ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *CANDIDA* SP EM MUCOSA RETROCOMISSURAL DE DEPENDENTES QUÍMICOS

CURITIBA
2015

JULIANA KERN DE MORAES

ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *CANDIDA* SP EM MUCOSA RETROCOMISSURAL DE DEPENDENTES QUÍMICOS

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima.

CURITIBA

2015

Moraes, Juliana Kern de
Aspectos clínicos e citopatológicos da infecção por *Candida sp* em mucosa retrocomissural de dependentes químicos / Juliana Kern de Moraes – Curitiba, 2015.
82 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Odontologia. 2. Candidíase. 3. Alcoolismo. 4. Usuários de drogas. 5. Tabaco. I. Lima, Antonio Adilson de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.63

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA KERN DE MORAES

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR CANDIDA SP.EM MUCOSA RETROCOMISSURAL DE DEPENDENTES QUÍMICOS

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

Orientador: _____
Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós graduação em Odontologia, UFPR

_____
Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado
Programa de Pós graduação em Odontologia, UFPR

_____
Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Escola de Saúde e Biociências- PUCPR

Curitiba, 10 de dezembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista primeiramente a Deus, que tem a soberania sobre o que deve ser, porque conhece as nossas necessidades mais do que podemos supor.

Em segundo lugar à minha mãe, Ana, que dispõe de toda sua vida pela minha felicidade.

Dedico também a meu avô Dionizio que estará eternamente presente em todos os caminhos que eu decidir seguir.

Aos mestres que me proporcionaram o melhor exemplo de todos: o amor pelo conhecimento e pelas transformações que este é capaz de gerar.

Nunca te esqueças de aproveitar o tempo na aquisição de luz, enquanto é dia.

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR - PR/Brasil);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu querido orientador Professor Doutor Antonio Adilson Soares de Lima que nos dá o maior exemplo de dedicação e amor à docência;

Às queridas professoras Ângela Fernandes e Maria Ângela Naval Machado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná;

Agradeço à Associação de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (APTA- Campo Largo - PR/Brasil) e a Associação San Julian Amigos e Colaboradores (Piraquara - PR/Brasil) por permitirem que o trabalho fosse realizado em suas dependências, assim como a acolhida;

Aos participantes da pesquisa que confiaram no nosso trabalho;

A todos demais colaboradores da pesquisa que dispuseram de seu tempo, em especial, Thiago Beltrami Dias Batista, Bruno Pontes Moreira, Ruann Oswaldo Carvalho da Silva, Marcelo Yudi Sakamoto, Diogo Berwanger Januario, Joslei Carlos Bohn, Cassiano Lima Chaiben, Milena Binhame Albini Martini, Andréa dos Santos de Castro, Jennifer Kula, Michelle Antonette Brown, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, Ana Paula Camargo Martins e Seigo Nagashima.

Ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Ao Laboratório de Patologia Aplicada da Universidade Federal do Paraná.

A todos,
Obrigada.

RESUMO

Os dependentes químicos são mais susceptíveis a desenvolver doenças bucais, incluindo a candidose crônica hiperplásica (CCH). Este estudo investigou o perfil epidemiológico e citopatológico da CCH numa população de dependentes químicos em tratamento. Trezentos e quarenta e cinco homens adultos foram submetidos a um exame clínico bucal e citopatológico na região da retrocomissura. Um total de 663 esfregaços foi corado pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS) e examinados pela microscopia de luz. Os esfregaços foram avaliados quanto à presença de hifas de *Candida* sp e analisadas variáveis citomorfométricas (área celular, área citoplasmática, área nuclear e a área nuclear/área citoplasmática). Para a análise citomorfométrica, os pacientes PAS positivos (grupo caso) foram comparados a outros dois grupos: controle positivo e controle negativo. Os resultados demonstraram que houve uma baixa prevalência da CCH com manifestação clínica (0,62%) e subclínica (7,86%) nos dependentes químicos. Houve uma diminuição significativa na área celular (ACel) e da área citoplasmática (ACit) nas células do grupo caso em relação ao controle negativo. Além disso, a área nuclear (AN) e a relação entre AN/ACit aumentou no grupo caso em relação ao controle negativo.
Conclui-se que a CCH tem uma baixa prevalência na mucosa retrocomissural de dependentes químicos em tratamento. Além disso, a CCH nas formas clínica e subclínica associada ao uso de drogas ilícitas, álcool e tabaco pode causar o aumento da AN e da AN/ACit e a diminuição da ACel e da ACit que são indícios de uma maior atividade proliferativa do epitélio bucal.

Palavras-chaves: alcoolismo; candidíase, citologia, usuários de drogas; tabaco.

ABSTRACT

Drug addicts are predisposed to develop oral diseases, including chronic hyperplastic candidosis (CHC). This study investigated the epidemiology and cytopathology of CHC in a population of drug addicts in treatment. Three hundred and forty-five adult males were submitted to an oral clinical examination and cytopathologic in retrocomissural region. A total of 663 smears was stained by the method of periodic acid-Schiff (PAS) and examined by light microscopy. The smears were evaluated for the presence of hyphae of Candida sp and some cytomorphometric variables (cell area, cytoplasmic area, nuclear area and nuclear area / cytoplasmic area). For the cytomorphometric analysis, positive PAS patients (case group) were compared to two other groups: positive and negative control. The results showed that there was a low prevalence of CHC with clinical manifestation (0.62%) and subclinical (7.86%) in addicts. There was a significant decrease in cell area (CelA) and cytoplasmic (CitA) cells of the group if compared to the negative control. Furthermore, the nuclear area (NA) and the AN / CitA ratio increased in the case group compared to the negative control. Thus, it is concluded that the CHC has a low prevalence in retrocomissural mucosa of drug addicts in treatment. In addition, the CHC in clinical and subclinical forms associated with the use of drugs, alcohol and tobacco may increase of the NA and NA / CitA ratio and decreased CelA and CitA which are evidence of a higher proliferative activity of the oral epithelium.

Keywords: alcoholism; candidiasis, cytology, drug users; tobacco.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8
2. PROPOSIÇÃO 16
2.1 Objetivo geral 16
2.2 Objetivos específicos 16
3. ARTIGO 17
3.1 Página título 17
3.2 Resumo 19
3.3 Introdução 20
3.4 Pacientes e métodos 21
3.4.1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa 21
3.4.2 Desenho do estudo 21
3.4.3 Amostra 21
3.4.4 Coleta de dados 22
3.4.5 Processamento laboratorial 23
3.4.6 Análise estatística 26
3.5 Resultados 26
3.5.1 Análise morfológica dos esfregaços 29
3.5.2 Análise morfométrica dos esfregaços 33
3.6 Discussão 35
3.7 Referências 41
3.8 Agradecimentos 43
3.9 Conflitos de interesses 44
4. CONCLUSÕES 45
5. REFERÊNCIAS 46
APÊNDICES 55
APÊNDICE 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 55
APÊNDICE 2 FICHA DE COLETA DE DADOS 57
APÊNDICE 3 PROTOCOLO PAS 58
APÊNDICE 4 GRÁFICOS DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA 59
ANEXOS 63
ANEXO 1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 63
ANEXO 2 AUTHOR GUIDELINES 66

1. INTRODUÇÃO

O microrganismo do gênero C*andida* é um fungo que habita o ser humano comensalmente e seu meio. Poucas espécies de C*andida* podem ser patogênicas e são capazes de causar uma variedade de micoses superficiais e profundas, tais como: candidose cutânea, mucocutânea, subcutânea ou candidose sistêmica. No trato respiratório de humanos já foram isolados cerca de 40% da espécie *C. albicans*, predominantemente, sobre outras espécies de *Candida* (MOHANDAS; BALLAL, 2011).

O fungo pode crescer em pelo menos três tipos morfológicos: leveduras, pseudo-hifas e hifas. Outras formas morfológicas podem existir durante a comutação em colônias. (KAO *et al.,* 1999).

A presença ou a colonização de *Candida* não necessariamente indica infecção na boca. O fungo pode viver de forma comensal e alguns estudos demonstraram que a sua prevalência varia aproximadamente de 3% até 75% na microbiota bucal de indivíduos saudáveis dependendo da população avaliada e do método empregado para identificação (CANNON *et al*., 1995; ROSSIE; GUGGENHEIMER,1997; PADILHA *et al*., 2014).

A colonização depende da velocidade de aquisição, ou seja, a diferença entre a taxa de crescimento das células fúngicas na boca e da remoção destas por ingestão e/ou pela higiene bucal. A infecção por *Candida* dependerá do tecido colonizado, dos fatores de virulência expressos pelo fungo e da resposta do hospedeiro. Assim, a colonização depende de vários fatores: a aquisição ou a entrada das células na boca, a adesão e crescimento desses fungos, a penetração nos tecidos e a remoção física da cavidade bucal. Portanto, a adesão é de importância fundamental na colonização (CANNON; CHAFFIN, 1999).

A levedura de *Candida albicans* pode ser encontrada na saliva em uma concentração média de 300 a 500 células por mililitro em pessoas que tenham colonização pelo fungo. Um grande número de sítios no interior da boca pode ser colonizado, em indivíduos saudáveis, o microrganismo é mais comumente isolado

da linha média dos terços médio e posterior do dorso da língua ou na mucosa palatal (ARENDORF; WALKER, 1979; BORROMEO; MCCULLOUGH; READE, 1992).

A candidose é considerada a infecção fúngica mais comum na boca. Ela é causada por um supercrescimento deste tipo de microrganismo, frequentemente associado à *Candida* que compreende em torno de 150 espécies. A espécie *Candida albicans* é a mais comumente encontrada nas infecções fúngicas da boca humana (FOTOS; HELLSTEIN, 1992; MUZIKA; GLICK, 1995; CANNON *et al.,* 1995; ROSSIE; GUGGENHEIMER, 1997; EPSTEIN; POLSKY, 1998).

Vários fatores podem favorecer a infecção por *Candida*, tais como: condições de imunossupressão (por exemplo: infecção pelo HIV e uso de quimioterápicos), endocrinopatias (por exemplo: diabetes), doenças crônicas (por exemplo: doenças renais), deficiências nutricionais (por exemplo: anemia), uso de alguns medicamentos (por exemplo: antidepressivos), neoplasias malignas, uso de próteses totais, alterações epiteliais (por exemplo: leucoplasia, líquen plano e trauma na mucosa bucal), mudanças na quantidade ou na qualidade da saliva (por exemplo: diminuição de imunoglobulinas, síndrome de Sjögren, uso de medicamentos e efeitos da radioterapia), dieta rica em carboidratos, extremos de idade (por exemplo: bebês e idosos com baixa imunidade), higiene bucal deficiente, uso de tabaco e drogas ilícitas (PENHALL, 1980; FOTOS; HELLSTEIN, 1992; NINANE 1994; BUDTS-JORGENSEN; LOMBARDI, 1996; CANNON *et al.,* 1995; MUZIKA; GLICK, 1995; NEVILLE *et al.,* 1995; HEDDERWICK; KAUFFMAN, 1997; HOPPE, 1997; ROSSIE; GUGGENHEIMER, 1997; SHAY *et al.,* 1997; EPSTEIN; POLSKY, 1998; WILLIAMS *et al.,* 2001; SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003; ANTONIAZZI *et al.,* 2013).

Os fatores relacionados à patogenicidade do microrganismo podem estar associados com a presença de micélio ou aglomerados de hifas, à produção de exotoxinas e à habilidade de aderência da célula fúngica nas células epiteliais, se estas proporcionarem condições favoráveis (HOPPE, 1997; EPSTEIN; POLSKY, 1998).

Apesar das leveduras possuírem seus próprios mecanismos patogênicos (por exemplo: aspartil-proteases secretadas), considera-se importante que a ponta das hifas seja um local de secreção de enzimas capazes de degradar proteínas, lipídios e outros componentes celulares. Isto facilita ainda mais a infiltração nos tecidos, possivelmente por liquefação do substrato para o avanço da célula fúngica (HUBE; NAGLIK, 2001). Além da capacidade de penetração, as hifas patogênicas apresentam um fenômeno de orientação que lhes permite navegar topograficamente nas superfícies e, portanto, localizar pontos de integridade tecidual enfraquecidos. Desta forma, o fungo ganha acesso às regiões vulneráveis para a sua invasão (HARDHAM, 2007).

A candidose é uma doença que pode se apresentar na boca de diversas formas clínicas. Sua apresentação varia desde regiões eritematosas, placas esbranquiçadas não removíveis por raspagem, áreas atróficas e recobertas por pseudomembranas (AKPAN; MORGAN, 2002).

A candidose crônica hiperplásica é caracterizada clinicamente pela presença de placas brancas, translúcidas ou opacas e de diferentes tamanhos. A sua superfície é macia e úmida à palpação, com limites claramente definidos e áreas eritematosas ocasionais. Lesões hiperplásicas ou nodulares podem se desenvolver em qualquer parte da boca. No entanto, elas são mais frequentes na mucosa jugal próxima à comissura labial (retrocomissura), no dorso da língua e no palato duro. Uma característica marcante desta lesão é que ela não pode ser removida por raspagem (LÓPEZ, 2012).

A espécie *Candida albicans* costuma ser a mais identificada nas leucoplasias bucais. Muitos autores utilizam o termo “leucoplasia por *Candida*” e o diagnóstico clínico diferencial com a leucoplasia bucal torna-se difícil. Por esta razão, são necessários exames citopatológicos e/ou histopatológicos para identificar a presença de hifas na camada superficial do epitélio acompanhada por infiltração de neutrófilos no tecido conjuntivo (CAWSON; LEHNER, 1968; BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996).

Segundo Shibata *et al.* (2012), o exame histopatológico da candidose crônica hiperplásica pode variar em relação à sua apresentação clínica, dependendo do

grau de hiperplasia que mostra variações marcantes na espessura do epitélio. A infecção por *Candida* não só provoca hiperplasia epitelial, mas também pode induzir atipias.

López *et al.* (2012) observaram uma prevalência de candidose crônica hiperplásica em 15% de uma amostra de 123 indivíduos com variadas formas de candidose. O estudo revelou que 68% dos pacientes com aquela forma da doença eram tabagistas e que alterações displásicas foram detectadas em 42% dos casos.

As leucoplasias apresentam hiperceratose, o que pode explicar a constante presença de *Candida* sp*.,* que é ceratolítica. A relação do tabaco com o aumento da prevalência de candidose ainda não está totalmente clara. O aumento da ceratinização do epitélio bucal em pacientes fumantes pode facilitar a aderência do fungo (ARENDORF; WALKER, 1980; SPOLIDORIO *et al.,* 2003).

O papel da infecção por *Candida* no processo de ceratinização onde há a indução de atipia celular ainda é controverso. Jepsen e Winther (1965) sugeriram que o fungo invade uma lesão pré-existente. Por outro lado, Cawson e Lehner (1968) propuseram que a infecção por *Candida* é a principal causa de leucoplasias.

Nos cortes histopatológicos de biopsias realizadas em leucoplasias por *Candida* pode-se observar áreas de hiperplasia epitelial, hiperceratose, microabcessos no extrato córneo e inflamação crônica da lâmina própria. As hifas são hematoxifílicas e podem ser mais facilmente visualizadas quando se faz uso da coloração à base do ácido periódico de Schiff (PAS). Este ácido reage com alguns polissacarídeos deste microrganismo tornando-o mais visível em relação às demais estruturas. Porém, quando se emprega a coloração do PAS há 13% de chance de não se detectar o fungo, particularmente, se as hifas forem escassas (ROED-PETERSEN *et al.,* 1970; EPSTEIN *et al.,* 1986).

Hongal e colaboradores (2015) observaram que o grau de displasia epitelial estava significativamente associado com a presença ou ausência de hifas em todos os casos. Graus mais elevados de displasia foram associados com o aumento da prevalência de hifas. Estes autores encontraram uma prevalência de hifas em 44% dos casos de leucoplasias com displasia.

A candidose crônica hiperplásica caracterizada pela invasão do tecido epitelial por hifas pode ser capaz de desencadear uma neoplasia em até 10% dos casos desta infecção (HOOPER *et al.,* 2009).

As hifas, principalmente da espécie *Candida albicans*, embora outras espécies como *Candida dubliniensis*, *C. tropicalis*, e *C. pintolopesii*, já foram identificadas em casos de leucoplasias e invadem a camada superficial do epitélio causando paraceratinização (SPOLIDORIO *et al.,* 2003; BAKRI *et al.,* 2010).

Tem sido descrito na literatura que as leucoplasias bucais com a presença de *Candida* apresentam uma taxa mais elevada de transformação maligna do que aquelas não infectadas. Estas lesões têm demonstrado significativamente mais áreas de displasia epitelial e com maior gravidade (SPOLIDORIO *et al.*, 2003; BAKRI *et al.,* 2010). Spolidorio *et al.* (2003) avaliaram 832 amostras colhidas por biopsias e encontraram uma correlação entre infecção por *Candida* sp. e a presença de displasia epitelial (nos seus mais variados graus), papiloma escamoso e carcinoma espinocelular.

Algumas lesões podem anteceder o câncer bucal e desta forma são denominadas como lesões cancerizáveis ou pré-cancerizáveis. Por outro lado, o termo condição cancerizável diz respeito a um fator sistêmico que tem um risco de gerar câncer na boca. No entanto, sabe-se que apesar deste risco à carcinogênese bucal, nem todas progridem para câncer. Além disso, nem todo câncer de boca origina-se destas lesões (MARTINS *et al.*, 2008).

Alguns fatores são comumente relacionados ao processo de carcinogênese bucal, tais como: consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, radiação ultravioleta, agentes infecciosos e imunológicos e fatores genéticos. Contudo, as lesões cancerizáveis representam a primeira evidência clínica deste processo (WHO, 1978; WHO, 2015).

Alguns autores acreditam no envolvimento direto dos microrganismos com o desenvolvimento do câncer bucal, principalmente em condições de baixa imunidade e higiene bucal deficiente (BAKRI *et al.,* 2010). O fumo e a ingestão de álcool são os principais fatores de risco para o câncer bucal nos países industrializados. No

entanto, existem evidências que relacionam um estado de saúde bucal ruim, a alimentação, o consumo de tabaco e álcool associados à ação do biofilme de microrganismos no desenvolvimento do câncer (SALASPURO, 2003; MEURMAN, 2010).

Loss *et al*. (2010) demonstraram que as células epiteliais infectadas por *Candida* exibem alargamento nuclear, halos perinucleares entre outras alterações teciduais. A área do citoplasma (AC) das células epiteliais mostrou-se diminuída em pacientes com candidose, em comparação com controles não infectados. Além disso, as células apresentaram um aumento na área nuclear (AN) e aumento da relação da AN/AC. Este estudo revelou que a mucosa bucal de pacientes infectados por candidose apresentou alterações significativas no tamanho e morfologia das células epiteliais.

O acetaldeído é um produto altamente tóxico e mutagênico proveniente da oxidação e do metabolismo do álcool que a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) classifica como um produto cancerígeno Classe I para os seres humanos. O acetaldeído é o primeiro metabólito do metabolismo do etanol e pode facilitar a formação de um DNA mutado, induzir exacerbação das trocas de cromátides e de aberrações cromossômicas. (NIEMINEN *et al*., 2009; MARTTILA *et al.,* 2013). Ele também pode interferir na síntese e reparo de DNA em humanos sendo mutagênico mesmo em concentrações muito baixas (BROOKS; THERUVATHU, 2005; SECRETAN *et al.,* 2009; SEITZ; STICKEL, 2010; BALBO *et al.,* 2012).

Depois da ingestão de bebidas alcoólicas, o etanol torna-se distribuído de forma rápida e uniforme em toda a fase aquosa do corpo humano e, consequentemente, as concentrações dele no sangue e na saliva aumentam. Na saliva, a microbiota bucal é a principal determinante da concentração local de acetaldeído. Essa capacidade de metabolizar o etanol em acetaldeído é possível devido a atividade da enzima álcool-desidrogenase (NIEMINEN *et al.,* 2009).

Gainza-Cirauqui *et al.* (2012) observaram a produção de acetaldeído por isolados de *Candida*. Todos os isolados em incubações contendo etanol produziram altos níveis de acetaldeído. Além disso, os isolados de tabagistas produziram níveis

ainda mais altos de acetaldeído do que aqueles de não-tabagistas em todas as incubações. O resultado mais interessante observado por estes autores foi que os isolados de pacientes que eram tabagistas e alcoolistas produziram a maior quantidade de acetaldeído de todos os subgrupos de etanol.

O hábito de fumar pode estar associado com o aumento dos níveis de *Candida* na boca e ao desenvolvimento de candidose. Alguns estudos também demonstraram que o fungo pode sintetizar nitrosaminas. Espécies de *Candida* têm a capacidade de aumentar a produção de benzilmetilnitrosamina que apresenta um papel relevante na etiologia do câncer de esôfago. Além disso, cepas com alto potencial de síntese de nitrosaminas foram associadas com lesões potencialmente malignas que mostraram alterações teciduais mais severas (HSIA *et al*., 1981; KROGH *et al.,* 1987; BABONI *et al*; 2009).

A fumaça do tabaco contém aldeídos tóxicos e nitrosaminas, e o uso combinado de álcool e tabaco tem um efeito sinérgico sobre o risco de desenvolver câncer de boca (BAKRI *et al.,* 2010).

A associação entre câncer e a inflamação crônica tem sido debatida há vários anos. No entanto, recentemente, o papel das interações epitélio-tecido conjuntivo e a atividade das células e mediadores inflamatórios crônicos no microambiente tumoral vem ganhando atenção da comunidade científica. A utilização de drogas como o crack e a cocaína pareceu ser capaz de induzir mudanças inflamatórias e um aumento da ceratinização no epitélio bucal. Da mesma forma, uma redução das áreas nucleares nas células do epitélio foi observada em indivíduos dependentes de crack quando comparadas àqueles não expostos à droga. Nesses indivíduos, a presença de lesões bucais é frequente, especialmente, as úlceras, a candidose e a queilite angular (WOYCEICHOSKI; 2008; BAKRI *et al.,* 2010; ANTONIAZZI *et al.,* 2013).

A absorção de cocaína pela mucosa quando é aspirada gera uma vasoconstrição local, uma elevação intensa da temperatura e, possivelmente, uma ação cáustica da droga sobre os tecidos. Para potencializar a rápida absorção da droga, o usuário pode friccionar o pó de cocaína sobre a superfície gengival. Isto pode ocasionar uma necrose tecidual (por deficiência de suprimento sanguíneo) em

decorrência da vasoconstrição e uma erosão gerada pelo trauma mecânico realizado na região. Além disso, quando há uma redução no fluxo salivar associada, a microbiota bucal pode se alterar com o aumento da *Candida albicans* (BAKRI *et al.,* 2010; ANTONIAZZI *et al.,* 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência da candidose bucal na sua forma clínica crônica hiperplásica em região de retrocomissura bucal em uma população de homens hospitalizados para tratamento da dependência química. Além disso, foi investigado se a presença subclínica de aglomerados de hifas de *Candida* sp*.* pode causar alterações nas células epiteliais bucais destes indivíduos quando comparados ao controle.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Obter informações sobre o perfil epidemiológico e das características citopatológicas da candidose crônica hiperplásica em região de retrocomissura bucal de dependentes químicos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a prevalência da candidose crônica hiperplásica no terço anterior da mucosa jugal (retrocomissura bucal) de dependentes químicos;
- Determinar a prevalência da candidose subclínica no terço anterior da mucosa jugal (retrocomissura bucal) de dependentes químicos;
- Investigar se as células epiteliais de regiões com a candidose crônica hiperplásica sofrem alteração na área celular;
- Investigar se as células epiteliais de regiões com a candidose crônica hiperplásica sofrem alterações nas áreas citoplasmáticas e nucleares;
- Determinar se a relação área nuclear/área citoplasmática das células epiteliais da mucosa bucal sofre alteração devido à candidose crônica hiperplásica.

3. ARTIGO

3.1 Página título

ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *CANDIDA* SP EM MUCOSA RETROCOMISSURAL DE DEPENDETES QUÍMICOS

Juliana Kern de Moraes [1]
Thiago Beltrami Dias Batista [2]
Bruno Pontes Moreira [1]
Ruann Oswaldo Carvalho da Silva [1]
Marcelo Yudi Sakamoto [1]
Diogo Berwanger Januario [1]
Joslei Carlos Bohn [1]
Cassiano Lima Chaiben [3]
Antonio Adilson Soares de Lima [1]

[1]Departamento de Estomatologia, Curso de Odontologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR, Brasil.
[2]Departamento de Análises clínicas, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba/PR, Brasil.
[3]Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, Curitiba/PR, Brasil.

Título curto:

ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *CANDIDA* SP EM DEPENDENTES QUÍMICOS.

Palavras-chaves: alcoolismo; candidíase, citologia, usuários de drogas; tabaco.

Autor para correspondência:

Juliana Kern de Moraes

Department of Stomatology

School of Dentistry - Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Rua Prefeito Lothário Meissner 632, Jardim Botânico

80170-210 Curitiba - PR Brasil

Telefone: + 55 41 33604026

E-mail: ju_kern@hotmail.com

3.2 Resumo

O perfil epidemiológico e citopatológico da candidose crônica hiperplásica (CCH) foi determinado numa população de dependentes químicos em tratamento. Trezentos e quarenta e cinco homens participaram de um exame clínico e citopatológico da região de retrocomissura bucal. A morfologia dos esfregaços e algumas variáveis citomorfométricas das células epiteliais bucais foram estudadas. Um total de 663 esfregaços foram corados pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS) e examinados microscopicamente em relação à presença de hifas de *Candida* sp. Para a análise citomorfométrica, os esfregaços PAS positivos (grupo caso) foram comparados a outros dois grupos: controle positivo e controle negativo. Houve uma prevalência baixa da manifestação clínica (0,62%) e subclínica (7,86%) da CCH nos dependentes químicos. Houve uma diminuição significativa na área celular e da área citoplasmática (ACit) nas células do grupo caso em relação ao controle negativo. A área nuclear (AN) e a relação entre AN/ACit aumentaram no grupo caso em relação ao controle negativo. Conclui-se que a CCH tem uma baixa prevalência na mucosa retrocomissural de dependentes químicos em tratamento. Além disso, a CCH nas formas clínica e subclínica associada ao uso de drogas ilícitas, álcool e tabaco pode causar alterações celulares significativas que são indícios de uma maior atividade proliferativa do epitélio bucal.

3.3 Introdução

A candidose crônica hiperplásica é caracterizada clinicamente pela presença de placas brancas, translúcidas ou opacas e de diferentes tamanhos e resistentes à raspagem. A sua superfície é macia e úmida à palpação, com limites claramente definidos e áreas eritematosas ocasionais mais frequentemente vistas na mucosa jugal próxima à comissura labial (retrocomissura), no dorso da língua e no palato duro (López, et al., 2012).

Vários fatores podem favorecer a infecção por *Candida*, entre elas, dieta rica em carboidratos, extremos de idade, higiene bucal deficiente, uso de tabaco e drogas ilícitas (Fotos, & Hellstein, 1992; Muzika, & Glick, 1995; Cannon, Holmes, Mason, & Monk, 1995; Rossie, & Guggenheimer, 1997; Epstein, & Polsky, 1998; Bakri, Hussaini, Holmes, Cannon, & Rich, 2010; Antoniazzi, Bortolotto, Backes, Zanatta, & Feldens, 2013).

Alguns autores acreditam no envolvimento direto dos microrganismos com o desenvolvimento do câncer bucal, principalmente em condições de baixa imunidade e higiene bucal deficiente. O fumo e a ingestão de álcool são os principais fatores de risco para o câncer de boca nos países ocidentais. No entanto, existem evidências que relacionam um estado de saúde bucal ruim, a alimentação, o consumo de tabaco e álcool associados à ação do biofilme de microrganismos no desenvolvimento do câncer de boca (Salaspuro, 2003; Meurman, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência da candidose bucal na sua forma clínica crônica hiperplásica em região de retrocomissura de uma população de homens hospitalizados para tratamento da dependência química. Além disso, investigou se a presença subclínica de aglomerados de hifas de Candida sp pode causar alterações nas células epiteliais bucais destes indivíduos quando comparados à grupos-controle.

3.4 Pacientes e métodos

3.4.1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFPR com parecer de número 1-015.112 (Anexo 1). Os objetivos específicos desta pesquisa foram explicados de forma detalhada a todos os participantes deste estudo. Ao concordarem, os mesmos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

3.4.2 Desenho do estudo

O estudo foi realizado em duas etapas:

1) Avaliação da prevalência de candidose crônica hiperplásica clinicamente visível e da sua forma subclínica na população do estudo;

2) Análise citomorfométrica das células epiteliais bucais do grupo caso (formado por dependentes químicos com presença de hifas nos esfregaços citopatológicos), pareado com controles negativos (homens saudáveis, da mesma idade e que não faziam uso de substâncias químicas) e controles positivos (dependentes químicos da mesma idade). Ambos os controles sem esfregaços positivos para fungos *Candida* sp.

O modelo apresentado pode ser classificado como observacional transversal pareado.

3.4.3 Amostra

Foram examinados 345 indivíduos do sexo masculino, brasileiros, com idades entre 18 e 73 anos que foram divididos em dois grupos:

- Grupo de dependentes químicos – composto por 318 indivíduos que estavam internados em dois hospitais para tratamento de dependência química por álcool, variados tipos de drogas ilícitas e que utilizavam tabaco. A participação

de cada indivíduo neste grupo estava condicionada aos seguintes critérios de inclusão:

- Ser alcoolista;
- Ser tabagista;
- Ser dependente de drogas ilícitas;

Após o exame microscópico este grupo foi subdividido em dois outros: aqueles dependentes químicos com diagnóstico positivo para hifas (caso) e aqueles dependentes químicos sem diagnóstico positivo para hifas (controle positivo).

- Grupo controle negativo – composto por 27 indivíduos saudáveis, sem histórico de uso crônico de álcool, tabaco e de drogas ilícitas. Este grupo foi pareado em relação ao sexo e a idade de alguns indivíduos do grupo de dependentes químicos.

3.4.4 Coleta de dados

Foi realizado um exame clínico para a avaliação da condição de saúde bucal, seguido da coleta de células da mucosa retrocomissural, realizados por um examinador treinado.

Uma ficha clínica personalizada foi usada na coleta de dados de cada participante (Apêndice 2). Os dados pessoais (iniciais do nome, idade, cor da pele, estado civil, nível de escolaridade, ocupação e procedência) foram anotados e cada participante recebeu um código na ficha clínica para manter em sigilo os dados informados. No questionário da anamnese foram feitas perguntas sobre o tipo, a quantidade e o tempo de uso de todas as substâncias químicas utilizadas (bebidas alcoólicas, tabaco e drogas ilícitas). Os participantes também foram questionados sobre a sua saúde geral e histórico de doenças sistêmicas.

Em seguida, foi realizado um exame físico aonde os participantes foram examinados sentados numa cadeira comum sob iluminação artificial de uma lanterna clínica Radiantlite II LED metal Spirit (Chin Kou Medical Instrument LTD. China). Foram

utilizadas espátulas de madeira e compressas de gaze para o exame dos tecidos moles. Qualquer alteração de coloração, de textura e de volume envolvendo o terço anterior da mucosa jugal era anotada na ficha clínica.

A condição de saúde bucal foi determinada pelos seguintes critérios:

• BOA - Nenhum sinal clínico de cárie, doença periodontal e lesões na mucosa;

• REGULAR - Sinais clínicos de doença periodontal (presença de biofilme e inflamação nas gengivas), alterações na mucosa e lesões de cárie em até cinco dentes;

• RUIM - Sinais clínicos de doença periodontal (presença de biofilme e inflamação nas gengivas, mobilidade dentária, exposição radicular, posição dentária e oclusão alteradas por perda de inserção), alterações na mucosa e lesões de cárie em mais de cinco dentes.

Os participantes foram orientados a fazer o enxague da boca com água para eliminar resíduos alimentares e excesso de saliva. A coleta de células se deu a partir do uso de uma escova cervical Vagispec (Adlin plásticos Ltda., Jaraguá do Sul – SC/Brasil), bilateralmente, por meio da escovação de forma suave e em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas no total). Por se tratar de um estudo envolvendo a candidose crônica hiperplásica, o local da coleta escolhido para as amostras foi a região de retrocomissura bucal direita e esquerda. Foram colhidas duas amostras que foram fixadas por meio do fixador citológico Vagispec (Adlin Plásticos Ltda., Jaraguá do Sul – SC/Brasil) em lâminas de vidro Bioslide (CAT. NO 7105-1).

3.4.5 Processamento laboratorial

O material colhido foi processado no laboratório de Patologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os esfregaços foram corados pela técnica do ácido periódico de Schiff (Apêndice 3).

Todos os 663 esfregaços foram avaliados sob a microscopia de luz por meio do microscópio Olympus optical BX41TF (Olympus Optical CO LTD. Laboratory

Equipment – Japan) com as objetivas Nikon E Plan 10x/0.25 ∞/ WD 7.0 e Nikon E Plan 40x/0.65 ∞/0.17 WD 0.65 (Olympus Optical CO LTD. Laboratory Equipment – Japan).

Um avaliador treinado por dois especialistas na área de citopatologia realizou a observação de toda extensão das lâminas em menor aumento (100x) da esquerda para direita no sentido horizontal. Todas as estruturas compatíveis com fungos foram vistas detalhadamente com o auxílio de outra objetiva de maior aumento (400x). Foram considerados esfregaços com resultado PAS positivo aquelas que apresentavam a presença de hifas. As hifas foram caracterizadas da seguinte forma:

- Filamentos lineares divididos ou não por septos (Figura 1).

- A estrutura deveria seguir um padrão de coloração rósea refringente à mudança de foco no microscópio (Figura 1).

- O diâmetro utilizado como parâmetro para identificação seguiu um padrão em torno de 2 a 6 µm. Os filamentos foram diferenciados de acordo com a morfologia de outros microrganismos filamentosos como *Aspergilus* e *Actinomyces* sp.

Após o diagnóstico dos esfregaços PAS positivos, os indivíduos do grupo de dependentes químicos foram subdivididos em outros dois (homens dependentes químicos com esfregaços positivos - grupo caso; e homens dependentes químicos com esfregaço negativo – grupo controle positivo) e comparados ao grupo controle negativo (homens saudáveis), conforme o Quadro 1:

QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA SEGUNDO OS GRUPOS.

Grupo	Número de indivíduos
Grupo caso PAS positivo	27
Grupo controle positivo	27
Grupo controle negativo	27

Cada lâmina de casos e controles foi examinada sob a microscopia de luz em um microscópio binocular BX41TF (Olympus Optical CO LTD. Laboratory Equipment – Japan) em um aumento de 400x. Cinquenta células foram selecionadas aleatoriamente por um pesquisador que não tinha conhecimento dos grupos e as suas imagens foram capturadas por meio da câmera Sony CCD Iris Color (Sony modelo DXC-107ª, Tóquio, Japão). Em seguida, outro avaliador determinou a área celular (ACel), a área nuclear (AN) e a área citoplasmática (ACit) por meio do desenho em torno dos limites nucleares e celulares utilizando o cursor do software IMAGE-PRO PLUS (Media Cybernetics,Silver Spring, MD, USA), versão 4.5.029 para Windows 98 / NR / 2000. Uma fórmula foi criada numa planilha do software Excel for Windows (versão 2007) para se calcular a AN/ACit.

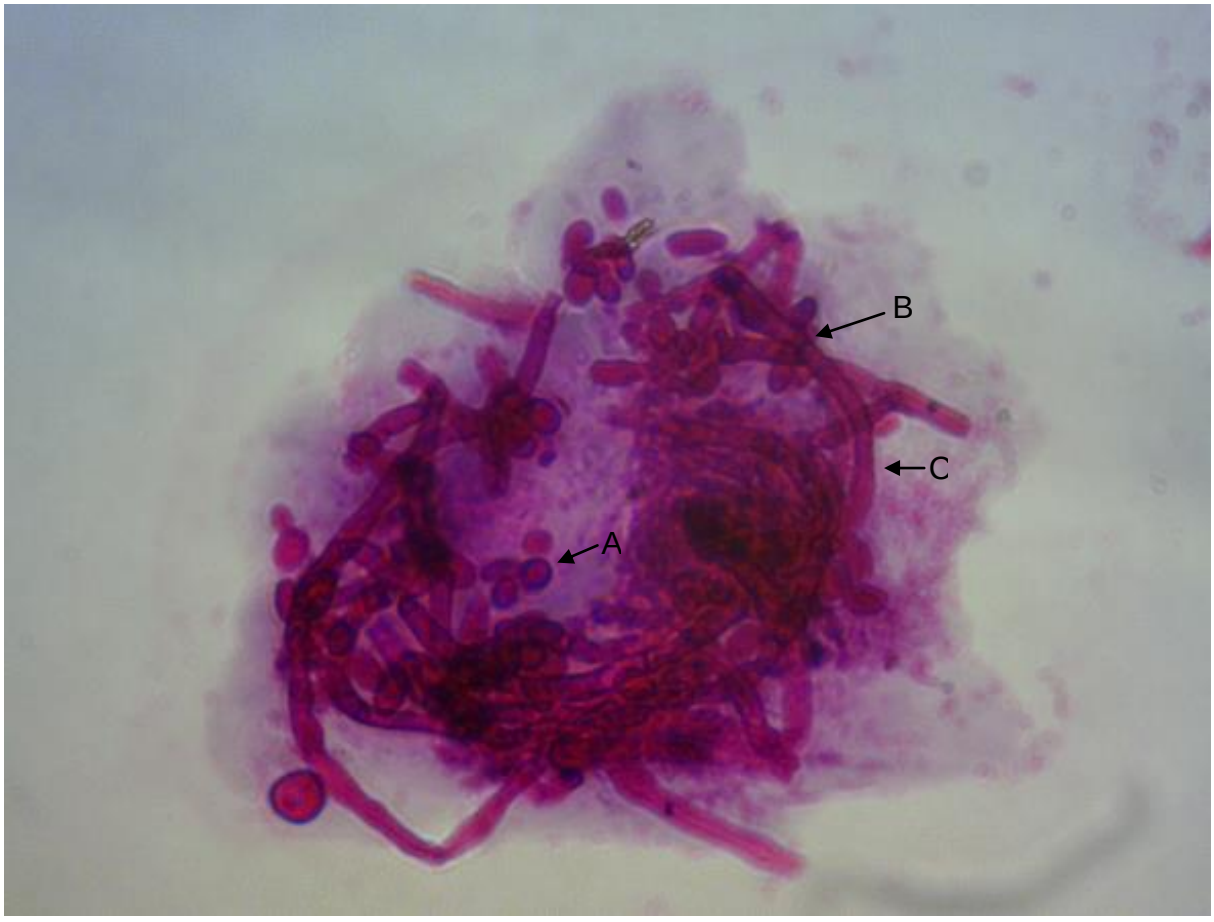


FIGURA 1 – HIFAS E LEVEDURAS DE *CANDIDA* SP. EM ESFREGAÇO ORAL A: LEVEDURAS DE *CANDIDA* SP; B: SEPTO; C: HIFA SEPTADA (PAS 400x).

3.4.6 Análise estatística

Os dados foram tabulados numa planilha do software Excel for Windows (versão 2007) e, em seguida submetidos à análise estatística pelo software SPSS for Windows versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os resultados foram analisados em relação à distribuição de normalidade por meio dos testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tamhane foram usados para avaliar se havia diferença estatística entre os grupos e as variáveis citomorfométricas. A diferença estatística foi considerada significativa se $p<0,05$.

3.5 Resultados

Trezentos e quarenta e cinco indivíduos, brasileiros, do sexo masculino e com idade média de 38,9 anos (18-78) participaram da amostra e foram divididos em três grupos (caso, controle positivo e controle negativo).

A tabela 1 ilustra as características sociodemográficas dos grupos quanto à idade, cor da pele, escolaridade e estado civil. A maioria dos indivíduos era branco, com média de idade de 38.92 anos (18-78). O grupo dos dependentes químicos (caso e controle positivo) era solteiro, com até 8 anos de estudo e cuja ocupação era trabalhador de produção de bens e serviços, seguida por trabalhadores de serviços administrativos. Já os controles negativos saudáveis e sem vícios, tinham uma escolaridade superior a 9 anos de estudo e trabalhavam, em maioria, na área das ciências e das artes.

Na tabela 2 está representada a distribuição da condição bucal, os hábitos comportamentais e as principais comorbidades dos indivíduos dependentes químicos (grupo caso e controle positivo). Nela, pode-se perceber que a maioria dos indivíduos em tratamento para dependência química apresentava uma condição oral ruim e consumiam conjuntamente álcool, tabaco e drogas ilícitas. Em relação ao histórico de comorbidades, poucos indivíduos examinados relataram apresentar doenças sistêmicas relevantes ao estudo. A comorbidade mais relatada foi a doença cardiovascular e/ou hipertensão arterial com 14% dos indivíduos da amostra.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS. CURITIBA/PR. 2015.

Características	Grupo Caso		Grupo controle positivo		Grupo controle negativo	
Idade	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
18-48	22	81	22	81	22	81
49-78	5	19	5	19	5	19
Sem informação	-		-		-	
Total	27	100	27	100	27	100
Cor						
Branco	20	74	20	74	22	81
Não Branco	5	19	7	26	5	19
Sem informação	2	7	-		-	
Total	27	100	27	100	27	100
Escolaridade						
Sem instrução	2	7	3	11	-	
1-8 anos de estudo	21	79	24	89	-	
>9 de estudo	2	7	-		27	100
Sem informação	2	7	-		-	
Total	27	100	27	100	27	100
Estado civil						
Solteiro/Divorciado/Viúvo	22	82	17	63	7	26
Casado	2	7	8	30	20	74
Sem informação	3	11	2	7	-	
Total	27	100	27	100	27	100
Ocupação						
Trabalhadores de serviços administrativos	7	26	-		5	19
Trabalhadores de produção de bens e serviços	17	63	21	78	1	3
Profissionais das ciências e das artes	-		-		21	78
Sem informação	3	11	6	22	-	
Total	27	100	27	100	27	100

Fonte: O autor.

TABELA 2 – PERFIL DOS DEPENDENTES QUÍMICOS (GRUPO CASO/GRUPO CONTROLE POSITIVO) EM RELAÇÃO À SAUDE ORAL, AO PADRÃO DE UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E ÀS COMORBIDADES. CURITIBA/PR. 2015.

Variáveis	N	%
Condição bucal	N	%
Regular	120	38
Boa	46	14
Ruim	144	45
Sem informação	8	3
Total	318	100
Padrão de utilização de substâncias químicas	N	%
Álcool	49	15
Álcool e tabaco	88	28
Álcool, tabaco e drogas ilícitas	124	39
Drogas ilícitas	5	2
Tabaco e drogas ilícitas	33	10
Álcool e drogas ilícitas	18	6
Sem informação	1	0
Total	318	100
Comorbidades	N	%
HIV/AIDS	6	2
Diabetes	14	4
Doenças renais	15	5
Doenças cardio-hipertensivas	46	14
Hepatites	17	5
Nenhuma de interesse	220	69
Total	318	100

Fonte: O autor.

3.5.1 Análise morfológica dos esfregaços

Do total de 318 participantes dependentes químicos, o exame clínico demonstrou que 25 (7,86%) indivíduos apresentavam alterações na região retrocomissural (placas brancas bilateralmente resistentes à raspagem) sugestivas de candidose crônica hiperplásica (Figura 2). Deste total, a avaliação citopatológica revelou que apenas 2 casos (8%) destes tiveram a confirmação PAS positiva para hifas. Quando a amostra total de dependentes químicos foi considerada, a prevalência de candidose crônica hiperplásica diminuiu para 0,62%. Por outro lado, outros 25 (7,86%) indivíduos obtiveram esfregaços PAS positivo para hifas de *Candida* sp sem a manifestação de sinais da infecção (infecção subclínica). Outras formas clínicas de candidose bucal foram observadas durante o exame clínico em 5% da amostra.

Os pacientes em tratamento para dependência química e com o quadro de candidose nas formas clínica e subclínica apresentavam uma média de idade 38 (31-45) e 42,80 (18-73) anos e 100% e 76% eram brancos, respectivamente. A condição bucal e o perfil de consumo de bebidas alcoólicas, tabaco e drogas ilícitas nesses indivíduos encontram-se distribuídos na tabela 3. Da amostra de 318 dependentes químicos avaliados, 19 deles (6%) tiveram PAS positivo para hifas. A saúde bucal dos indivíduos com candidose se apresentou como ruim em 50% (n=1) dos indivíduos com a forma crônica hiperplásica clínica e boa em 72% (n=18) daqueles com diagnóstico da forma subclínica. Vale ressaltar que todos os participantes com a manifestação clínica da candidose crônica hiperplásica eram tabagistas e alcoolistas. Além disso, apenas 50% destes indivíduos faziam uso de drogas ilícitas e a maioria dos pacientes com a infecção subclínica da candidose crônica hiperplásica utilizava álcool (84%), seguido por tabaco (68%) e de drogas ilícitas (60%).

Os esfregaços corados pelo PAS apresentavam conglomerados de filamentos lineares sugestivos de hifas de *Candida* sp com coloração rosa refringente (Figura 3 C-D, E-F), com aproximadamente 2-8 µm de largura septadas (cenocíticas) ou não e, contendo por vezes, estruturas celulares arredondadas brotando a partir da sua estrutura ou próximas a ela, sugestivas de leveduras (Figura 3 G-H). Além disso,

apresentavam estruturas semelhantes à pseudo-hifas ligadas a uma célula-mãe (Figura 3 A-B).

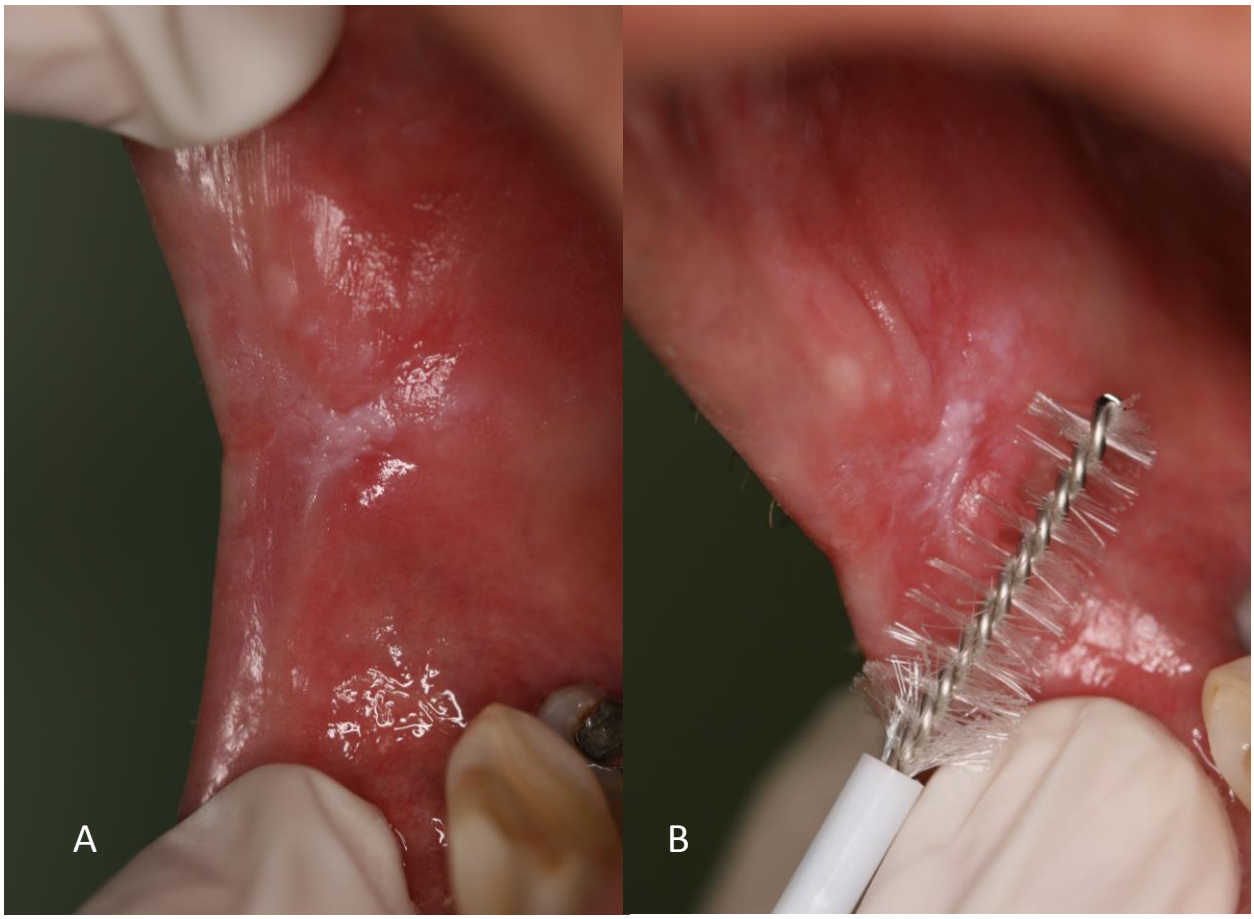


FIGURA 2 – A: PLACA BRANCA RESISTENTE À RASPAGEM EM REGIÃO DE RETROCOMISSURA BUCAL, MEDINDO EM TORNO DE 1,5 CM DE DIÂMETRO; B: ESCOVA CITOLÓGICA POSICIONADA SOBRE A LESÃO DURANTE A COLETA.

TABELA 3 – PERFIL DOS INDIVÍDUOS EM TRATAMENTO PARA DEPENDÊNCIA QUÍMICA COM CANDIDOSE BUCAL NAS FORMAS CLÍNICA E SUBCLÍNICA, EM RELAÇÃO À CONDIÇÃO BUCAL E AO PADRÃO DE UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS. CURITIBA/PR. 2015.

Características	**Indivíduos com diagnóstico de candidose**	
	Clínico	Subclínico
Condição bucal	N %	N %
Regular	1 50	5 20
Boa	-	18 72
Ruim	1 50	2 8
Total	2 100	25 100
Padrão de utilização de substâncias químicas	Clínico	Subclínico
	N %	N %
Álcool	-	4 16
Álcool e tabaco	1 50	6 24
Álcool, tabaco e drogas ilícitas	1 50	10 40
Tabaco e drogas ilícitas	-	4 16
Álcool e drogas ilícitas	-	1 4
Total	2 100	25 100

Fonte: O autor

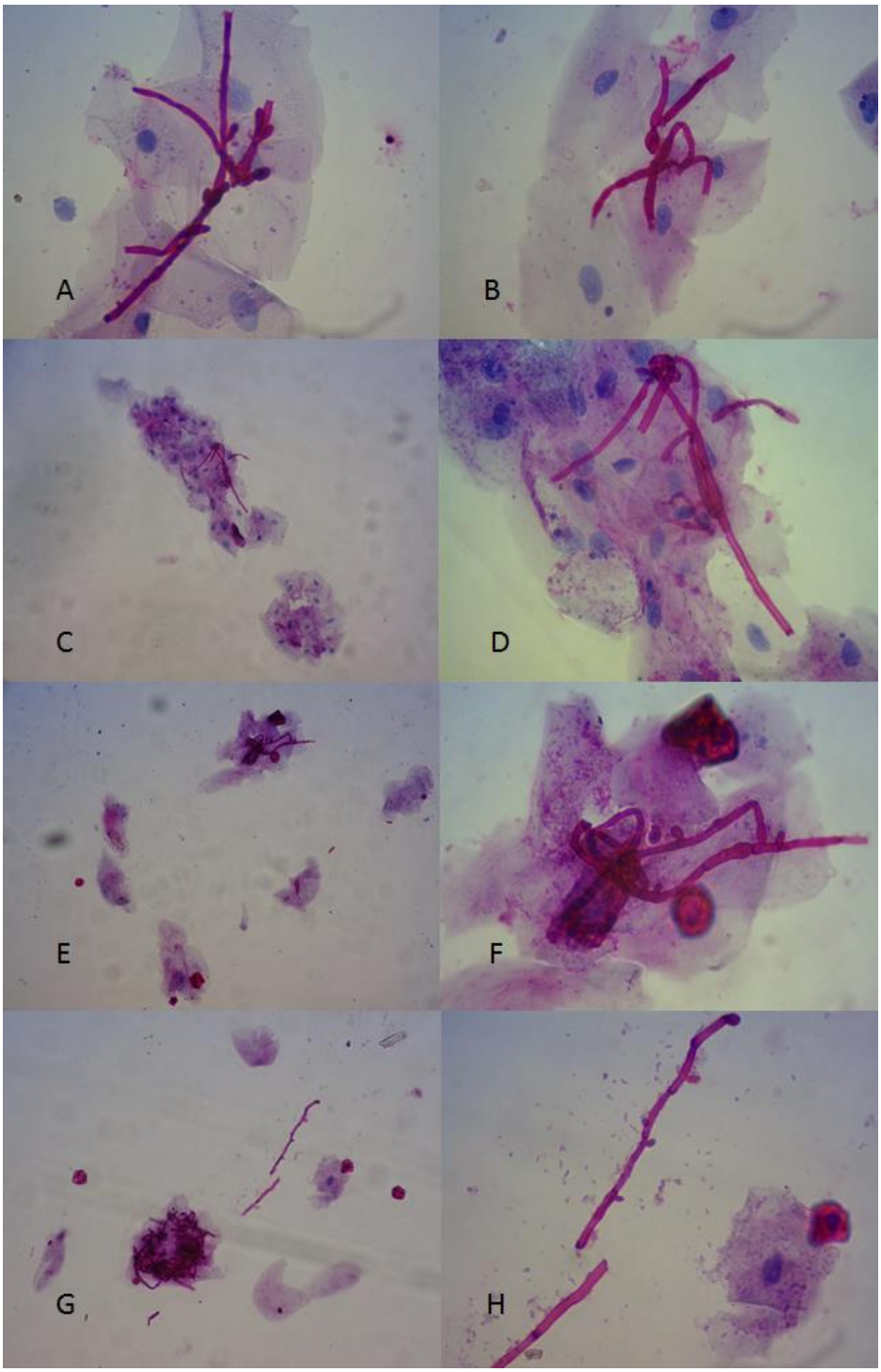


FIGURA 3 – A-B: PSEUDO-HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 400X); C: HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 100X); D: DETALHE HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 400X); E: HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 100X); F: DETALHE HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 400X); G: HIFAS DE *CANDIDA* SP. (PAS 100X); H: DETALHE HIFAS DE *CANDIDA* SP. EXIBINDO ESTRUTURAS SEMELHANTES A LEVEDURAS (PAS 400X).

3.5.2 Análise morfométrica dos esfregaços

A análise morfométrica das células epiteliais da região de retrocomissura bucal foi realizada nos indivíduos com candidose diagnosticada nas formas clínica e subclínica assim como nos controles (positivo e negativo). Os resultados demonstraram que houve diferença estatística significativa para todas as variáveis entre os grupos segundo ANOVA. A tabela 4 apresenta os valores da média e os respectivos desvios-padrão segundo os grupos.

TABELA 4 - MÉDIA DAS ÁREAS CELULARES, NUCLEARES, CITOPLASMÁTICAS E RELAÇÃO ENTRE ÁREA NUCLEAR/ÁREA CITOPLASMÁTICA DE CASOS PAS POSITIVO, CONTROLES POSITIVOS E CONTROLES NEGATIVOS.

Variável	**Grupos**			
	Caso	Controle Positivo	Controle negativo	Valor *P*
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
AN (µm)	91,91 ± 13,26	85,48 ± 11,42	76,53 ± 2,54	0,000*
ACit (µm)	2848,55 ± 552,29	2982,11 ± 388,77	3267,51 ± 534,48	0,008*
ACel (µm)	2940,47 ± 555,36	3067,59 ± 389,59	3344,04 ± 542,62	0,011*
AN/ACit	0,0348 ± 0,0088	0,0303 ± 0,0054	0,0249 ± 0,0052	0,000*

Fonte: O autor

*ANOVA: p<0,05

Legenda: AN = área nuclear; ACit = área citoplasmática; ACel = área da célula; AN/ACit = relação entre área nuclear e área citoplasmática.

Houve uma tendência de aumento da área nuclear (AN) do grupo caso quando comparado aos grupos controle negativo e controle positivo. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos caso e controle negativo (p = 0,001) (Apêndice 4: FIGURA 2). O grupo controle positivo também apresentou uma AN maior do que ao do grupo controle negativo e este resultado foi estatisticamente significativo (p= 0,031).

Para a variável área do citoplasma (ACit) se observou tendência de diminuição nas células do grupo caso quando comparadas aos demais grupos (Apêndice 4: FIGURA 3). Entretanto, esta diminuição foi estatisticamente significativa somente quando se comparou os resultados do grupo caso com o controle negativo (p = 0,017).

Uma tendência de diminuição da área celular (ACel) do grupo caso pode ser observada quando comparado aos grupos controle negativo e controle positivo. No entanto, só houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e o controle negativo (p = 0,024) (Apêndice 4: FIGURA 4).

Houve tendência também de aumento da variável relação núcleo/citoplasma (AN/ACit) do grupo caso quando comparada aos controles (FIGURA 5). No entanto, este aumento foi estatisticamente significativo somente entre o grupo caso com o controle negativo (p < 0,001). Este último também foi menor do que o controle positivo (p = 0,001) (Apêndice 4: FIGURA 5).

3.6 Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que a prevalência desta infecção fúngica na região de retrocomissura bucal é baixa na população avaliada. A prevalência do fungo *Candida sp* na boca da população geral e saudável é variável, apontada na literatura como de 3% até 75%, dependendo do método empregado para detecção e a população estudada (Cowpe, Longmore, & Green, 1985; Padilha, Picciani, Santos, Silva Júnior, & Dias, 2014)..

Alguns estudos têm levantado a prevalência da candidose bucal em diversos países e confirmado que ela é variável (Osmanov, & Denning, 2015; Faini et al., 2015; Badiane, & Ndiaye, 2015; Klimko et a., 2015; Khwakhali, & Denning, 2015).

No entanto, estudos a respeito da prevalência da candidose crônica hiperplásica por si só são escassos, especialmente, na população de dependentes químicos. Até a presente data e nas bases de dados consultadas, não há registro de estudos a respeito da prevalência da candidose crônica hiperplásica na boca de dependentes químicos. Em 2012, López et al. investigaram a prevalência de candidose bucal numa população de 2785 pacientes atendidos em uma universidade Argentina num período de 5 anos. A prevalência da forma clínica crônica hiperplásica foi diagnosticada em 15% de uma amostra de 123 (4,41% de 2785) indivíduos com outras formas de candidose bucal. Quando analisada em relação à amostra total (2.785), este valor caiu para 0,68% (López, et al., 2012). Um valor similar foi encontrado no presente estudo que observou uma prevalência de 0,62% da candidose crônica hiperplásica na população de dependentes químicos.

Vale ressaltar que o estudo desenvolvido por López et al., (2012) avaliou todas as regiões da cavidade bucal, enquanto o presente estudo se restringiu apenas à região de retrocomissura. Também, o trabalho realizado na amostra Argentina não apresentava histórico de dependência química entre os indivíduos investigados e, além disso, por se tratar de um estudo realizado em clínica odontológica, os indivíduos avaliados ao procurarem o atendimento podem ter tendenciado os dados para o aumento. Isto pode tornar o dado de prevalência apresentado pelo presente estudo (0,62%) mais relevante (López, et al., 2012). Segundo a literatura, a candidose crônica

hiperplásica se manifesta sob a forma de uma placa branca, resistente à raspagem em região de dorso e borda de língua, palato e especialmente na retrocomissura bucal (Sitheeque, & Samaranayake, 2003; López, et al., 2012; Lima, & Machado, in Rosa, 2015; Delker, Brown, & Hasin, 2015).

Neste estudo, optou-se por examinar a prevalência desta forma clínica da candidose bucal na região retrocomissural de dependentes químicos do sexo masculino. A literatura tem demonstrado que a dependência química à drogas é mais observada entre os homens e um estudo desenvolvido nos EUA revelou que naquele país o consumo de álcool e drogas ilícitas é mais prevalente entre os indivíduos do sexo masculino, adultos jovens, nativos americanos e da raça negra (Delker, Brown, & Hasin, 2015).

O perfil dos indivíduos dependentes químicos e com diagnóstico clínico confirmado de candidose crônica hiperplásica pela citopatologia no presente estudo foi de um homem branco e com a média de 38 anos de idade. Este achado difere do perfil dos pacientes que usualmente manifestam a candidose crônica hiperplásica. Segundo Arendorf et al. (1983) e López et al. (2012), é uma doença de adultos e que acomete mais os indivíduos acima dos 50 anos de idade (Arendorf, Walker, Kingdom, Roll, & Newcombe, 1983; López, et al., 2012).

Por outro lado, o presente estudo encontrou 25 (7,86%) indivíduos dependentes químicos com esfregaços PAS positivo para hifas de *Candida sp* sem manifestar sinais da infecção (infecção subclínica). A idade média destes pacientes foi de 42,8 (18-73) anos. A menor média de idade encontrada pode ser prevalente devido ao tipo atual de internações em clínicas e hospitais para dependência química, onde se observa muitos jovens envolvidos com o uso crônico de crack, principalmente no Brasil.

Este achado também reforça a hipótese de que a manifestação clínica da candidose crônica hiperplásica acontece acima dos 50 anos de idade. Sendo assim, seria prudente a realização do exame citopatológico na mucosa bucal desses indivíduos com o intuito de identificar de maneira precoce a infecção por Candida sp. e proceder o tratamento com antifúngicos. Outra medida importante seria a orientação dos pacientes para reduzir o consumo de substâncias químicas, especialmente o tabaco.

A associação entre a morfologia de hifas e a candidose bucal ainda é incerta. A virulência de ambas as formas (leveduras e hifas) é conhecida (Odds, 1988) Entretanto, a formação de um tubo germinativo que precede o crescimento de hifas de *Candida albicans* é geralmente associada com o aumento da adesão às células epiteliais e resistência à fagocitose em virtude de suas grandes dimensões físicas (Kimura, & Pearsall, 1980; Odds, 1988). Em virtude desses aspectos, o presente estudo considerou como infecção subclínica a ausência de lesão na retrocomissura bucal e a presença de conglomerados de hifas de *Candida* sp. nos esfregaços citopatológicos.

Alguns autores acreditam que muitos fatores locais e sistêmicos do hospedeiro podem contribuir in vivo para facilitar a conversão da forma comensal do fungo *Candida sp*. para a sua forma patogênica. O principal fator predisponente local diz respeito à integridade da mucosa bucal do hospedeiro (Sitheeque, & Samaranayake, 2003) Neste aspecto não foi possível inferir pelo exame clínico qualquer associação entre o contato da mucosa com os dentes naturais ou artificiais de próteses dentárias. Um fator local bastante discutido é o uso do tabaco. O presente estudo demonstrou que os pacientes com a candidose crônica hiperplásica na sua forma clínica e subclínica eram 100% e 68% tabagistas, respectivamente.

Acredita-se que o hábito de fumar está diretamente ligado ao surgimento da candidose crônica hiperplásica em indivíduos tabagistas e que, esta relação seja atribuída aos seguintes aspectos: a) Incrementos na ceratinização do epitélio e b) Redução de imunoglobulinas salivares contra estes fungos (Sitheeque, & Samaranayake, 2003). Além disso, autores afirmam que a fumaça de cigarros pode causar aumento na capacidade de adesão da célula fúngica in vitro (Kimura, & Pearsall, 1980)

Os autores do presente estudo acreditam que a contração das bochechas durante o ato de sucção seja um fator anatômico que favoreça a ação da fumaça do tabaco exatamente na região de retrocomissura bucal.

Não se pode descartar a ação de outros agentes irritantes sobre a mucosa bucal, tais como: o calor da fumaça, os componentes tóxicos presentes no cigarro e a presença de nitrosaminas. Assim como o hábito de fumar cigarros, outras drogas

(como o crack) podem gerar os mesmos efeitos deletérios na mucosa, favorecendo a presença de *Candida sp* (Woyceichoski, et al., 2008; Antoniazzi, Bortolotto, Backes, Zanatta, & Feldens, 2013).

O uso do álcool também parece contribuir para esta infecção, pois em 100% e 84% dos casos na amostra de indivíduos com candidose clínica e subclínica diagnosticados respectivamente pela citopatologia eram alcoolistas. Estudos clínicos revelam que a prevalência da candidose bucal na população de alcoolistas é em torno de 3,8% (Harris, Warnakulasuriya, Cooper, Peters, & Gelbier, 2004). No entanto, faltam mais estudos específicos a respeito da real prevalência da infecção bucal por *Candida* nesta população, principalmente, na forma clínica crônica hiperplásica.

Alguns autores relacionam a baixa qualidade de higiene e saúde bucal ruim com incrementos na população de fungos do gênero *Candida* (Salaspuro, 2003; Bakri, Hussaini, Holmes, Cannon, & Rich, 2010).

Os indivíduos com dependência química têm, geralmente, sua higiene bucal e corporal negligenciada devido ao uso destas substâncias que se torna sua prioridade. Também a qualidade da alimentação é bastante precária, ingerindo muitos carboidratos em refeições rápidas. A saúde bucal dos indivíduos com presença de hifas no esfregaço citopatológico constituiu-se de metade com saúde bucal ruim e a outra metade com regular entre os indivíduos com candidose crônica hiperplásica clínica. Surpreendentemente, a maioria dos indivíduos tinham saúde bucal boa, seguidos de 20% com saúde regular entre aqueles com diagnóstico positivo para candidose na forma subclínica. As diferenças entre os grupos de dependentes químicos (caso e controle positivo) e controle negativo pode se dar pela grande diferença entre os participantes. O grupo controle negativo, sem dependência, possuía maior escolaridade (em maioria curso superior completo) e melhores condições de saúde bucal como consequência talvez de uma melhor condição de higiene e alimentação associadas à não utilização de substâncias químicas.

O envolvimento dos microrganismos com o desenvolvimento do câncer de boca ainda é incerto. O fumo e a ingestão de álcool são ainda considerados os principais fatores de risco para o câncer bucal nos países ocidentais. No entanto, existem evidências que relacionam o consumo de tabaco e álcool associados à ação do

biofilme de microrganismos no desenvolvimento do câncer (Epstein, & Polsky, 1998; Bakri, Hussaini, Holmes, Cannon, & Rich, 2010; Salaspuro, 2003; Meurman, 2010).

Acredita-se que a infecção por *Candida* possa gerar graus de inflamação e até atipias celulares e teciduais. Loss et al. (2010) demonstraram que as células epiteliais infectadas por *Candida* exibiam uma diminuição da área citoplasmática (AC) em pacientes com candidose bucal em comparação com controles não infectados. Além disso, as células apresentaram um aumento na área nuclear (AN) e um aumento da relação da AN/AC por consequência. No presente estudo observou-se resultados muito semelhantes aos que foram verificados por estes autores.

Alterações nucleares podem indicar muitas alterações celulares patológicas, especialmente, aquelas ligadas a uma atividade proliferativa e neoplásica. Os núcleos podem apresentar uma quantidade de DNA maior quando comparados aos das células normais e, assim, induzir um aumento da sua área quando comparado às células com baixa atividade. Esse fenômeno associado com a redução da área citoplasmática pode ser reconhecido como hiperplasia. A reação de aumento nuclear pode ser o resultado de uma hiperplasia epitelial induzida por candidose. A hiperplasia é uma resposta adaptativa de um tecido ou de um órgão, que acaba por gerar um aumento do número de células que pode resultar no aumento do seu volume. Quando *Candida* começa a invadir as camadas superficiais da mucosa bucal gera uma resposta hiperplásica do epitélio (Cardozo, 1973; Cawson, 1973; Sohnle, & Kirkpatrick, 1978; Cowpe, Longmore, & Green, 1985; Jennings, & MacDonald, 1990).

No estudo apresentado, ficou demonstrado que pode haver tendência para alterações citomorfométrica das células epiteliais bucais de indivíduos com dependência química associada à infecção por *Candida* com relação àqueles sem infecção pelo fungo. Estas alterações encontradas no presente estudo podem sugerir a hipótese de que, apesar do uso crônico de substâncias químicas ser capaz de gerar alterações no epitélio da boca (como se pode perceber com a comparação dos grupos caso e controle negativo), a presença de *Candida sp.* na região de retrocomissura associada ao consumo de substâncias químicas pode gerar alterações ainda maiores na mucosa bucal. Este achado pode ser percebido por meio da comparação

citomorfométrica das células nos esfregaços epiteliais entre casos e controles positivos, porém não foi encontrada associação significativa para esta variável.

Os resultados deste estudo tomados em conjunto, apontam que a infecção por *Candida sp*.na população de dependentes químicos têm tendência de causar um impacto nocivo sobre a mucosa bucal na região de retrocomissura. Isto sugere que medidas de prevenção devem ser tomadas, pois há evidências da atuação negativa dos microrganismos fúngicos relacionados com o processo de desenvolvimento de alterações epiteliais severas e câncer, assim como o uso de substâncias químicas.

3.7 Referências

Antoniazzi, R.P; Bortolotto, F.C; Backes, D.S; Zanatta, F.B; Feldens, C.A. (2013). Effects of Crack Cocaine in oral Conditions: Literature Review. Braz J Periodontol, 23(1),13-18.

Arendorf,T.M; Walker, D.M; Kingdom, R.J; Roll, J.R.S; Newcombe, R.G. (1983). Tobacco smoking and denture wearing in oral candida leukoplakia. Br Dent J, 155(10),340-343.

Badiane, A.S; Ndiaye, D; Denning, D.W. (2015). Burden of fungal infections in Senegal. Mycoses, 58(5), 63-69.

Bakri, M.M; Hussaini, H.M; Holmes, A.R; Cannon, R.D; RICH, A.M. (2010). Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. J Oral Microbiol, 2:5780.

Cannon, R.D; Holmes, A.R; Mason, A.B; Monk, B. (1995). Candida. Oral candida: Clearence, colonization, or candidosis? J Dent Res, 74:1152-1161.

Cardozo, P.L. (1973). Atlas of Clinican Cytology. A contribution to Precise Cytodiagnosis and Cytological Differential Diagnosis with 3,300 Full-Colour Illustrations. Targa, Netherlands.

Cawson, R.A. (1973). Induction of epithelial hyperplasia by Candida albicans. Br J Dermatol, 89(5), 497-503.

Cowpe, J.G; Longmore, R.B; Green, M.W. (1985). Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. J R Soc Med, 78(12), 995-1004.

Delker, E; Brown, Q; Hasin, D. (2015) Epidemiological Studies of Substance Dependence and Abuse in Adults. Curr Behav Neurosci Rep, 2(1), 15-22.

Epstein, J.B; & Polsky, B. (1998). Oropharyngeal candidosis: A review of its clinical spectrum and current therapies. Clin Ther, 20:40-57.

Faini, D; Maokola, W; Furrer, H; Hatz, C; Battegay, M; Tanner, M; Denning, D.W; Letang, E. (2015). Burden of serious fungal infections in Tanzania. Mycoses, 58(5), 70-79.

Fotos, P.G; & Hellstein, J.W. (1992). Candida, candidosis. Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. Dent Clin North Am, 36:857-878.

Harris, C.K; Warnakulasuriya, K.A; Cooper, D.J; Peters, T.J; Gelbier, S. (2004) Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in south London. J Oral Pathol Med, 33(5), 253-259.

Jennings, K.J; MacDonald, D.G. (1990). A quantitative method for assessing changes in rat palatal histology under denture-like appliances. Arch Oral Biol, 35(7), 557-559.

Khwakhali, U.S; & Denning, D.W. (20015). Burden of serious fungal infections in Nepal. Mycoses, 58(5), 45-50.

Kimura, L.H; Pearsall, N.N. (1980). Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun, 28(2), 464-468.

Klimko, N; Kozlova, Y; Khostelidi, S; Shadrivova, O; Borzova, Y; Burygina, E; Vasilieva, N. (2015). Denning DW. The burden of serious fungal diseases in Russia. Mycoses, 58(5):58-62.

Lima, A.A.S; Machado, M.A.N. (2015). Oral chronic hyperplastic candidosis. In: Rosa, EAR. Oral Candidosis. Springer, 59-64.

López, C.B.D; Bulacio, L.A.B.D; Espejo, T.C; Paz, M.A; Pairoba, C.D; Escovich, L. (2012). Prevalence of chronic hyperplasic candidiasis. Its association to risk factors in an oral Medicine Service in Rosario, Argentina. J Mycol Médic, 22(1), 35-41.

Loss, R; Sandrin, R; Franca, B.H.S; Azevedo-Alanis, L.R; Gregio, A.M.T; Machado, M.A.N; Lima, A.A.S. (2010). Cytological analysis of the epithelial cells in patients with oral candidiasis. Mycoses**,** 54(4), 130-135.

Meurman, J.H. (2010). Infectious and dietary risk factors of oral cancer. Oral Oncology, 46:411-413.

Muzika, B.C; & Glick, M. (1995). A review of oral fungal infections and appropriate therapy. J Am Dent Assoc, 126:63-72.

Odds, F.C. (1988). Candida and candidosis. 2 ed. Baillière Tindall.

Osmanov, A; & Denning, D.W. (2015). Burden of serious fungal infections in Ukraine. Mycoses, 58(5), 94-100.

Padilha, C.M.L; Picciani, B.L.S; Santos, B.M; Silva Júnior, A; Dias, E.P. (2014). Comparative analysis of Gram's Method and PAS for the identification of Candida spp. samples from the oral mucosa. J Bras Patol Med Lab, 50(5), 352-358.

Rossie, K; & Guggenheimer, J. (2003). Oral candidosis: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Pract Periodont Aesthet Dent, 9:635-641.

Salaspuro, M.P. (2003). Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. Crit Rev Clin Lab Sci, 40(2), 183-208.

Sitheeque, M.A; & Samaranayake, L.P. (2003). Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). Crit Rev Oral Biol Med, 14(4), 253-67.

Sohnle, P.G; & Kirkpatrick, C.H. (1978). Epidermal proliferation in the defense against experimental cutaneous candidiasis. J Invest Dermatol, 70:130-133.

Woyceichoski, I.E; Arruda, E.P; Resende L.G; Machado, M.A.N; Grégio, A.M; Azevedo, L.R; Lima, A.A. (2008) Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the orall mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 105(6), 745-749.

3.8 Agradecimentos

Os autores agradecem à Associação de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (APTA-Campo Largo-PR/Brasil) e a Associação San Julian Amigos e Colaboradores (Piraquara-PR/Brasil).

3.9 Conflitos de interesses

Este estudo não possui conflito de interesses.

4. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- A prevalência da candidose crônica hiperplásica no terço anterior (retrocomissura bucal) da mucosa jugal de dependentes químicos é menor que 1%;
- A prevalência da candidose subclínica no terço anterior da mucosa jugal (retrocomissura bucal) de dependentes químicos é menor que 8%;
- A candidose crônica hiperplásica clínica ou subclínica associada ao uso de substâncias químicas causou a diminuição da área celular;
- A candidose crônica hiperplásica clínica ou subclínica associada ao uso de substâncias químicas causou diminuição da área citoplasmática e o aumento da área nuclear;
- A candidose crônica hiperplásica clínica ou subclínica associada ao uso de substâncias químicas causou o aumento da relação entre área nuclear e área citoplasmática.

5. REFERÊNCIAS

1. AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**. London, v. 78, p. 455-459, 2002.

2. ANTONIAZZI RP, BORTOLOTTO FC, BACKES DS, ZANATTA FB, FELDENS CA. Effects of Crack Cocaine in Oral Conditions: Literature Review. **Braz J Periodontol**. Brasil, v. 23, n. 1 p. 13-18, 2013.

3. ARENDORF TM, WALKER DM. Oral candidal populations in health and disease. **Br Dent J**. Brasil, v.147, n. 10, p. 267-272, 1979.

4. ARENDORF TM, WALKER DM, KINGDOM RJ, ROLL JRS, NEWCOMBE RG Tobacco smoking and denture wearing in oral candida leukoplakia. **Br Dent J.** England, v. 155, n. 10, p. 340-343, 1983.

5. ARENDORF TM, WALKER DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida* albicans in man. **Arch Oral Biol**. USA, v. 25, n. 1, p. 1-10, 1980.

6. BABONI FB, BARP D, IZIDORO ACSA, SAMARANAYAKE LP, ROSA EAR. Enhancement of *Candida* albicans virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. **Mycopathol**. California, v. 168, n. 5, p. 227-235, 2009.

7. BADIANE AS, NDIAYE D, DENNING DW. Burden of fungal infections in Senegal. **Mycoses**. Germany, v. 58, n. 5, p. 63-69, 2015.

8. BAKRI MM, HUSSAINI HM, HOLMES AR, CANNON RD, RICH AM. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. **J Oral Microbiol**. Sweden, v. 21, n. 2, p. 5780, 2010.

9. BALBO S, MENG L, BLISS, JENSEN JA, HATSUKAMI DK, HECHT SS. Time course of DNA adduct formation in peripheral blood granulocytes and lymphocytes after drinking alcohol. **Mutagenesis**. UK, v. 27, n. 4, p. 485-490, 2012.

10. BAUS J, KUPEK E, PIRES M. Prevalência e fatores de risco relacionados ao uso de drogas entre escolares. **Rev Saúde Pública**. Brasil, v. 36, n. 1, p. 40-46, 2002.

11. BORROMEO GL, MCCULLOUGH ML, READE PC. Quantitation and morphotyping of *Candida* albicans from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. **J Med Vet Mycol**. England, v. 30, n. 6, p. 477-480, 1992.

12. BROOKS PJ, THERUVATHU JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**. USA, v. 35, n. 3, p. 187-193, 2005.

13. BUDTS-JORGENSEN, LT. Antifungal therapy in the oral cavity. **Periodontol 2000**. Denmark, v. 10, n. 1, p. 89-105, 1996.

14. BUNETEL L, BONNAURE-MALLET M. Oral pathoses caused by *Candida* albicans during chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** EUA, v.82, n.2, p.161-165, 1996.

15. CANNON RD, CHAFFIN WL.Oral colonization by *Candida* albicans. **Crit Rev Oral Biol Med**. USA, v. 10, n. 3, p. 359-383, 1999.

16. CANNON RD, HOLMES, AR, MASON, AB, MONK, BC. Oral *Candida*: Clearence, colonization, or candidosis? **J Dent Res**. USA, v. 74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

17. CARDOZO PL. **Atlas of Clinican Cytology. A Contribution to Precise Cytodiagnosis and Cytological Differential Diagnosis with 3,300 Full-Colour Illustrations.** Netherlands: Targa, 1973.

18. CAWSON RA, LEHNER T.Chronic hyperplastic candidiasis–Candidal leukoplakia. **Br J Dermatol**. England, v. 80 n. 1 p. 9-16, 1968.

19. CAWSON RA. Induction of epithelial hyperplasia by candida albicans. **Br J Dermatol.** England, v. 89, n. 5, p. 497-503, 1973.

20. COSTA, SKP; GODOY, GP; GOMES, DQ; PEREIRA, JV; LINS, RUTHINÉIA DAU. Sociodemographic factors and oral health conditions in drug users. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. Brasil, v. 11, n. 1, p. 99-104, 2011.

21. COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. EDS. Cellular pathology ii: adaptations, intracellular accumulations, and cell aging. In: **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: W.B. Saunders Company**.** 31-49, 1999.

22. COWPE JG, LONGMORE RB, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. **J R Soc Med**. England, v. 78, n. 12, p. 995-1004, 1985.

23. DELKER E, BROWN Q, HASIN D. Epidemiological studies of substance dependence and abuse in adults. **Curr Behav Neurosci Rep**. Switzerland, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2015.

24. EPSTEIN JB, KOMIYAMA K, DUNCAN D. Oral tropical steroids and secondary oral candidiasis. **J Oral Med**. USA, v. 41, n. 4, p. 223-227, 1986.

25. EPSTEIN JB, POLSKY B. Oropharyngeal candidosis: A review of its clinical spectrum and current therapies. **Clin Ther**. USA, v. 20, n. 1, p. 40-57, 1998.

26. FAINI D, MAOKOLA W, FURRER H, HATZ C, BATTEGAY M,TANNER M, DENNING DW, LETANG E. Burden of serious fungal infections in Tanzania. **Mycoses**. Germany, v. 58, n. 5, p. 70-79, 2015.

27. FOTOS PG, HELLSTEIN JW. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. **Dent Clin North Am**. USA, v. 36, n. 4, p. 857-878, 1992.

28. GAINZA-CIRAUQUI ML, NIEMINEN MT, NOVAK FRAZER L, AGUIRRE-URIZAR JM, MORAGUES MD, RAUTEMAA R. Production of carcinogenic acetaldehyde by *Candida* albicans from patients with potentially malignant oral mucosal disorders. **J Oral Pathol Med**. Denmark, v. 42, n. 3, p. 243-249, 2013.

29. HARDHAM AR. Cell biology of fungal infection of plants. In: **The Mycota VIII.** Edited by Howard RJ, Gow NA**,** Berlin, Springer-Verlag. p.91-123, 2007.

30. HARRIS CK, WARNAKULASURIYA KA, COOPER DJ, PETERS TJ, GELBIER S. Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in south London. **J Oral Pathol Med**. Denmark, v. 33, n. 5, p. 253-259, 2004.

31. HEDDERWICK S, KAUFFMAN CA. Opportunistic fungal infections: Superficial and systemic candidosis. **Geriatrics.** USA, v. 52 n. 10, p. 50-59, 1997.

32. HONGAL BP, KULKARNI VV, DESHMUKH RS, JOSHI PS, KARANDE PP, SHROFF AS. Prevalence of fungal hyphae in potentially malignant lesions and conditions-does its occurrence play a role in epithelial dysplasia? **J Oral Maxillofac Pathol**. India, v. 19, n. 1, p. 10-17, 2015.

33. HOOPER S J, WILSON M J, MRCPATH ST, JOHN, C. FRCS (OMFS). Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. **Head Neck.** USA, v. 31, n. 9, p. 1228-1239, 2009.

34. HOPPE JE. Treatment of oropharyngeal candidosis and *Candida* diaper dermatitis in neonates and infants: Review and reappraisal. **Pediatric Infects Dis J**. USA, v. 16, n. 9, p. 885-894, 1997.

35. HSIA CC, SUN TT, WANG YY, ANDERSON L, ARMSTRONG D, GOOD RA. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzyl metyl nitrosamine from its precursors by *Candida* albicans. **Proc Natl Acad Sci**. USA, v. 78, n. 3, p. 1878-1881, 1981.

36. HUBE B, NAGLIK J. *Candida* albicans proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**. England, v. 147, n. 8, p. 1997-2005, 2001.

37. INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION (IHME). GBD Compare. Home page: http://vizhub. Healthdata.org/gbd-compare. Acessado em 26/10/2015

38. JENNINGS KJ, MACDONALD DG. A quantitative method for assessing changes in rat palatal histology under denture-like appliances. **Arch Oral Biol**. England, v. 35, n. 7, p. 557-559, 1990.

39. JEPSEN A, WINTHER JE. Mycotic infection in oral leukoplakia. **Acta Odontol Scand**. England, v. 23, p. 239-256, 1965.

40. KAO, AS, BRANDT ME, PRUITT WR, CONN LA, PERKINS BA, STEPHENS DS, BAUGHMAN WS, REINGOLD AL, ROTHROCK GA, PFALLER MA, PINNER RW, HAJJEH RA. The epidemiology of candidemia in two United States cities: Results of a population-based active surveillance. **Clin. Infect. Dis**. USA, v. 29, n. 5, p. 1164-1170, 1999.

41. KHWAKHALI US, DENNING DW. Burden of serious fungal infections in Nepal. **Mycoses.** Germany, v. 58, n. 5, p. 45-50, 2015.

42. KIMURA LH, PEARSALL NN. Relationship between germination of candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect Immun**. USA, v. 28, n. 2, p. 464-468, 1980.

43. KLIMKO N, KOZLOVA Y, KHOSTELIDI S, SHADRIVOVA O, BORZOVA Y, BURYGINA E, VASILIEVA N, DENNING DW. The burden of serious fungal diseases in Russia. **Mycoses**. Germany, v. 58, n. 5, p. 58-62, 2015.

44. KROGH B, HALD B, HOLMSTRUP P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: Catalytic potential of infecting *Candida* albicans and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. **Carcinogenesis**. England, v. 8, n. 10, p. 1543-1548, 1987.

45. LIMA AAS, MACHADO MAN. Oral chronic hyperplastic candidosis. In: **Rosa, EAR. Oral Candidosis**. Springer. Germany, v. 8 p. 59-64, 2015.

46. LÓPEZ CBD, BULACIO LABD, ESPEJO TC, PAZ MA, PAIROBA CD, ESCOVICH L .Prevalence of chronic hyperplasic candidiasis. Its association to risk factors in an Oral Medicine Service in Rosario, Argentina. **J Mycol Médic. France**, v. 22, n. 1, p. 35-41, 2012.

47. LOSS R, SANDRIN R, FRANCA BHS,AZEVEDO-ALANIS LR, GREGIO AMT, MACHADO MAN; LIMA AAS. Cytological analysis of the epithelial cells in patients with oral candidiasis. **Mycoses.** Germany, v.54, n.4 ,p.130-135, 2010.

48. MARTINS R B, GIOVAN E M,VILLALBA H. Lesões cancerizáveis na cavidade oral. **Rev Instituto Cienc Saúde**. Brasil, v. 26, n. 4, p. 467-476, 2008.

49. MARTTILA E, BOWYER P, SANGLARD D, UITTAMO J, KAIHOVAARA P, SALASPURO M, RICHARDSON M, RAUTEMAA R. Fermentative 2-carbon metabolism produces carcinogenic levels of acetaldehyde in *Candida* albicans. **Mol Oral Microbiol**. Denmark, v. 28, n. 4, p. 281-291, 2013.

50. MEURMAN J H. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. **Oral Oncol**. England, v. 46, n. 6, p. 411-413, 2010.

51. MOHANDAS V, BALLAL M. Distribution of *candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **J Glob Infect Dis**. USA, v. 3, n. 1, p. 4-8, 2011.

52. MUZIKA BC, GLICK M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. **J Am Dent Assoc**. England, v. 126, n. 1, p. 63-72, 1995.

53. NEVILLE BW, DAMM, DD, ALLEN, CM, BOUQUOT JE. **Oral and Maxilofacial Pathology**. Philadelphia: Saunders. c.6p.163-169, 1995.

54. NIEMINEN MT, UITTAMO J, SALASPURO M, RAUTEMAA R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida* albicans yeasts in vitro. **Oral Oncol**. England, v. 45, n. 12, p. 245-248, 2009.

55. NINANE JA. Multicentre study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with haematological or oncological malignancies. Multicentre study group. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Germany, v. 13, n. 4, p. 330-337, 1994.

56. ODDS FC. **Candida and candidosis**. 2 ed., Baillière Tindall. London 1988.

57. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: http://www.who.int/eportuguese/publications/pt.1978. Acessado em 18/10/2015.

58. OSMANOV A, DENNING DW. Burden of serious fungal infections in Ukraine. **Mycoses.** Germany, v. 58, n. 5, p. 94-100, 2015.

59. PADILHA CML, PICCIANI BLS, SANTOS BM, SILVA JÚNIOR A, DIAS EP. Comparative analysis of gram's method and PAS for the identification of candida spp. Samples from the oral mucosa. **J Bras Patol Med Lab.** Brasil, v. 50, n. 5, p. 352-358, 2014.

60. PENHALL B. Preventive measures to control further bone loss and soft tissue damage in denture wearing. **Aust Dent J**. Australia, v. 25, n. 6, p. 319-324, 1980.

61. ROED-PETERSEN B, RENSTRUP G, PINDBORG JJ. *Candida* in oral leukoplakias. A histologic and exfoliative cytologic study. **Scand J Dent Res.** Denmark, v. 78, n. 4, p. 323-328, 1970.

62. ROSSIE K, GUGGENHEIMER J. Oral candidosis: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Pract Periodont Aesthet Dent**. USA, v. 9, n. 6, p. 635- 641, 1997.

63. SALASPURO MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. **Crit Rev Clin Lab Sci**. England, v. 40, n. 2, p. 183-208, 2003.

64. SECRETAN B, STRAIF K, BAAN R, GROSSE Y, EL GHISSASSI F, BOUVARD V, BENBRAHIM-TALLAA L, GUHA N, FREEMAN C, GALICHET L, COGLIANO V. A review of human carcinogens – part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. **Lancet Oncol**. England, v. 10, n. 11, p. 1033-1034, 2009.

65. SEITZ HK, STICKEL F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. **Genes Nutr**. Germany, v. 5 n. 2 p. 121-128, 2010.

66. SHAY K, TRUHLAR MR, RENNER RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. **J Am Geriatr Soc**. USA, v. 45, n. 7, p. 863-870, 1997.

67. SHIBATA N, KOBAYASHI, SUZUKI S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan**. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. Japan, v. 88, n. 6, p. 250-265, 2012.

68. SITHEEQUE MA, SAMARANAYAKE LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). Crit Rev Oral Biol Med. USA, v. 14, n.4, p. 253-267, 2003.

69. SOHNLE PG, KIRKPATRICK CH. Epidermal proliferation in the defense against experimental cutaneous candidiasis. **J Invest Dermatol**. Switzerland, v. 70, p .130-133, 1978.

70. SPOLIDORIO LC, MARTINS VRG, NOGUEIRA RD, SPOLIDORIO DMP. Frequência de *Candida* sp. em biópsias de lesões da mucosa oral. **Pesqui Odontol Bras**. Brasil, v. 17, n. 1, p. 89-93, 2003.

71. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **UNODC**. Home page:https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015. Acessado em :26/10/2015

72. WHO. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risck of chemicals to humans. Some N-nitroso compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer, **IARC**. v. 17, p. 365-50, 1978.

73. WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Cancer. Home page: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/. Acessado em: 24/11/2015.

74. WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Management of substance abuse. Home page:http://www.who.int/substance_abuse/terminology/definition1/en/. Acessado em :26/10/2015

75. WILLIAMS DW, BARTIE KL, POTTS AJC, WILSON MJ, FARDY MJ, LEWIS MAO. Strain persistence of invasive *Candida* albicans in chronic hyperplastic candidosis that underwent malignant change. **Gerodontol**. England, v. 18, n. 2, p. 73-78, 2001.

76. WOYCEICHOSKI IE, ARRUDA EP, RESENDE LG, MACHADO MA, GRÉGIO AM, AZEVEDO LR, DE LIMA AA. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. USA, v. 105, n. 6, p. 745-749, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Programa de Pós- Graduação em Odontologia da UFPR)

Nós, Juliana Kern de Moraes e Antonio Adilson Soares de Lima, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você paciente em tratamento da dependência de alcoolismo e/ou drogas no Instituto de pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA) a participar de um estudo intitulado "Aspectos clínicos e citológicos da candidíase crônica hiperplásica em alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

O objetivo desta pesquisa é obter mais informações sobre a ocorrência e fatores que contribuem para o surgimento da Candidíase Hiperplásica Crônica, vulgarmente conhecida como "sapinho" nas pessoas que fizeram uso de bebidas alcoólicas e/ou de drogas ilícitas (maconha, cocaína, crack, etc), assim como diagnosticar possíveis alterações causadas por esta doença na boca, que possam causar câncer. Para isto, será feito um exame na sua boca e depois num laboratório.

a) Caso você participe da pesquisa, será necessário inicialmente realizar um exame na sua boca utilizando espátulas de madeira. Caso você apresente a doença (sapinho), uma escova com cerdas macias e pequenas será usada para colher material na região onde se encontra a alteração na boca. Para tanto, você será examinado no Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA), após assinatura deste termo, para a realização de um exame clínico, colheita de material com escovinha na bochecha. O exame da sua boca, e a coleta do material para exame levará em torno de dez minutos.Seu exame será comparado em laboratório com os exames de pacientes atendidos na clínica odontológica de Semiologia da Universidade Federal do Paraná- UFPR. É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao exame da sua boca que será feito com as mãos do pesquisador com luvas e espátula de madeira, também durante o uso da escova na bochecha.Este tipo de exame clínico, não causa nenhum risco ao participante, apenas desconforto no que diz respeito a ter que abrir a boca e ser manipulada. Você pode ter algum constrangimento também de responder as questões do pesquisador e informar alguns dados de identificação. Porém, tomaremos todas as precauções para você responder as questões em ambiente individual e discreto no hospital, as perguntas serão feitas em apenas cinco minutos.Qualquer alteração que o examinador perceba durante os exames, irá imediatamente informá-lo e você receberá o tratamento para o "sapinho". Se houver a necessidade de verificar se o "sapinho" causou alguma alteração nas células da sua boca, o seu médico no hospital será informado da necessidade da realização de uma biopsia no próprio hospital. Caso o senhor apresente alguma alteração ao realizar os exames, seu médico será avisado.

b) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: a) Com a sua participação no estudo, pode ser identificadas doenças na boca, sendo encaminhado para que a identificação e o tratamento sejam estabelecidos. b) Além disso, os resultados obtidos contribuirão para outros futuros trabalhos na área.

c) Os pesquisadores Juliana Kern de Moraes aluna de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná- UFPR, telefone: (41) 91780418, e-mail: ju_kern@hotmail.com e Antonio Adilson Soares de Lima Orientador do Projeto e Professor-Doutor da Universidade Federal do Paraná-, telefone: 41-33604050, email: aas.lima@ufpr.br, responsáveis por este estudo poderão ser contatados no seguinte endereço: Rua Pref. LothárioMeissner, 632 - Campus Jardim Botânico, Curitiba-PR no período das 8h30 às 11h30 nas quartas-feiras, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

d) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR

Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR –CEP:80060-240

Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

h)As informações relacionadas ao estudo não serão conhecidas por outras pessoas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob a forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.

i)As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu,_____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento no Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA). Eu fui informado que serei atendido sem custos para mim, nas instituições citadas acima ou pela UFPR se eu apresentar algum problema dos relacionados no item D.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____

(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)

Curitiba, ___/___/_____

_____

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE 2 FICHA DE COLETA DE DADOS

ASPECTOS CLÍNICOS E CITOLÓGICOS DA CANDIDÍASE ORAL EM MUCOSA RETROCOMISSURAL DE INDIVÍDUOS TABAGISTAS, ALCOÓLATRAS E/OU USUÁRIOS DE DROGAS ILÍCITAS

Nome:_____ **Data: ___/___/2015**

(IPTA) (SJULIAN)

Idade:_____ anos Raça: (Br)(Am)(Ind) (Pard)(Neg) Estado civil: (S) (C) (V) (D) (outro)

Ocupação: _____ Procedência: (Ctba) (outro) _____

Escolaridade: (Sem instrução) (Fund Incom) (Fund Comp) (Médio Incom) (Médio Comp) (SupIncom) (Supcomp)

Motivo do internamento: (Álcool) (Álcool+Tabaco)(Álcool+Tabaco+Drogas)

(Tabaco+Drogas) (Drogas) (Álcool+Drogas)

Tabagista: Quantidade: ___ cigarros/dia Tempo: _____anos Tipo: (Ind)(Palh) (Ind+pal)
Lado que mais coloca o cigarro na boca:(Direito) (Esquerdo) (Qualquer lado)

Alcoolismo: Quantidade: _____/dia Tempo: _____anos Tipo: _____

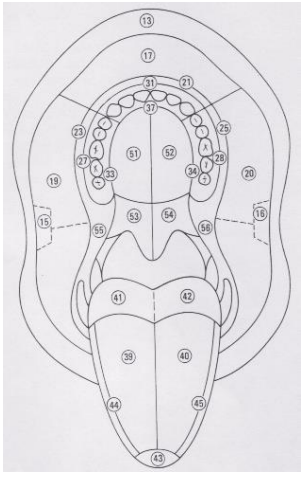
Outras drogas: Quantidade: ___ /dia Tempo: _____anos Tipo: _____

Estado de saúde geral: (TB) (Hepatite) (Sífilis) (Pneumonia) (HIV/AIDS) (Diabetes) (Renal) (Card/Hipert)
Outras: _____

Achados bucais: 1) Cárie ( ) 2) Doença Periodontal ( ) 3) Língua Saburrosa ( ) 4) Candidíase crônica ( ) 5) Raízes Residuais ( ) 6) Ressecamento da Mucosa ( ) 7) Ausências Dentárias ( ) 8) Língua Despapilada ( ) 9) Úlceras ( ) 10) Indutos ( ) 11) Pigmentação Melânica ( ) 12) Candidíase ( ) _____ 13) Condição oral: (Boa) (Regular) (Ruim)

Uso de próteses: (Prótese Total) (Prótese Parc-Remov) (Prótese Parc-Provis) (Prótese Fixa) (Aparelho Ortod)

Exame físico oral:



Comissura labial: (com lesão) (sem lesão)

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Medicamentos: _____

APÊNDICE 3 PROTOCOLO PAS

Imersão das lâminas em álcool absoluto por 24 horas para remoção do fixador citológico.

- Hidratação em álcool 50% por 2 minutos.
- Hidratação em água destilada por 2 minutos.
- Imersão em ácido periódico por 20 minutos.
- Lavagem em água destilada por três vezes.
- Imersão em reativo de Schiff por 30 minutos.
- Imersão em água de torneira por 15 minutos.
- Imersão em água de torneira por 10 minutos.
- Imersão em água de torneira por 10 minutos.
- Imersão em coloração de hematoxilina por 10 minutos.
- Lavagem em água de torneira.
- Imersão em água de torneira por 5 minutos.
- Desidratação em álcool 95% 1minuto.
- Desidratação em álcool absoluto por 3 vezes durante 1 minuto cada.
- Clareamento em xilol três vezes durante 1 minuto cada, em capela para exaustão de gases (Casa Labor Equipamentos Científicos)
- Montagem com lamínula Glasscyto 24x50mm e espessura 0,13-0,16mm (CE IVD) e verniz vitral incolor ACRILEX (Acrilex tintas especiais S.A- SP/Brasil).

APÊNDICE 4 GRÁFICOS DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA

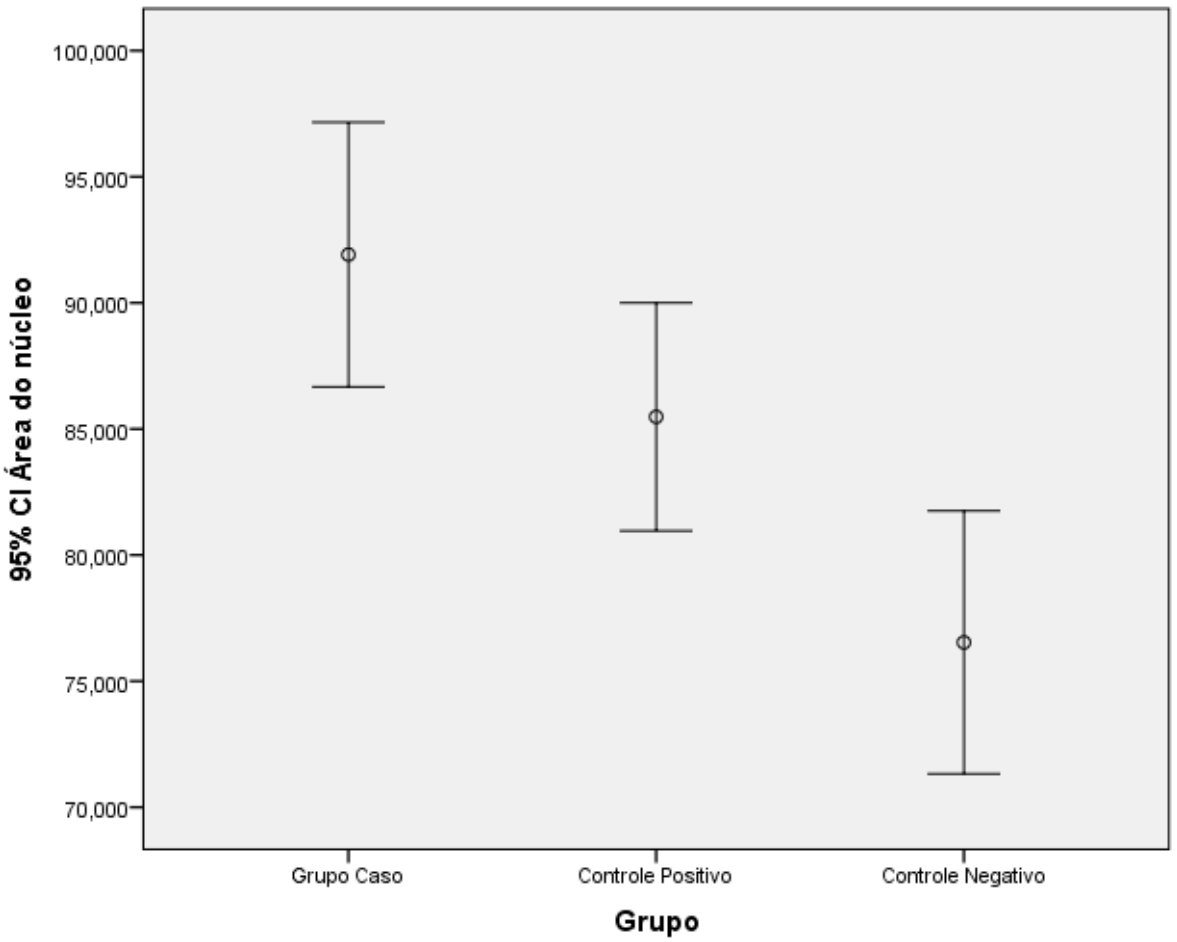


FIGURA 2 – VALORES MÉDIOS E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA ÁREA NUCLEAR SEGUNDO OS GRUPOS CASO, GRUPO CONTROLE POSITIVO E CONTROLES NEGATIVOS.

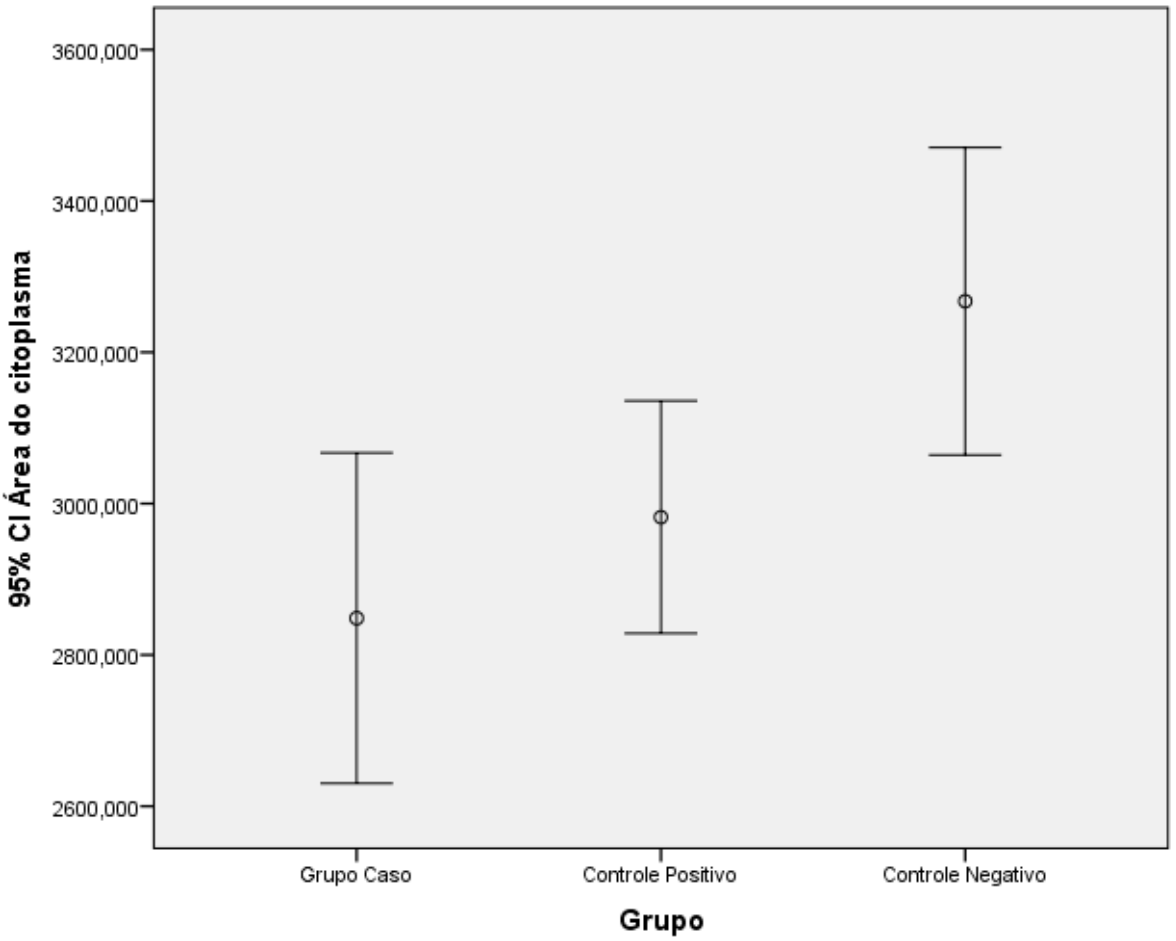


FIGURA 3 – VALORES MÉDIOS E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA ÁREA CITOPLASMÁTICA SEGUNDO OS GRUPOS CASO, GRUPO CONTROLE POSITIVO E CONTROLES NEGATIVOS.

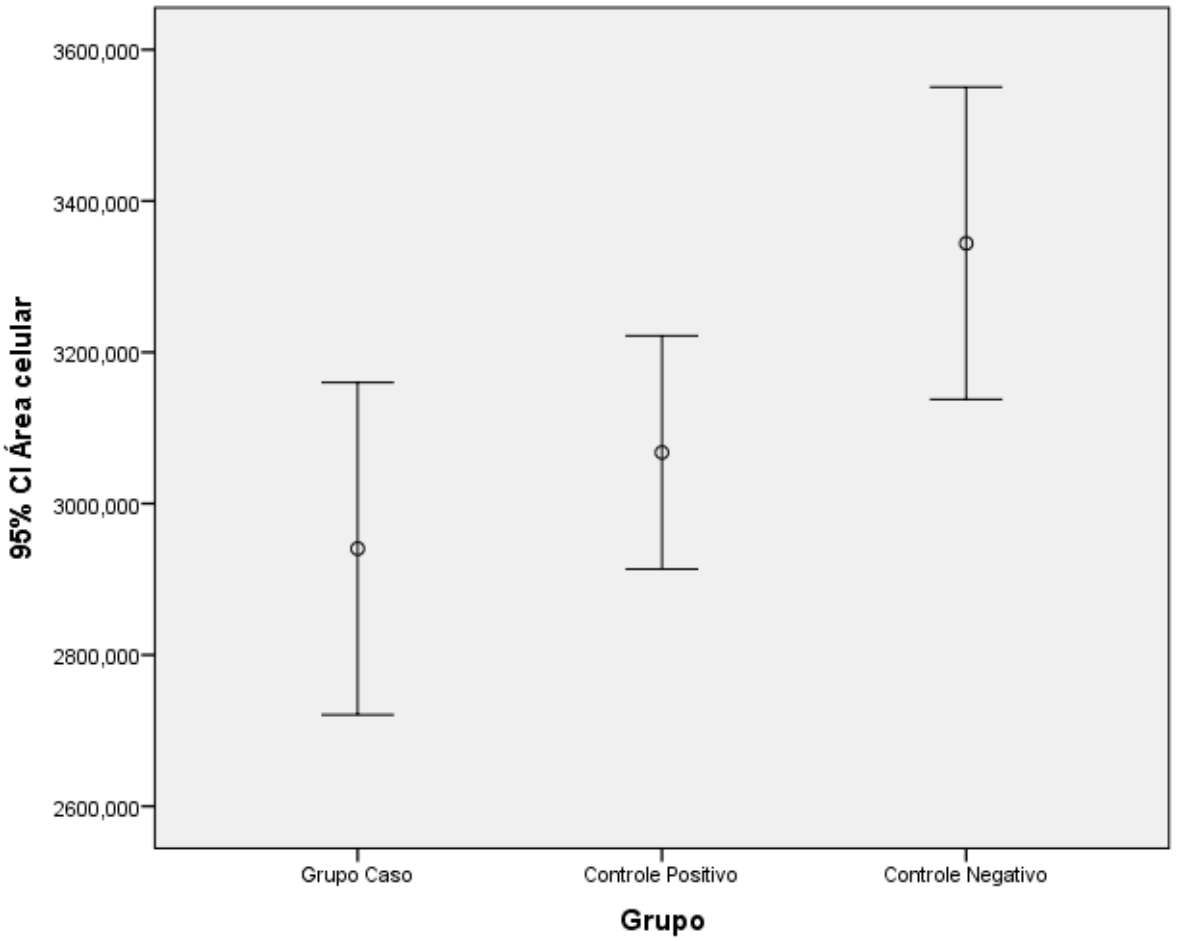


FIGURA 4 – VALORES MÉDIOS E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA ÁREA CELULAR SEGUNDO OS GRUPOS CASO, GRUPO CONTROLE POSITIVO E CONTROLES NEGATIVOS.

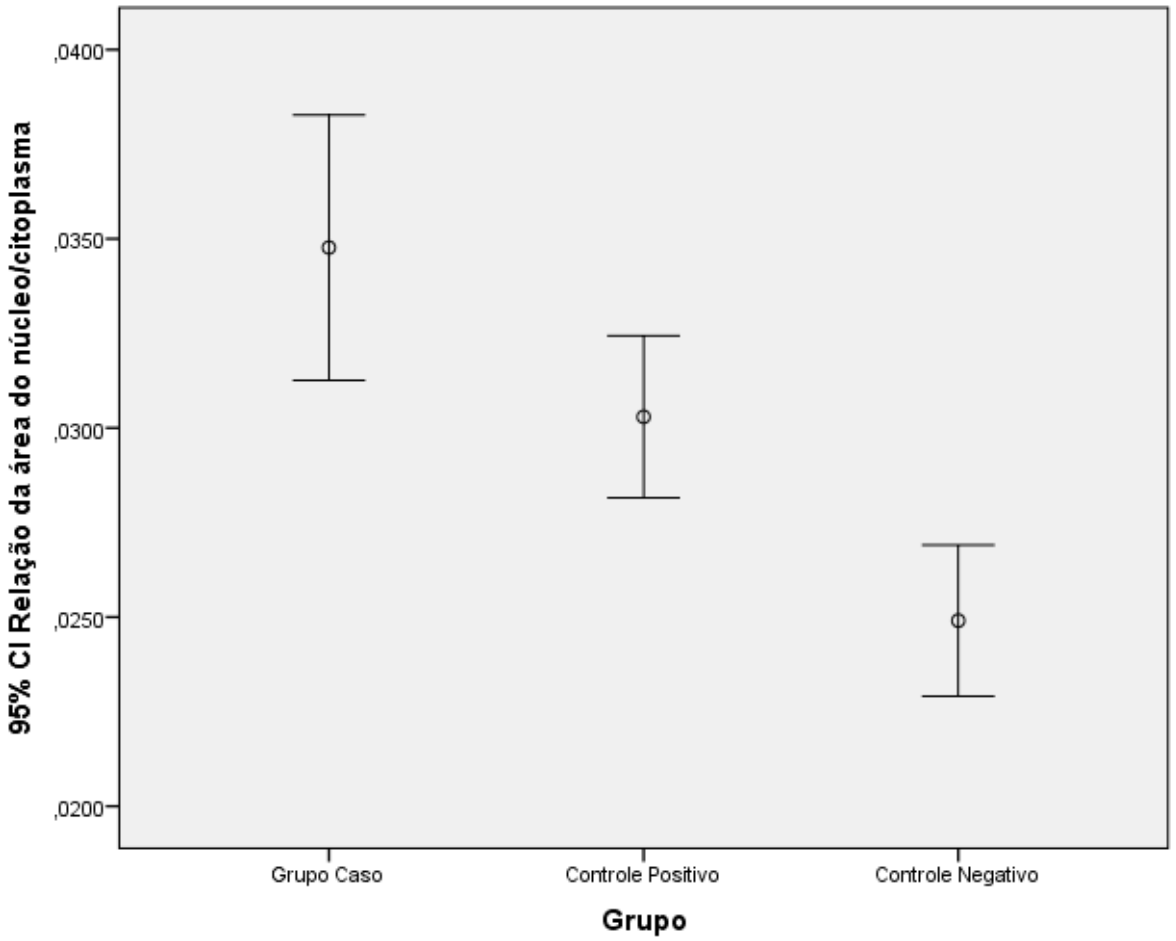


FIGURA 5 – VALORES MÉDIOS E INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA A RELAÇÃO ENTRE A ÁREA NUCLEAR E ÁREA CITOPLASMÁTICA SEGUNDO OS GRUPOS CASO, GRUPO CONTROLE POSITIVO E CONTROLES NEGATIVOS.

ANEXOS

ANEXO 1 **APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aspectos clínicos e citológicos da candidose crônica hiperplásica em alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas

Pesquisador: Juliana Kern de Moraes

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 38749814.0.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.015.112

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Pesquisa vinculada ao programa de Pós Graduação em Odontologia, tendo como pesquisadora responsável Juliana Kern de Moraes e colaborador Antônio Adilson Soares de Lima.

A candidíase ou candidose é uma doença infecciosa causada pelo gênero Cândida, sendo a Candida albicans a espécie mais prevalente. A incidência aumentada da diabetes, a expectativa de vida prolongada, o uso de antibióticos de amplo espectro, a terapia imunossupressiva e o advento da infecção pelo HIV têm resultado num aumento dramático do número de indivíduos imunocomprometidos dentro da população, trazendo uma série de infecções oportunistas, entre elas, a candidose oral. Estudos têm demonstrado relação entre o tabagismo e a candidose oral e como geralmente usuários de drogas ilícitas são tabagistas, há um risco aumentado nessa população ao desenvolvimento da candidose crônica hiperplásica e câncer de boca.

A pesquisa será realizada com homens, alcoólatras, adultos de diversas idades, usuários de drogas ilícitas em tratamento no Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA) no município de Campo-largo-PR. Os participantes serão examinados em busca de manifestações de Candidíase crônica que será diagnosticada por meio de exame clínico e exames citológicos.

A amostra será de conveniência, composta por 240 participantes em tratamento para alcoolismo e

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 1.015.112

uso crônico de drogas ilícitas, internados em um Instituto de Pesquisa e tratamento de dependentes de álcool e drogas ilícitas. Após a realização do exame intrabucal, os primeiros 30 pacientes que tiverem com lesões da candidose crônica hiperplásica serão submetidos a uma citologia esfoliativa. Um grupo de 30 indivíduos adultos, do sexo masculino e com idade pareada ao grupo experimental será usado neste estudo (grupo controle). O grupo controle consistirá de indivíduos que estiverem em tratamento odontológico na clínica de Semiologia da UFPR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Obter mais informações a cerca do perfil epidemiológico e das características citológicas da candidose crônica hiperplásica na população de indivíduos alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas.

Objetivos secundários:

- Determinar a prevalência da candidose crônica hiperplásica em indivíduos alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas;
- Investigar a prevalência da candidose crônica hiperplásica em relação à idade dos indivíduos alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas;
- Estimar a prevalência da candidose crônica hiperplásica em relação aos agentes desencadeadores desta infecção entre os indivíduos alcoólatras e/ou usuários de drogas ilícitas;
- Averiguar a relação da candidose crônica hiperplásica em relação ao tabagismo;
- Investigar o aspecto citológico da candidose crônica hiperplásica;
- Analisar se a área nuclear das células epiteliais da mucosa oral sofre alteração devido à candidose crônica hiperplásica;
- Investigar se a área citoplasmática das células epiteliais da mucosa oral sofre alteração devido à candidose crônica hiperplásica;
- Determinar se a relação área nuclear/área do citoplasma das células epiteliais da mucosa oral sofre alteração devido à candidose crônica hiperplásica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, o exame citológico "não proporciona qualquer tipo de risco ao participante, apenas o desconforto no que diz respeito a ter que se submeter a exames físicos bucais com utilização das mãos do pesquisador e espátulas de madeira. Para minimização destes riscos, o participante será examinado em sala especial, individualmente, no próprio Instituto onde segue seu tratamento para alcoolismo e drogas ilícitas". Também o participante também pode

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 1.015.112

sentir-se constrangido com as perguntas do examinador e até mesmo no exame, para minimizar tais desconfortos, ele será avaliado em sala reservada, disponibilizada pelo instituto, proporcionando anonimato ao participante.
Os benefícios esperados elencados pelos pesquisadores incluem a possibilidade de diagnóstico precoce de lesões cancerizáveis, bem como seu tratamento, além da contribuição com futuros estudos na área. Os participantes que apresentarem lesões de candidíase serão tratados devidamente com antifúngicos e será informado ao médico dói instituto sobre a necessidade de continuidade do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Todos os termos foram apresentados e estão adequados.Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

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

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

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

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** comitica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 **AUTHOR GUIDELINES**

Periódico a ser submetido:
Archives of Oral Biology (ISSN 0003-9969)
IMPACT FACTOR: 1735 Qualis A2

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY
A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

DESCRIPTION

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of craniofacial development and disease, including:
Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Cellular microbiology Embryology Syndromology Forensic dentistry The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology

• pathogenesis
• microbiology
• biology of dental caries and periodontal disease
• forensic dentistry
• neuroscience
• comparative anatomy
• paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical
Journals

Types of Contribution
Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Page charges
This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN
Ethics in publishing
For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see https://www.elsevier.com/publishingethics and https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics.

Human and animal rights
If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, http://www.icmje.org.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or

be perceived to influence, their work. See also https://www.elsevier.com/conflictsofinterest. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see https://www.elsevier.com/sharingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck https://www.elsevier.com/editors/plagdetect.

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual

contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see https://www.elsevier.com/copyright). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult https://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult https://www.elsevier.com/permissions.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see https://www.elsevier.com/OAauthoragreement). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see https://www.elsevier.com/openaccesslicenses).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see https://www.elsevier.com/copyright.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit https://www.elsevier.com/fundingbodies.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

• Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

• An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

• Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (https://www.elsevier.com/access).

• No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about
Elsevier's pricing policy: http://www.elsevier.com/openaccesspricing.

Green open access
Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (http://elsevier.com/greenopenaccess). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)
Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/languageediting/) or visit our customer support site (http://support.elsevier.com) for more information.

Submission
Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the

Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: https://www.elsevier.com/guidepublication). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

• Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

• Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer

should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum
85 characters, including spaces, per bullet point). See https://www.elsevier.com/highlights for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be

sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE- cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. 'S. aureus' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30:

225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g.'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus Staphylococcus'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g.'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast,

or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
• Embed the used fonts if the application provides that option.
• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Provide captions to illustrations separately.
• Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
• Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
https://www.elsevier.com/artworkinstructions.
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of

1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of
500 dpi.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services
Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/illustrationservices) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical- style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables
Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Reference management software
Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (http://citationstyles.org), such as Mendeley (http://www.mendeley.com/features/reference-manager) and Zotero (https://www.zotero.org/), as well as EndNote (http://endnote.com/downloads/styles). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug- ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style
Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067 or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD
20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.
List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.
Examples:
Reference to a journal publication:
Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.
Journal of Scientific Communications, 163, 51–59. Reference to a book:
Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). The elements of style. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter
4).
Reference to a chapter in an edited book:
Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), Introduction to the electronic age (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

AudioSlides
The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at https://www.elsevier.com/audioslides. Authors of this journal

will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

• E-mail address

• Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

• Keywords

• All figure captions

• All tables (including title, description, footnotes) Further considerations

• Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

• References are in the correct format for this journal

• All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

• Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the

Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

• Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at http://support.elsevier.com.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal

medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets).

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

• Use of parametric tests when non-parametric tests are required

• Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.

• Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.

• Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.

• Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")

• N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).

• Stating that P=0.000 (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.