atual de saúde, uso de medicamentos, padrão de higienização bucal (frequência de escovação dentária e uso do fio dental). Após entrevista, os participantes foram conduzidos até uma maca clínica para realização do exame físico, com luz natural e artificial juntamente com a iluminação da lanterna de cabeça do pesquisador, como recomendado pela OMS (12). Foi realizado exame físico extrabucal, com palpação de linfonodos e de glândulas salivares. O exame da mucosa bucal foi realizado por meio da inspeção e palpação com a utilização de espelhos clínicos planos e gaze. Foi registrada qualquer alteração de mucosa bucal presente na data do exame e sua localização seguindo orientações da OMS para levantamentos epidemiológicos (12). Foram avaliados

índices CPO-D, gengival (IG) e de placa (IP). Para IG e IP, foram utilizados os critérios de diagnóstico propostos por Løe & Silness (1963) e Silness & Løe (1964), respectivamente (13,14). Para análise de dados, a maior frequência dos graus do IG e IP por dente foi considerada por indivíduo. IG e IP foram dicotomizados em ausência (Grau 0) e presença (Grau 1, 2 e 3)

Coleta da saliva

A coleta da saliva foi realizada sempre no período da manhã, entre 09:00 e 11:00 horas (15). Os participantes foram orientados a realizar a higienização bucal e permanecer por 45 minutos sem ingerir nenhum tipo de alimento, líquido ou fumar. Após esse tempo, todos realizaram enxágue bucal com 20 mL de água destilada e permaneceram 15 minutos em repouso. A saliva foi coletada de forma não estimulada, por 5 minutos, em tubos Falcon (50 mL) estéreis, imersos em gelo (15). Os componentes insolúveis da saliva foram separados por centrifugação $3000 \times g$ por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado em tubo criogênico e armazenado em -80°C até o processamento das amostras para análise proteômica (10,15,16).

Análise proteômica

Foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada amostra para proceder com a extração das proteínas. As amostras foram diluídas 1:1 com a solução de extração, contendo 6M ureia, 2M tioureia e 50nM ambic (bicarbonato de amônio), agitadas a 4°C por 10 minutos, depois colocadas em cubas de ultrassom a 4°C por 5 minutos a 1600 W e centrifugadas a $14.000 \times g$, a 4°C por 10 minutos. Após a extração, três pools de amostras foram formados. Cada pool foi composto por três amostras, escolhidas pela ordem de coleta (10).

Para desnaturação das proteínas e redução das pontes dissulfeto, foi utilizado 5mM de dithiothreitol (DTT) em banho a seco e posteriormente acrescentado 10 mM de iodoacetamida para evitar que resíduos de cisteínas formassem novas ligações dissulfeto. As cadeias peptídicas foram clivadas adicionando 10 µL de tripsina e deixando agir por 14 horas a 37°C, inibida pela adição do mesmo volume de solução bloqueadora (ácido fórmico 5%). As amostras foram purificadas em colunas C18 spin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), e

armazenadas a -20°C. Não foram utilizadas colunas depletoras de IgG no protocolo escolhido (10).

A análise dos peptídeos trípticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo Acquity UPLC HSS T3 column 75 µm x 150 mm; 1,8 µm (Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% acetonitrila + 0,1% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 70 minutos com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O espectrômetro de massas foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 75 minutos. Os dados foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.03 (Waters). A identificação das proteínas ocorreu por meio do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software (10).

Classificação das proteínas

O resultado gerado pelo espectrômetro de massas foi comparado com o banco de dados da espécie *Homo sapiens* do catálogo do UniProt para gerar a lista das proteínas encontradas nas amostras (Universal Protein Resource) em agosto de 2017 (<http://www.uniprot.org>). Foi realizada revisão manual da lista de proteínas, com remoção de proteínas repetidas, fragmentadas e reversas (17). Após a revisão da lista de proteínas, foram identificados os genes de origem de cada proteína. A lista dos genes foi utilizada para realizar a busca de proteínas candidatas a biomarcadores na ferramenta IBI-IMIM (Database of disease-related biomarkers) (17,18). Esta ferramenta de busca realiza a mineração dos dados, cruzando o nome do gene e/ou proteína com a alteração associada, em títulos e resumos de artigos indexados à plataforma Medline. A ferramenta traz informações sobre as proteínas pesquisadas como biomarcadores, as alterações com as quais elas estão potencialmente associadas, e a referência dos artigos que investigaram estas possíveis associações.

Todos os artigos listados na ferramenta de buscas foram revisados manualmente por um único pesquisador a fim de confirmar se cada artigo

efetivamente investigou a associação entre biomarcador e alteração bucal citada. Foram excluídos os artigos em que a proteína buscada não era relatada, a doença não era relatada, ou ambos, proteína e doença, não estavam relatados nos artigos, a fim de gerar uma lista final de proteínas e alterações bucais possivelmente associadas.

Resultados

Foram avaliados 33 homens usuários de álcool com média de idade de $42,94 \pm 8,61$ anos (25 – 51). Dos 33 participantes, 31 (93%) tinham presença de placa bacteriana e inflamação gengival. As alterações bucais observadas estão relatadas na tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de alterações bucais e valor médio do CPOD na amostra estudada (n=33).

Alterações bucais	N (%)
Queilite actínica	10 (30)
Leucoedema	6 (18)
Melanose do fumante	2 (6)
Candidose crônica hiperplásica	2 (6)
Queilite angular	2 (6)
Ceratose reacional	1 (3)
Média $\pm$ DP	
CPOD	$22,24 \pm 8,28$

Entre os participantes da análise proteômica (n=9), a média de idade foi $36,89 \pm 7,72$ anos, e o tempo médio de uso de álcool foi de $14,89 \pm 9,25$ anos. Todos os participantes eram tabagistas com consumo maior que 20 cigarros por dia. O tempo médio de uso de tabaco foi de $18,89 \pm 8,54$ anos.

Na análise proteômica, foram encontradas 282 proteínas presentes na saliva, das quais 58 foram identificadas como candidatas a biomarcadores, sendo 26 candidatas a biomarcadores para alterações bucais. Após revisão manual, 21

proteínas candidatas a biomarcadores para alterações bucais foram selecionadas, e 18 alterações bucais foram identificadas (tabela 2).

Tabela 2. Alterações bucais, códigos das proteínas (acession number), artigos que foram listados na ferramenta de busca IBI-IMIM (Database of disease-related biomarkers), e inclusão ou não dos artigos conforme os critérios de revisão manual.

Alteração bucal	Acession number	Artigos	Inclusão
Carcinoma of head and neck	Q5SYQ8	Sterz et al. 2010 (19)	Sim
		Bhaijee et al. 2012 (20)	Sim
		Bourguignon et al. 2012 (21)	Sim
		Chen et al. 2009 (22)	Sim
		Chen et al. 2010 (A) (23)	Sim
		Xu et al. 2012 (24)	Sim
		Lo et al. 2011 (25)	Sim
		Chen et al. 2010 (B) (26)	Sim
	O43490	Cameron et al. 2010 (27)	Sim
		Damek-Poprawa et al. 2011 (28)	Sim
		Krishnamurthy et al. 2012 (29)	Sim
		Hollemann et al. 2011 (30)	Sim
		Chen et al. 2011 (31)	Sim
		Zhang et al. 2012 (32)	Sim
	F5GWH7	Farhadieh et al. 2009 (33)	Sim
		Vlatkovic et al. 2011 (34)	Sim
		Jin et al. 2013 (35)	Sim
	A6NNI4	Erovic et al. 2003 (36)	Sim
		Mhaweche et al. 2004 (37)	Sim
	P13646	Lallemant et al. 2009 (38)	Sim
		Cortesina et al. 2000 (39)	Sim
	P23528	Dowling et al. 2008 (40)	Sim
	P18887	Mahjabeen et al. 2012 (41)	Sim
	P19013	Lallemant et al. 2009 (38)	Sim
	P01034	Strojan et al. 2004 (42)	Sim
	P04083	Pedrero et al. 2004 (43)	Sim
Nasopharyngeal carcinoma	Q5SYQ8	Wu et al. 2013 (44)	Sim
		Luo et al. 2012 (A) (45)	Sim
		Luo et al. 2012 (B) (46)	Sim
	P01833	Hirunsatit et al. 2003 (47)	Sim
		Lin et al. 1997 (48)	Sim
	P02768	Liao et al. 2008 (49)	Não
	P61626	Zhong et al. 1993 (50)	Sim

	P04083	Cheng et al. 2008 (51)	Sim
	F5GWH7	Zhang et al. 2012 (52)	Sim
	P18887	Alsbeih et al. 2010 (53)	Não
	P06733	Liu et al. 2012 (54)	Sim
Periodontal disease	P02768	Hirasaki et al. 2005 (55) Gonçalves et al. 2010 (56)	Sim Sim
	O43490	Lucarini et al. 2009 (57)	Sim
	P01034	Sharma et al. 2012 (58)	Sim
	P61626	Eley et al. 1998 (59)	Sim
	A6NNI4	Bisson-Boutelliez et al. 2001 (60)	Sim
	P05109	Kojima et al. 2000 (61)	Sim
Hereditary gingival fibromatosis	Q12802	Bonuccelli et al. 2009 (62)	Não
	P06733	Schlötzer-Schrehardt et al. 2005 (63)	Não
	P68871	Zhu et al. 2007 (64)	Sim
	P69892	Zhu et al. 2007 (64)	Sim
	P02768	Mizuguchi et al. 2012 (65)	Não
	P02042	Zhu et al. 2007 (64)	Sim
Rhabdomyosarcoma, alveolar	P06400	Ohata et al. 2006 (66) Hongeng et al. 2003 (67)	Não Não
	P01034	Mocroft et al. 2009 (68) Martin et al. 2010 (69)	Não Não
	F5GWH7	Kraus et al. 2002 (70) Felsberg et al. 2009 (71)	Não Não
	E9PC22	Rizos et al. 1998 (72) Grimmond et al. 1996 (73)	Não Não
	P02768	Camoirano et al. 2001 (74)	Não
Periodontitis	O43490	Lucarini et al. 2009 (57)	Sim
	P01034	Sharma et al. 2012 (58)	Sim
	P02768	Ebersole et al. 2013 (75)	Sim
	P04746	Gonçalves et al. 2010 (56)	Sim
	O43490	Panchision et al. 2007 (76)	Não

Pleomorphic adenoma of salivary gland		Guzmán-Ramírez et al. 2009 (77) Litvinov et al. 2006 (78) Kam et al. 2009 (79) Miki et al. 2007 (80)	Não Não Não Não
	P02768	Sasaki et al. 2011 (81) Wu et al. 1998 (82)	Não Não
	P05109	Madland et al. 2007 (83)	Não
	P55786	Larrinaga et al. 2005 (84)	Não
Leukoplakia	P13646	Schaaij-Visser et al. 2010 (85) Gires et al. 2006 (86) Xu et al. 1995 (87)	Sim Sim Sim
	P02768	Nayyar et al. 2012 (A) (88) Nayyar et al. 2012 (B) (89)	Sim Sim
	P19013	Schaaij-Visser et al. 2010 (85)	Sim
Ameloblastoma	P06400	Deyrup et al. 2007 (90) Swanson et al. 1997 (91)	Não Não
	F5GWH7	Krishna et al. 2012 (92)	Sim
	P13646	Kishino et al. 2007 (93)	Não
Oral submucosal fibrosis	P16035	Pitiyage et al. 2012 (94)	Sim
	P13646	Lalli et al. 2008 (95)	Sim
Leucoplakia of oral mucosa	P13646	Schaaij-Visser et al. 2010 (85) Xu et al. 1995 (87)	Sim Sim
	P19013	Schaaij-Visser et al. 2010 (85)	Sim
Dental caries	P61626	Tsukitani et al. 1985 (96)	Não
Squamous cell carcinoma of tongue	P13646	Yanagawa et al. 2007 (97)	Sim
Gingivitis	P01034	Sharma et al. 2012 (58)	Sim
Acquired absence of teeth	P01034	Yoshihara et al. 2011 (98)	Sim
Tooth disorder	P02768	Forsman et al. 1994 (99)	Sim
Candidiasis of mouth	P31025	Oudenhoven et al. 2011 (100)	Não
Tongue carcinoma	P06400	Gromova et al. 2012 (101)	Não
Temporomandibular joint-pain-	P06400	Kuboki et al. 1999 (102)	Não

dysfunction syndrome			
Neoplasm of head and neck	O43490	Brunner et al. 2008 (103) Damek-Poprawa et al. 2011 (28)	Sim Sim
Squamous cell carcinoma of mouth	A6NNI4	Kusukawa et al. 2001 (104)	Sim
Malignant tumor of tongue	P05161	Chi et al. 2009 (105)	Sim
Malignant tumor of head and neck	P13646	Xu et al. 1995 (87)	Sim
Malignant tumor of oral cavity	P13646	Hamakawa et al. 1998 (106)	Sim

As alterações bucais mais frequentes encontradas na busca foram: 10 candidatos a biomarcadores para “Carcinoma of head and neck”, seis biomarcadores para “Nasopharyngeal carcinoma” e seis biomarcadores para “Periodontal disease” (tabela 3).

Tabela 3. Alterações bucais, código das proteínas (acession number) e número de proteínas candidatas a biomarcadores após revisão manual.

Alteração bucal	Accession number	n
Carcinoma of head and neck	O43490; F5GWH7; P18887; Q5SYQ8; P04083; P23528; A6NNI4; P19013; P01034; P13646	10
Nasopharyngeal carcinoma	F5GWH7; P06733; Q5SYQ8; P04083; P61626; P01833	6
Periodontal disease	O43490; P05109; A6NNI4; P61626; P02768; P01034	6
Periodontitis	O43490; P04746; P02768; P01034	4
Hereditary gingival fibromatosis	P69892; P68871; P02042	3
Leukoplakia	P19013; P02768; P13646	3
Oral submucosal fibrosis	P16035; P13646	2
Leucoplakia of oral mucosa	P19013; P13646	2
Ameloblastoma	F5GWH7	1
Squamous cell carcinoma of tongue	P13646	1
Gingivitis	P01034	1
Acquired absence of teeth	P01034	1
Tooth disorder	P02768	1
Neoplasm of head and neck	O43490	1

Squamous cell carcinoma of mouth	A6NNI4	1
Malignant tumor of tongue	P05161	1
Malignant tumor of head and neck	P13646	1
Malignant tumor of oral cavity	P13646	1

Discussão

Dentro do contexto de que álcool e tabaco são drogas lícitas prejudiciais à saúde bucal e amplamente consumidas no mundo todo e de que a identificação de biomarcadores tem papel promissor no rastreio de alterações locais e sistêmicas, propusemo-nos a avaliar a condição bucal de usuários de álcool e tabaco e identificar proteínas salivares candidatas a biomarcadores para alterações bucais. Foram identificadas 282 proteínas salivares e 21 proteínas candidatas a biomarcadores para alterações bucais em usuários de álcool e tabaco. As alterações com maior número de biomarcadores foram “Carcinoma of head and neck” (n=10), “Nasopharyngeal carcinoma” (n=6) e “Periodontal disease” (n=6).

No presente estudo, ao agrupar as seguintes doenças “Carcinoma of head and neck”, “Nasopharyngeal carcinoma”, “Squamous cell carcinoma of tongue”, “Neoplasm of head and neck”, “Squamous cell carcinoma of mouth”, “Malignant tumor of tongue”, “Malignant tumor of head and neck”, e “Malignant tumor of oral cavity”, 14 proteínas candidatas a biomarcadores foram identificadas (tabela 3). O câncer de cabeça e pescoço ocupa a sexta posição nas estatísticas de câncer no mundo, com incidência anual de 500.000 novos casos (20). O carcinoma de células escamosas é o câncer mais comum de cabeça e pescoço (cerca de 90% dos casos), e tem como fator de risco o abuso de tabaco, consumo prolongado de álcool e higiene bucal deficiente (20,30). A amostra do presente estudo foi composta por usuários pesados de álcool e tabaco; todos fumavam mais de 20 cigarros por dia, e a média de tempo de uso do álcool foi de 14 anos. Além disso, a higiene bucal dos participantes mostrou-se insatisfatória; 93% da amostra apresentava placa bacteriana e inflamação gengival, com média de CPOD de 22,24.

A aldeído desidrogenase 1 (Q5SYQ8) foi a proteína candidata a biomarcador para câncer de cabeça e pescoço com o maior número de artigos

relacionados (19–26), presente na saliva da amostra estudada. Esta proteína tem a função de metabolizar aldeídos intracelulares e participa do processo de diferenciação de células tronco (23). Logo após a ingestão, o álcool é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase, o que resulta na formação do acetaldeído, uma substância cancerígena (2). Além disso, o acetaldeído está presente no cigarro de tabaco industrializado, e é produzido na boca pela microbiota local (2). Sendo assim, é esperado que na saliva de usuários pesados de álcool e tabaco com higiene bucal insatisfatória, seja encontrada a aldeído desidrogenase 1, como consequência da grande quantidade de acetaldeído. A aldeído desidrogenase 1 também é considerada um marcador para células tronco cancerígenas, que apresentam alta taxa de renovação e estão associadas com invasão tecidual e maior chance de metástase (22). Sabendo que o uso abusivo de álcool e tabaco aumenta o risco para desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, a presença da aldeído desidrogenase 1 na saliva desses usuários pode estar associada também com a presença de células tronco cancerígenas.

Em nosso estudo, “Periodontal disease” foi o segundo termo mais frequente em número de candidatos a biomarcadores, com seis proteínas. Ao se agrupar os termos “Periodontitis” e “Gingivitis”, sete proteínas candidatas a biomarcadores foram identificados. A doença periodontal é caracterizada pela destruição dos tecidos ao redor do dente, e está relacionada com a presença de bactérias e inflamação (3,57). Entre os participantes da amostra, 93% tinham a presença de placa bacteriana e inflamação gengival. A relação do uso do tabaco com a periodontite já é estabelecida, porém os mecanismos de ação permanecem obscuros (4). Acredita-se que o uso crônico de tabaco altera a microbiota subgengival e aumenta a proporção de patógenos periodontais, além de causar atraso no recrutamento de neutrófilos para os tecidos periodontais, diminuindo a resposta imune (4). Além disso, por prejudicar a função de linfócitos T e a quimiotaxia de neutrófilos, o consumo de álcool também compromete a resposta imune (107). O consumo de álcool aumenta o risco para doença periodontal, proporcionalmente à quantidade ingerida (3,5).

Entre as proteínas candidatas a biomarcadores para doença periodontal encontradas na amostra, destaca-se a albumina (P02768). Há um aumento da

expressão dessa proteína na saliva de pacientes portadores de periodontite crônica (56,75), intimamente relacionado com aumento do IG e da perda de inserção clínica periodontal (55). Outra proteína que se destaca é a cistatina C (P01034), uma proteína inibidora da enzima cisteína protease. Há um aumento da expressão dessa proteína no fluido crevicular gengival e no sangue de pacientes com periodontite crônica comparado a pacientes periodontalmente saudáveis (58). Todos os nove participantes selecionados para a análise proteômica tinham a presença de placa bacteriana e inflamação gengival, porém não foi realizado exame periodontal de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica para diagnóstico de periodontite. Sabendo que a saliva contém grande proporção do fluido crevicular gengival das bolsas periodontais de toda a boca (108), o aumento do fluxo do fluido crevicular gengival e atividade proteolítica local decorrente da inflamação gengival podem estar relacionados com a identificação dessas proteínas na saliva da amostra.

Grande parte dos artigos identificados pela ferramenta de busca para câncer de cabeça e pescoço analisaram proteínas candidatas a biomarcadores em biópsias (24,30,34) e as mesmas proteínas candidatas a biomarcadores foram encontradas na saliva. No caso da doença periodontal, muitos artigos identificaram proteínas candidatas a biomarcadores por meio do fluido gengival crevicular (58,60,61), e essas proteínas também foram encontradas na saliva. Sabendo que a saliva contém grande proporção das moléculas do sangue e do fluido gengival crevicular (10,108), a diminuição de custos possibilitará à análise proteômica salivar individual tornar-se uma ferramenta fiel e pouco invasiva no diagnóstico precoce de doenças, melhorando o prognóstico dos tratamentos na área da saúde.

Algumas limitações do estudo estão associadas à amostra estudada. A amostra foi composta por usuários que buscaram reabilitação e não representa toda a população de dependentes de álcool. Reconhecendo que o sexo é um fator importante em estudos com abuso de substâncias, por questões logísticas (a instituição só faz o tratamento de pessoas do sexo masculino) o estudo foi realizado apenas com homens, excluindo a possibilidade de encontrar associações específicas de cada sexo. A ferramenta de busca de biomarcadores IBI-IMIM revelou algumas falhas, mostrando a importância da revisão manual dos artigos

para se atingir o número final correto de proteínas candidatas a biomarcadores para alterações bucais.

Conclusões

A condição bucal de usuários de álcool e tabaco mostrou-se insatisfatória. Foram encontradas 282 proteínas na saliva, das quais 21 candidatas a biomarcadores para alterações bucais. As duas principais doenças bucais em número de proteínas candidatas a biomarcadores foram câncer de cabeça e pescoço e doença periodontal. A saliva revelou-se uma substância promissora na identificação de biomarcadores locais e sistêmicos.

Referências

1. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer*. 2004;111(4):480–3.
3. Wang J, Lv J, Wang W, Jiang X. Alcohol consumption and risk of periodontitis: A meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016;43(7):572–83.
4. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, López R. Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *Am J Prev Med*. 2018;54(6):831–41.
5. Gay IC, Tran DT, Paquette DW. Alcohol intake and periodontitis in adults aged ≥30 years: NHANES 2009–2012. *J Periodontol*. 2018;89(6):625–34.
6. Priyanka K, Sudhir KM, Reddy VCS, Krishna Kumar RVS, Srinivasulu G. Impact of alcohol dependency on oral health – a cross-sectional comparative study. *J Clin Diagnostic Res*. 2017;11(6):ZC43-ZC46.
7. Rad M, Kakoie S, Brojeni FNi, Pourdamghan N. Effect of Long-term Smoking on Whole-mouth Salivary Flow Rate and Oral Health. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2010;4(4):110–4.
8. Scully CBE C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis*. 2003;9(4):165–76.
9. Ventura TM da S, Cassiano L de PS, Souza e Silva CM de, Taira EA, Leite A de L, Rios D, et al. The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches. *Arch Oral Biol*. 2017;79:20–9.
10. Ventura TM da S, Ribeiro NR, Dionizio AS, Sabino IT, Buzalaf MAR. Standardization of a protocol for shotgun proteomic analysis of saliva. *J Appl Oral Sci*. 2018;26(0):1–19.
11. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016-.
12. World Health Organization. Oral Health Surveys. Basic Methods. Geneva: World Health Organization, 1997:93.

13. Loe H, Silness J. Periodontal Disease in pregnancy. I. prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963;21:533–51.
14. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:121–35.
15. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF- κ B-dependent cytokines: TNF- α , IL-1- α , IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol.* 2005;114(3 SPEC. ISS.):278–83.
16. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One.* 2010;5(6).
17. Cho HR, Kim HS, Park JS, Park SC, Kim KP, Wood TD, et al. Construction and characterization of the Korean whole saliva proteome to determine ethnic differences in human saliva proteome. *PLoS One.* 2017;12(7):1–20.
18. Bravo A, Cases M, Queralt-Rosinach N, Sanz F, Furlong LI. A knowledge-driven approach to extract disease-related biomarkers from the literature. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
19. Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Böttcher MC, Bette M, et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol.* 2010;46(2):116–22.
20. Bhaijee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck.* 2012 Jun;34(6):894–9.
21. Bourguignon LYW, Wong G, Earle C, Chen L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem.* 2012;287(39):32800–24.
22. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde

- dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(3):307–13.
23. Chen Y-W, Chen K-H, Huang P-I, Chen Y-C, Chiou G-Y, Lo W-L, et al. Cucurbitacin I Suppressed Stem-Like Property and Enhanced Radiation-Induced Apoptosis in Head and Neck Squamous Carcinoma-Derived CD44+ALDH1+ Cells. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(11):2879–92.
 24. Xu J, Muller S, Nannapaneni S, Pan L, Wang Y, Peng X, et al. Comparison of quantum dot technology with conventional immunohistochemistry in examining aldehyde dehydrogenase 1A1 as a potential biomarker for lymph node metastasis of head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(11):1682–91.
 25. Lo WL, Yu CC, Chiou GY, Chen YW, Huang PI, Chien CS, et al. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol*. 2011;223(4):482–95.
 26. Chen YC, Chang CJ, Hsu HS, Chen YW, Tai LK, Tseng LM, et al. Inhibition of tumorigenicity and enhancement of radiochemosensitivity in head and neck squamous cell cancer-derived ALDH1-positive cells by knockdown of Bmi-1. *Oral Oncol*. 2010;46(3):158–65.
 27. Cameron SR, Dahler AL, Endo-Munoz LB, Jabbar I, Thomas GP, Leo PJ, et al. Tumor-initiating activity and tumor morphology of HNSCC is modulated by interactions between clonal variants within the tumor. *Lab Invest*. 2010;90(11):1594–603.
 28. Damek-Poprawa M, Volgina A, Korostoff J, Sollecito TP, Brose MS, O'Malley BW, et al. Targeted inhibition of CD133+ cells in oral cancer cell lines. *J Dent Res*. 2011;90(5):638–45.
 29. Krishnamurthy S, Nor JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*. 2012 Apr;91(4):334–40.
 30. Hollemann D, Yanagida G, Ruger BM, Neuchrist C, Fischer MB. New vessel formation in peritumoral area of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2012 Jun;34(6):813–20.
 31. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, et al. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition

- of head and neck cancer. PLoS One. 2011;6(11):1–12.
32. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):1–9.
 33. Farhadieh RD, Salardini A, Gordon Rees CG, Russell PJ, Yang JL, Smee R. Protein expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma index tumors correlates with diagnosis of second primary tumors of the upper aero-digestive tract. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(10):2888–94.
 34. Vlatkoviä N, El-Fert A, Devling T, Ray-Sinha A, Gore DM, Rubbi CP, et al. Loss of MTBP expression is associated with reduced survival in a biomarker-defined subset of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2011;117(13):2939–50.
 35. Jin L, Sturgis EM, Zhang Y, Huang Z, Wei P, Guo W, et al. Genetic variants in p53-related genes confer susceptibility to second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1551–7.
 36. Erovic BM, Pammer J, Hollemann D, Woegerbauer M, Geleff S, Fischer MB, et al. Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2003;25(10):848–57.
 37. Mhaweche P, Dulguerov P, Tschanz E, Verdan C, Ares C, Allal AS. Motility-related protein-I (MKP-I/CD9) expression can predict disease-free survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 2004;90(2):471–5.
 38. Lallemand B, Evrard A, Combescure C, Chapuis H, Chambon G, Raynal C, et al. Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse. *BMC Cancer.* 2009;9:370.
 39. Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, et al. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int J Cancer.* 2000;89(3):286–92.
 40. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. Analysis

- of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics*. 2008;71(2):168–75.
41. Mahjabeen I, Chen Z, Zhou X, Kayani MA. Decreased mRNA expression levels of base excision repair (BER) pathway genes is associated with enhanced Ki-67 expression in HNSCC. *Med Oncol*. 2012;29(5):3620–5.
 42. Strojan P, Svetic B, Šmid L, Kos J. Serum cystatin C in patients with head and neck carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1–2):155–61.
 43. Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, et al. Annexin A1 Down-Regulation in Head and Neck Cancer Is Associated with Epithelial Differentiation Status. *Am J Pathol*. 2004;164(1):73–9.
 44. Wu A, Luo W, Zhang Q, Yang Z, Zhang G, Li S, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*. 2013;330(2):181–9.
 45. Luo WR, Gao F, Li SY, Yao KT. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2012;61(6):1072–81.
 46. Luo WR, Chen XY, Li SY, Wu AB, Yao KT. Neoplastic spindle cells in nasopharyngeal carcinoma show features of epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology*. 2012;61(1):113–22.
 47. Hirunsatit R, Kongruttanachok N, Shotelersuk K, Supiyaphun P, Voravud N, Sakuntabhai A, et al. Polymeric immunoglobulin receptor polymorphisms and risk of nasopharyngeal cancer. *BMC Genet*. 2003;4:1–9.
 48. Lin C, Lin C, Tan G, Chen W, Dee AN, Chan W. The Mechanism of Epstein-Barr Virus Infection in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Infection*. 1997;150(5):1745–56.
 49. Liao Q, Zhao L, Chen X, Deng Y, Ding Y. Serum proteome analysis for profiling protein markers associated with carcinogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(4):465–76.
 50. Zhong XY, Senba M, Gu JN, Itakura H. B-cell antigen marker expression in

- nasopharyngeal carcinoma. *Zentralbl Pathol.* 1993;139(4–5):281–6.
51. Cheng AL, Huang WG, Chen ZC, Peng F, Zhang PF, Li MY, et al. Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clin Cancer Res.* 2008;14(2):435–45.
 52. Zhang Y, Bai Y, Zhang Y, Guan J, Chen L. The MDM2 309 T/G Polymorphism is Associated with Head and Neck Cancer Risk Especially in Nasopharyngeal Cancer: A Meta-Analysis. *Onkologie.* 2012;35(11):666–70.
 53. Alsbeih G, Al-Harbi N, Al-Hadyan K, El-Sebaie M, Al-Rajhi N. Association between normal tissue complications after radiotherapy and polymorphic variations in TGFB1 and XRCC1 genes. *Radiat Res.* 2010 Apr;173(4):505–11.
 54. Liu Z, Chen C, Yang H, Zhang Y, Long J, Long X, et al. Proteomic features of potential tumor suppressor NESG1 in nasopharyngeal carcinoma. *Proteomics.* 2012;12(22):3416–25.
 55. Hirasaki S, Yamazaki T, Shiba K. Changes in salivary components by drug administration in patients with heart diseases. *J Med Dent Sci.* 2005;52(4):183–8.
 56. Goncalves LDR, Soares MR, Nogueira FCS, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010 May;73(7):1334–41.
 57. Lucarini G, Zizzi A, Aspriello SD, Ferrante L, Tosco E, Lo Muzio L, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor, CD44 and CD133 in periodontal disease and diabetes: An immunohistochemical study. *J Clin Periodontol.* 2009;36(1):3–10.
 58. Sharma A, Pradeep AR, Raghavendra NM, Arjun P, Kathariya R. Gingival crevicular fluid and serum cystatin c levels in periodontal health and disease. *Dis Markers.* 2012;32(2):101–7.
 59. Eley BM, Cox SW. Advances in periodontal diagnosis. 7. Proteolytic and hydrolytic enzymes link with periodontitis. *Br Dent J.* 1998 Apr;184(7):323–8.
 60. Bisson-Boutelliez C, Miller N, Demarch D, Bene MC. CD9 and HLA-DR expression by crevicular epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils

- in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001;28(7):650–6.
61. Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Pralong WF, et al. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent Res*. 2000;79(2):740–7.
 62. Bonuccelli G, Casimiro MC, Sotgia F, Wang C, Liu M, Katiyar S, et al. Caveolin-1 (P132L), a common breast cancer mutation, confers mammary cell invasiveness and defines a novel stem cell/metastasis-associated gene signature. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1650–62.
 63. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*. 2005;81(3):247–64.
 64. Zhu Y, Zhang W, Huo Z, Zhang Y, Xia Y, Li B, et al. A novel locus for maternally inherited human gingival fibromatosis at chromosome 11p15. *Hum Genet*. 2007;121(1):113–23.
 65. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Son S, Nakamura Y, Harada K, et al. Serum antithrombin III level is well correlated with multiple indicators for assessment of liver function and diagnostic accuracy for predicting postoperative liver failure in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(114):551–7.
 66. Ohata N, Ito S, Yoshida A, Kunisada T, Numoto K, Jitsumori Y, et al. Highly frequent allelic loss of chromosome 6q16-23 in osteosarcoma: Involvement of cyclin C in osteosarcoma. *Int J Mol Med*. 2006;18(6):1153–8.
 67. Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3+ CD56+ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol*. 2003 Feb;77(2):175–9.
 68. Mocroft A, Wyatt C, Szczech L, Neuhaus J, El-Sadr W, Tracy R, et al. Interruption of antiretroviral therapy is associated with increased plasma cystatin C. *AIDS*. 2009 Jan;23(1):71–82.
 69. Martin A, Amin J, Cooper DA, Carr A, Kelleher AD, Bloch M, et al. Abacavir does not affect circulating levels of inflammatory or coagulopathic biomarkers in suppressed HIV: A randomized clinical trial. *Aids*. 2010;24(17):2657–63.

70. Kraus JA, Felsberg J, Tonn JC, Reifenberger G, Pietsch T. Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002 Aug;28(4):325–33.
71. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goeppert M, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15(21):6683–93.
72. Rizos E, Sourvinos G, Spandidos DA. Loss of heterozygosity at 8p, 9p and 17q in laryngeal cytological specimens. *Oral Oncol.* 1998;34(6):519–23.
73. Grimmond SM, Palmer JM, Walters MK, Scott C, Nancarrow DJ, Teh BT, et al. Confirmation of a susceptibility locus on chromosome 13 in Australian breast cancer families. *Hum Genet.* 1996;98(1):80–5.
74. Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Cartiglia C, Wang JB, Zhang BC, et al. Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, People's Republic of China: Results of urine genotoxicity assays as related to smoking habits. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(7):775–83.
75. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol.* 2013 Jan;33(1):271–9.
76. Panchision DM, Chen H-L, Pistollato F, Papini D, Ni H-T, Hawley TS. Optimized Flow Cytometric Analysis of Central Nervous System Tissue Reveals Novel Functional Relationships Among Cells Expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells.* 2007;25(6):1560–70.
77. Guzmán-Ramírez N, Völler M, Wetterwald A, Germann M, Cross NA, Rentsch CA, et al. In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *Prostate.* 2009;69(15):1683–93.
78. Ivan V, Litvinov, Donald J. Vander Griend, Yi Xu, Lizamma Antony, Susan L. Dalrymple and JTI. Low-Calcium Serum-Free Defined Medium Selects for Growth of Normal Prostatic Epithelial Stem Cells. *Cancer Res.* 2006;66(10):2711–20.

- 1):1–27.
79. Kam M, Curtis MA, McGlashan SR, Connor B, Nannmark U, Faull RLM. The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat.* 2009;37(3):196–205.
 80. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2007;67(7):3153–61.
 81. Sasaki T, Onishi T, Hoshina A. Nadir PSA level and time to PSA nadir following primary androgen deprivation therapy are the early survival predictors for prostate cancer patients with bone metastasis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;14(3):248–52.
 82. Wu JT, Lyons BW, Liu GH, Wu LL. Production of milligram concentrations of free prostate specific antigen (fPSA) from LNCaP cell culture: Difference between fPSA from LNCaP cell and seminal plasma. *J Clin Lab Anal.* 1998;12(1):6–13.
 83. Madland TM, Larsen A, Brun JG. S100 proteins calprotectin and S100A12 are related to radiographic changes rather than disease activity in psoriatic arthritis with low disease activity. *J Rheumatol.* 2007 Oct;34(10):2089–92.
 84. Larrinaga G, Gil J, Meana JJ, Ruiz F, Callado LF, Irazusta J. Aminoamidase activity in the postmortem brain of human heroin addicts. *Neurochem Int.* 2005;46(3):213–9.
 85. Schaaij-Visser TBM, Bremmer JF, Braakhuis BJM, Heck AJR, Slijper M, van der Waal I, et al. Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2010;46(2):123–7.
 86. Gires O, MacK B, Rauch J, Matthias C. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(1):252–9.
 87. Xu XC, Lee JS, Lippman SM, Ro JY, Hong WK, Lotan R. Increased expression of cytokeratins CK8 and CK19 is associated with head and neck

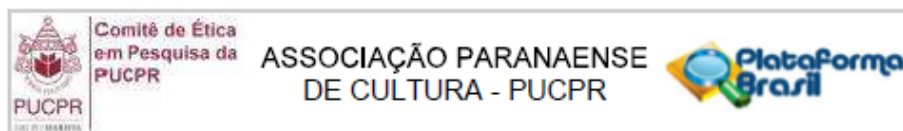
- carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(8):871–6.
88. Nayyar A, Khan M. In search of malignant transformation: A pilot study. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):277.
89. Nayyar AS. Novel biochemical markers: Early detection and prevention of malignant transformation a pilot study. *Acta Med Iran.* 2012;50(9):597–602.
90. Deyrup AT, Montag AG. Epithelioid and epithelial neoplasms of bone. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(2):205–16.
91. Swanson PE. Clear cell tumors of bone. *Semin Diagn Pathol.* 1997 Nov;14(4):281–91.
92. Krishna A, Naveen Kumar R, Shylaja S, Kaveri H, Kumaraswamy K, Murthy S. Overexpression of MDM2 protein in ameloblastomas as compared to adenomatoid odontogenic tumor. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):232.
93. Kishino M, Murakami S, Yuki M, Iida S, Ogawa Y, Kogo M, et al. A immunohistochemical study of the peripheral ameloblastoma. *Oral Dis.* 2007;13(6):575–80.
94. Pitiyage GN, Lim KP, Gemenitzidis E, Teh MT, Waseem A, Prime SS, et al. Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMPs -1 and -2) in fibroblasts are early indicators of oral sub-mucous fibrosis and ageing. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(6):454–62.
95. Lalli A, Tilakaratne WM, Ariyawardana A, Fitchett C, Leigh IM, Hagi-Pavli E, et al. An altered keratinocyte phenotype in oral submucous fibrosis: Correlation of keratin K17 expression with disease severity. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(4):211–20.
96. Tsukitani K, Nakai M, Tatemoto Y, Hikosaka N, Mori M. Histochemical studies of obstructive adenitis in human submandibular salivary glands. I. Immunohistochemical demonstration of lactoferrin, lysozyme and carcinoembryonic antigen. *J Oral Pathol.* 1985 Sep;14(8):631–8.
97. Yanagawa T, Yoshida H, Yamagata K, Onizawa K, Tabuchi K, Koyama Y, et al. Loss of cytokeratin 13 expression in squamous cell carcinoma of the tongue is a possible sign for local recurrence. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007 Jun;26(2):215–20.
98. Yoshihara A, Nakamura K, Miyazaki H. The association between renal

- function and tooth loss in Japanese community-dwelling postmenopausal women. *Gerodontology*. 2012;29(2):1–5.
99. Forsman K, Lind L, Bäckman B, Westermarck E, Holmgren G. Localization of a gene for autosomal dominant amelogenesis imperfecta (ADAI) to chromosome 4q. *Hum Mol Genet*. 1994;3(9):1621–5.
 100. Oudenhoven HPW, Meijerink H, Wisaksana R, Oetojo S, Indrati A, van der Ven AJAM, et al. Total lymphocyte count is a good marker for HIV-related mortality and can be used as a tool for starting HIV treatment in a resource-limited setting. *Trop Med Int Heal*. 2011;16(11):1372–9.
 101. Gromova I, Gromov P, Kroman N, Wielenga VT, Simon R, Sauter G, et al. Immunoexpression Analysis and Prognostic Value of BLCAP in Breast Cancer. *PLoS One*. 2012;7(9):1–10.
 102. Kuboki T, Hattori T, Mizushima T, Kanyama M, Fujisawa T, Yamashita A, et al. Detection of specific antibodies against human cultured chondrosarcoma (HCS-2/8) and osteosarcoma (Saos-2) cells in the serum of patients with osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*. 1999;44(5):403–14.
 103. Brunner M, Thurnher D, Heiduschka G, Grasl MC, Brostjan C, Erovic BM. Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients. *J Surg Oncol*. 2008;98(7):545–50.
 104. Kusakawa J, Ryu F, Kameyama T, Mekada E. Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med*. 2001;30(2):73–9.
 105. Chi L-M, Lee C-W, Chang K-P, Hao S-P, Lee H-M, Liang Y, et al. Enhanced Interferon Signaling Pathway in Oral Cancer Revealed by Quantitative Proteome Analysis of Microdissected Specimens Using 16 O/ 18 O Labeling and Integrated Two-dimensional LC-ESI-MALDI Tandem MS. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(7):1453–74.
 106. Hamakawa H, Bao Y, Takarada M, Fukuzumi M, Tanioka H. Cytokeratin expression in squamous cell carcinoma of the lung and oral cavity: an immunohistochemical study with possible clinical relevance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Apr;85(4):438–43.

107. Szabo G. Consequences of Alcohol Consumption on Host Defence. *Alcohol Alcohol*. 2002;34(6):830–41.
108. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontol* 2000. 2016 Feb;70(1):7–10.

ANEXOS

Parecer de comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Saúde bucal em usuários de crack.

Pesquisador: Luciana Reis Azevedo Alanis

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60172316.5.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.825.659

Apresentação do Projeto:

Considerado um problema de saúde pública mundial, a cocaína e o crack atingem mundialmente uma faixa de 17 a 20 milhões de pessoas, sendo que os maiores consumidores são América do Norte, América do Sul, Europa Central e Europa Ocidental. Somente nos Estados Unidos, no ano de 2010, os gastos para tratamento/reabilitação dos usuários foram próximos a 28 bilhões de dólares. No Brasil, entre as substâncias ilícitas, a cocaína e o crack são, respectivamente, a segunda e a terceira droga com maior número de usuários adultos. Foram relatados aproximadamente 1 milhão de usuários de crack em 2012, excluindo-se moradores de rua, segundo o último levantamento realizado no país. Um ponto importante a ser levantado é que usuários de cocaína podem desenvolver imunossupressão como consequência da utilização da droga, uma vez que são drogas imunossupressoras que agem em ampla gama de leucócitos modulando a liberação de citosinas em células natural killer, neutrófilos e macrófagos. Além disso, usuários de cocaína possuem alta prevalência de anorexia e má nutrição, que podem levar ao surgimento de lesões na mucosa bucal. Glossodínia, queilite angular e outras formas de candidose estão entre as mais comuns. A Candida é o gênero responsável pela infecção fúngica mais comum na boca e, somente em casos específicos, o fungo irá se tornar patogênico, como por exemplo, quando ocorrer imunossupressão no indivíduo. No entanto, apesar das drogas apresentarem ação

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@puccpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 1,825,559

imunossupressora, a frequência de infecções fúngicas bucais é muito baixa nos usuários. Como algumas proteínas têm ação preventiva no desenvolvimento da candidose em outras doenças, entre elas as imunoglobulinas e a histatina salivar 5, que possuem ação fungicida, uma forma de elucidar esse comportamento é a realização da análise proteômica da saliva desses indivíduos, além de ser uma estratégia que identifica possíveis biomarcadores para doenças bucais e sistêmicas. Com o aumento do número de dependentes de crack no Brasil, apontado por levantamentos recentes, é comum que profissionais da saúde, principalmente cirurgiões-dentistas, se deparem com usuários em seus atendimentos, fazendo necessário o esclarecimento dos seus efeitos na boca, identificando alterações causadas pela droga sobre a fisiologia local. Estudos para analisar o comportamento da *Candida* spp. após a exposição fumada em usuários crônicos de cocaína/crack, estudos *in vitro* e avaliações sialoquímica, sialométrica e das alterações nos fatores de virulência expressas pelo fungo exposto a droga ajudarão a elucidar a relação crack/candidose. O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da cocaína na forma de crack sobre modificações na expressão de fatores de virulência da *Candida* spp, alterações na concentração de componentes da saliva, além de avaliar correlações entre patógeno e hospedeiro usuário de crack.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da cocaína na forma de crack sobre modificações na expressão de fatores de virulência da *Candida* spp, alterações na concentração de componentes da saliva, além de avaliar correlações entre patógeno e hospedeiro usuário de crack.

Objetivo Secundário:

Nos usuários de crack e álcool: - Avaliar a prevalência de cárie dental pelo índice CPOD (cariado, perdido, obturado); - Avaliar a prevalência de doença periodontal pelos Índices de Placa e Gengival; - Avaliar a presença da xerostomia; - Avaliar a ocorrência de manifestações na mucosa bucal; - Avaliar a sialometria (fluxo salivar estimulado); - Avaliar a sialoquímica: pH, capacidade tampão da saliva, concentração de uréia, glicose, cálcio, proteínas totais e atividade da -amilase; - Avaliar os níveis salivares de histatina-5; - Realizar análise proteômica da saliva. Nos ensaios *in vitro*: - Avaliar fatores de virulência de *Candida albicans*. Nos ensaios em modelo animal: - Avaliar volume de perda óssea em ratas submetidas a doença periodontal induzida por ligadura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios atendem ao disposto nas resoluções da CONEP.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@puccpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 1,825,859

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa atende ao disposto nas resoluções da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória atendem ao disposto nas resoluções da CONEP.

Recomendações:

As correções solicitadas foram efetuadas não são necessárias novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776583.pdf	03/11/2016 20:47:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Thiago.docx	03/11/2016 20:47:09	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_san_julian.pdf	18/10/2016 14:02:18	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Outros	Ficha_questionario_saude.pdf	18/10/2016 13:22:21	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termos_Thiago.doc	17/09/2016 00:41:04	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Thiago.doc	17/09/2016 00:23:53	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Thiago.docx	17/09/2016 00:23:27	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito
Cronograma	Cronograma_Thiago.docx	17/09/2016 00:16:48	Luciana Reis Azevedo Alanis	Aceito

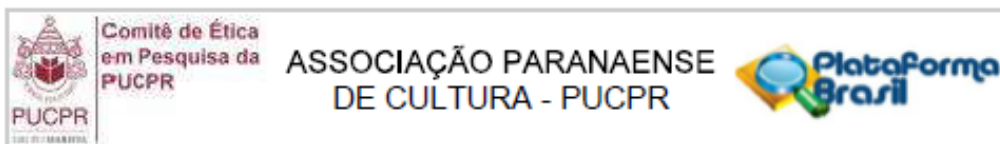
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 1,825,859

CURITIBA, 18 de Novembro de 2016

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Página 04 de 04

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ (nome completo), RG _____,
_____, (nacionalidade), _____, (idade), _____, (estado civil),
_____, (endereço), _____, (profissão),

estou sendo convidado a participar de um estudo denominado "Saúde Bucal Em Usuários De Crack" cujos objetivo é verificar se existe algum tipo de alteração nos componentes da saliva de usuários de crack, usuários de cigarro e bebida alcoólica e não usuários de drogas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doação de uma amostra de saliva e células, a saliva será obtida por mim pela deposição dela em um tubo fornecido pelo pesquisador durante 5 minutos. Ele também irá coletar as células da minha bochecha (mucosa jugal) com uma leve raspagem utilizando uma espátula de madeira esterilizada e uma pequena escova de cerdas macias no lado da língua. Também fui esclarecido que serei entrevistado com questões referentes a minha condição social, econômica e de saúde, incluindo sobre uso de drogas. Além disso receberei avaliação bucal realizada por profissional qualificado.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como:

1. Orientações sobre higiene oral (ensino da técnica de escovação e uso do fio dental).
2. Encaminhamento e realização de tratamento odontológico na clínica da PUCPR.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, por se tratar de um procedimento não invasivo, não sofrerei nenhum tipo de ferimento, picada, choque ou qualquer sensação de dor, somente um leve desconforto ou leve coceira na coleta. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Cassiano Chaiben, Indiara Welter Henn, Milena Binham Albini e Thiago Beltrami Dias Batista, alunos do programa de pós graduação em odontologia na PUCPR que poderão ser contatados pelos e-mails: "mibalbini@gmail.com", "tbdbatista@gmail.com" e telefones 3501- 8494, 3010-2563, realizando a pesquisa sob orientação da profa. Dra. Luciana Reis Azevedo Alanis.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte: o ressarcimento será em dinheiro, ou mediante depósito em conta-corrente ou cheque. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um email para "nep@pucpr.br".

Curitiba, _____ de _____ de 20 ____.

Nome e assinatura do participante da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

RUBRICA DO SUJEITO PARTICIPANTE

RUBRICA DO PESQUISADOR

Normas para publicação – Journal of Applied Oral Science

1 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

1.1 Estrutura do manuscrito

1.1.1 Página de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar deverá conter apenas:

- O título do manuscrito em inglês.
- Os nomes dos autores na ordem direta seguido da sua afiliação institucional. Para autores brasileiros as afiliações devem vir em português, em espanhol para latino-americanos e em inglês para as demais nacionalidades.
- Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone e endereço de e-mail.

1.1.2 Texto

- O artigo deverá ser previamente traduzido ou revisado por empresa ou profissional autônomo que assegurem a qualidade do texto. Autores que tenham a língua inglesa como nativa deverão apresentar declaração na qual se responsabilizam pela redação.
- Título do trabalho em inglês;
- Resumo estruturado em parágrafo único: deverá incluir o máximo de 300 palavras, ressaltando-se no texto uma pequena introdução, objetivo, material e métodos, resultados e conclusões.
- Palavras-chave: (correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo). Para determinação das palavras-chave os autores deverão consultar a lista de assuntos do [MeSh](#) e os Descritores em Ciências da Saúde - [DeCS](#). Deve-se usar ponto final para separar as palavras-chave, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introdução: resumo do raciocínio e a proposta do estudo, citando somente referências pertinentes. Estabelecer a hipótese do trabalho.
- Material e Métodos: o material e os métodos são apresentados com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira menção dos produtos, reagentes ou equipamentos. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente, exceto se modificações tenham sido feitas. Indicar os métodos estatísticos utilizados, se aplicável. Consultar o item 3 para princípios éticos e registro de ensaios clínicos.
- Resultados: apresenta os resultados em uma sequência lógica no texto, com tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e ilustrações possível.
- Discussão: enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo e as conclusões resultantes. Não repetir em detalhes dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Relatar observações de outros estudos relevantes e apontar as implicações de seus achados e suas limitações.
- Conclusão(ões): (quando houver).
- Agradecimentos (quando houver) - agradeça a pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo. Especifique auxílios financeiros citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.

- Referências (ver item 2.3)

2 NORMALIZAÇÃO TÉCNICA

O manuscrito deve ser digitado com: espaçamento de 1,5, fonte Arial, tamanho 11, 3 cm de margem de cada um dos lados, papel A4, perfazendo um total de, no máximo, 15 páginas, incluindo ilustrações (gráficos, fotografias, tabelas etc).

2.1 Ilustrações e Tabelas

2.1.1 As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, quadros etc.), serão consideradas no texto como figuras, sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto.

2.1.2 As ilustrações deverão ser encaminhadas em formato .tiff, ou .jpg, com no mínimo 300 dpi de resolução e 10 cm de largura. Esses arquivos deverão estar separados e não inseridos no texto do Word.

2.1.3 As tabelas deverão ser logicamente organizadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. A legenda será colocada na parte superior das mesmas. As tabelas deverão ser abertas nas laterais direita e esquerda. As tabelas deverão ser enviadas em formato .xls.

2.1.4 As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e localizadas ao final do trabalho em forma de lista separada e precedidas da numeração correspondente.

2.1.5 As notas de rodapé de ilustrações e tabelas serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.2 Citação de autores

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas maneiras:

- 1) Somente numérica: "... and interfere with the bacterial system and tissue system"^{3,4,7-10}. As referências devem ser citadas em ordem crescente no parágrafo.
- 2) ou alfanumérica:

- Um autor: Gatewood³¹ (2012)
- Dois autores: Cotti and Mercurio¹⁹ (2016)
- Três autores: Azar, Safi, Nikaein²⁷ (2012)
- mais que três autores: Gealh, et al.²⁸ (2014)
- Caracteres de pontuação tal como pontos e vírgulas devem ser colocados depois da citação numérica dos autores. Ex: Ferreira³⁸ (2015).

2.3 Referências

As Referências deverão obedecer aos requisitos "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver", para a submissão de manuscritos a revistas biomédicas - disponível no seguinte endereço eletrônico:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 Toda referência deverá ser citada no texto. Elas devem ser ordenadas de acordo com sua apresentação no texto e numeradas sequencialmente em ordem crescente. As abreviaturas dos títulos dos periódicos internacionais citados deverão estar de acordo com o padrão [MEDLINE](#)

2.3.2 Não incluir comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de referências.

2.3.3 Teses, dissertações, monografias e resumos não serão aceitos como referências.

2.3.4 Listar os nomes dos 6 primeiros autores do trabalho; excedendo este número, os 6 primeiros autores do trabalho devem ser citados, seguidos pela expressão ", et al.", que deve ser seguida por ponto e não escrita em itálico. Ex: Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, et al.

2.3.5 Não ultrapassar a citação de 40 referências.

Exemplos de referências:

Livro

Preedy VR, organizator. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015.

Capítulo de Livro

Buzalaf CP, Leite AL, Buzalaf MA. Fluoride metabolism. In: Preedy VR, organizator. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015. p. 54-72.

Artigo de periódico

Gorduysus M, Nagas E, Torun OY, Gorduysus O. A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. Aust Endod J. 2011;37(3):128-33.

Artigo de periódico exclusivamente na Internet (com identificador eletrônico)

Rudolph H, Ostertag S, Ostertag M, Walter MH, Luthardt RG, Kuhn K. Reliability of light microscopy and a computer-assisted replica measurement technique for evaluating the fit of dental copings. J Appl Oral Sci [Internet]. 2018[cited 2017 Dec 12];26:e20160590. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0590>

Artigo de periódico com DOI

Wagner F, Strasz M, Traxler H, Schicho K, Seemann R. Evaluation of an experimental oblique plate for osteosynthesis of mandibular condyle fractures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017;124(6):537-41. doi: 10.1016/j.oooo.2017.09.004

Artigo de periódico Epub ahead of print/In press/Forthcoming

Nair R, Chiu SE, Chua YK, Dhillon IK, Li J, Yee RT. Should short-term use of alcohol containing mouthrinse be avoided for fear of worsening xerostomia? J Oral Rehabil. Forthcoming 2017. doi: 10.1111/joor.12587

Artigos com mais de 6 autores:

Citam-se até os 6 primeiros seguidos da expressão " ,et al."

Grubbs V, Plantinga LC, Crews DC, Bibbins-Domingo K, Saran R, Heung M, et al. Vulnerable populations and the association between periodontal and chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:711-7

Volume com suplemento e/ou Número Especial

Davidsdson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

3 PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTROS DE ENSAIOS CLÍNICOS

3.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos. O periódico Journal of Applied Oral Science endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos publicadas nesta Revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e com outros similares dispostos nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. No caso de experimentos com animais, estes devem seguir os mesmos princípios de ética envolvidos. Em experimentos que envolvam procedimentos cirúrgicos em animais, os autores devem descrever na seção de Material e Métodos evidências de que a dosagem anestésica produziu efeito adequado e por tempo necessário para a condução do ato cirúrgico. Todos os experimentos com humanos ou animais devem vir acompanhados de descrição, na seção de Material e Métodos, de que o estudo foi aprovado pelos respectivos órgãos que gerenciam a Ética em Pesquisa nas suas instituições de origem.

3.1.1 Artigos apresentando **estudos experimentais em humanos ou animais** deverão **obrigatoriamente** vir acompanhados de documento comprobatório da aprovação pelo Comitê de Ética.

3.1.2 Artigos apresentando estudos em animais deverão obrigatoriamente vir acompanhados de Checklist ARRIVE devidamente preenchido. O documento está disponível no link a seguir:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/societyimages/jaos-scielo/ARRIVEChecklist.docx>

3.1.3 Relatórios emitidos em língua que não inglês, espanhol e português devem ser traduzidos para o inglês.

3.2 Registros de Ensaios Clínicos

O periódico Journal of Applied Oral Science apóia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o

registro e divulgação internacional sobre estudos clínicos com acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham o registro, em uma das plataformas de ensaios clínicos, validadas pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE. A OMS define Ensaio Clínico como "qualquer estudo de pesquisa que prospectivamente designa participantes humanos ou grupos de humanos para uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos e os resultados de saúde. Intervenções incluem, mas não se restringem a drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, procedimentos radiológicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de cuidado, cuidado preventivo etc."

3.2.1 Os artigos que envolvam ensaios clínicos (clinical trials) em voluntários humanos deverão ser enviados acompanhados de dois documentos suplementares **obrigatórios**:

- checklist do CONSORT 2010 (<http://www.consort-statement.org/>)
- comprovante de número de registro da pesquisa em base que atenda às exigências da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).
- Sugestões para autores brasileiros: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>
- Sugestão para autores brasileiros ou de outras nacionalidades: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) ou <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>).

3.3 O Editor-Chefe e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou cujos métodos empregados forem considerados inapropriados para o uso de humanos ou animais.

4 OUTRAS QUESTÕES SERÃO RESOLVIDAS PELO EDITOR-CHEFE E CONSELHO EDITORIAL