

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA BERROCAL SALAZAR

ESTADO OXIDATIVO SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

CRISTINA BERROCAL SALAZAR

ESTADO OXIDATIVO SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes

Salazar, Cristina Berrocal
Estado oxidativo salivar em indivíduos com anemia de Fanconi / Cristina Berrocal Salazar – Curitiba,
2016.
115 f. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. José Miguel Amenábar Céspedes
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Antioxidantes. 2. Oxidantes. 3. Estresse oxidativo. 4. Saliva. 5. Anemia de Fanconi. I. Céspedes,
José Miguel Amenábar. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.6



Ata da sessão de defesa de Dissertação de Mestrado de **Cristina Berrocal Salazar** realizada no dia quinze de abril de dois mil e dezesseis. Às quatorze horas do dia quinze do mês de abril do ano de dois mil e dezesseis, nas dependências do Setor de Ciências da Saúde-sede Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, foi instalada a banca de Defesa de Dissertação de mestrado para julgamento do trabalho **Estado oxidativo salivar em indivíduos com anemia de Fanconi** desenvolvido pela Cirurgiã Dentista Cristina Berrocal Salazar, matriculada no Programa de Pós Graduação em Odontologia. O Professor Doutor José Miguel Amenábar Céspedes orientador e presidente da banca examinadora abriu a sessão, apresentando os demais examinadores, o Professor Doutor Cassius Carvalho Torres-Pereira (UFPR), a Professora Doutora Lia Sumie Nakao (UFPR), Professor Doutor Sebastián Fontana (UNC). Após a apresentação da candidata, os membros da banca examinadora teceram seus comentários sobre o trabalho e procederam a arguição. A candidata respondeu a todos e, de ambas as partes, as atividades transcorreram dentro do tempo previsto. Terminada a arguição o senhor presidente suspendeu a sessão por dez minutos a fim de que cada examinador expressasse seu julgamento e a banca elaborasse seu parecer. Reaberta a sessão, o senhor Presidente apresentou os resultados do julgamento da banca: Professor Doutor José Miguel Amenábar Céspedes, *aprovada*; Professor Doutor Cassius Carvalho Torres-Pereira, *aprovada*; Professora Doutora Lia Sumie Nakao, *aprovada*; Professor Doutor Sebastián Fontana, *aprovada*. A candidata deverá realizar as correções e sugestões apresentadas pela banca e entregar a versão final da dissertação impressa de acordo com as normas do Programa de Pós Graduação em Odontologia no final de trinta dias. Diante do resultado declarou a candidata **APROVADA**. Para finalizar o senhor presidente agradeceu a presença dos professores examinadores, congratulou-se com a candidata e encerrou a sessão. Nada mais havendo a tratar, eu, Ana Maristela Rodacki, elaborei a presente ata que vai assinada por mim e pelos membros da banca.

Curitiba, 15 de abril de 2016.

Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes

Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

Prof. Dr. Sebastián Fontana

Ana Maristela Rodacki
Secretária PPGODONTOLOGIA

**“A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA IDEIA JAMAIS VOLTARÁ AO SEU
TAMANHO ORIGINAL”**

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por serem um pilar maravilhoso na minha jornada, fonte de inspiração e minha maior fonte de amor.

Aos meus irmãos e minhas cunhadas por tanto amor sempre, e por palavras de motivação constantes.

A minha maravilhosa família; a Berrocal e a Salazar, meus avós, meus tios, minhas tias e primos, porque sem dúvida nenhuma, todo esse amor fez de mim a pessoa que eu sou.

Aos meus tios Ana e Oscar por sempre serem a minha maior inspiração na vida acadêmica.

As minhas amigas irmãs, Cami e Marta por todo o carinho e suporte recebido, por sua incondicional ajuda, por sua acolhida nesse novo país como se fosse o meu, por seu abraço oportuno e por serem minha família no Brasil mesmo estando longe de casa. Vocês são e serão sempre um lindo presente de Deus, e não tenho como agradecer isto tão lindo, que é nossa amizade.

A Fabri por sua maravilhosa amizade sem fim e cheia de momentos inesquecíveis, obrigada por cada segundo investido na minha vida, te adoro.

A Allana, Clau, Jessica, Ana Carolina Jardim, Aline Lemes, Aline Sebastiane, Gaby, por todo carinho, ajuda, e abraços.

A Rafa, por toda ajuda durante esse grande reto, nos momentos de maior dificuldade.

A Mi e Gu, por tanto carinho, e a todos os meus amigos do circo, por toda a magia compartilhada e por amenizar minhas noites com as melhores experiências.

Ao meu orientador, o Professor José Miguel, pela confiança e por tanto aprendizado ao seu lado.

A Professora Ângela, por essa amizade tão linda que desenvolvemos, por toda a confiança, por tantos trabalhos desenvolvidos, por ser uma mais nessa minha paixão pela Radiologia, e nunca deixarei de agradecer por tanto.

A Ana Maristela, por toda ajuda de sempre, nada teria sido como foi sem você.

A Amanda e Bruna por essa linda amizade, por toda a confiança e pela parceria, foi demais trabalhar com vocês, e sei que serão um sucesso nas suas vidas profissionais, desde já parabéns.

A Geisy, Bruna Boska, Carol Marzur, Aline Scotine, Josi, Juliana, Professor Cassius, Professor Cleto, por serem parte dessa equipe no laboratório e na Estomatologia, na qual aprendi muito.

A Hilda e Kati por serem tão amáveis e carinhosas comigo, e por toda parceria.

A Professora Gina Murillo, porque foi a criadora desse lindo sonho, por ser uma inspiração sempre, e porque nunca deixou de acreditar em mim e no meu potencial.

Aos meus amigos e amigas da Costa Rica, porque sempre estão no meu coração e pelo apoio.

Aos meus colegas do mestrado, que proporcionaram uma convivência sadia, além de aprendizado contínuo durante esses anos.

A todos os pacientes que cada um à sua maneira, contribuíram para o meu crescimento científico e humano, e porque nada disto teria sentido de ser feito.

A Capes pela bolsa de mestrado a mim concedida, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Finalmente a Deus por tanto amor que derrama constantemente na minha vida.

RESUMO

O estresse oxidativo (EO) é considerado um fator na etiopatogênese da anemia de Fanconi (AF) devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio nas células destes indivíduos. Por outro lado, o EO também é responsável por produzir alterações genéticas que promovem a iniciação e a proliferação de neoplasias malignas. Por causa das mutações genéticas que a AF apresenta, as células não possuem a capacidade de reparação do DNA. Portanto um aumento no EO pode provocar aberrações cromossômicas e mutações, aumentando assim a chance do aparecimento de lesões malignas, entre as quais podemos citar o carcinoma espinocelular (CEC). A saliva tem um papel importante no equilíbrio do estado oxidativo intrabucal. No entanto, o aumento na quantidade de radicais livres pode favorecer o aparecimento do CEC. Considerando as evidências mencionadas, o objetivo deste trabalho foi determinar o estado oxidativo da saliva de indivíduos com AF. Foi coletada saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com AF e de indivíduos saudáveis (controles). Em ambos os grupos foram analisadas as seguintes variáveis: estado oxidante total (EOT), capacidade antioxidante total (CAT), vitamina C, vitamina E. Todas as análises foram realizadas laboratorialmente por espectrofotometria e a comparação estatística através dos testes t e Mann Whitney, escolhendo $p < 0,05$ para rejeição da hipótese nula. Os resultados mostraram que a CAT teve uma média estatisticamente maior em ambas as salivas analisadas, assim como as concentrações de vitamina C. Dentro dos limites do estudo pode-se concluir que os indivíduos com AF tem o estado oxidativo alterado.

Palavras-chave: Antioxidantes. Oxidantes. Estresse oxidativo. Saliva. Anemia de Fanconi.

ABSTRACT

Oxidative stress (OE) is considered a factor on the etiopathogenesis of Fanconi anemia (FA) due to its excessive production of reactive oxygen species on their cells. On the other hand, OE is also responsible for producing genetic alterations that promote the initiation and proliferation of malignant neoplasms. As in individuals with FA, cells do not have an efficient DNA repair capacity; the increase in OE can cause chromosomal aberrations and mutations, thus increasing the appearance chance of malignant lesions, among them, squamous cell carcinoma (SCC). Saliva has an important role in intraoral oxidative balance; however, the increase in the amount of salivary free radicals may promote the onset of SCC. Considering this, the aim of this study is to determine the salivary oxidative status of individuals with FA. Stimulated saliva was collected from patients with FA and healthy individuals (controls). In both groups the following variables were analyzed: Total oxidant status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), vitamin C, vitamin E. All laboratory assessments were performed by spectrophotometry. T test and Mann Whitney were used choosing $p < 0.05$ for statistical differences. The results showed that, TAC was statistically higher in both of analyzed saliva, and so were vitamin C concentrations. Within the study limits it can be concluded that, individuals with FA have an altered oxidative status.

Keywords: Antioxidants. Oxidants. Oxidative stress. Saliva. Fanconi anemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema resumo das alterações que o estresse oxidativo pode produzir nos diferentes tecidos.....	26
Figura 2. Esquema resumo das doenças estudadas com relação ao estresse oxidativo.....	27
Figura 3. Mecanismo de produção de EO e alterações fenotípicas na anemia de Fanconi (Modificado de Li et al., 2014)	34
Figura 4. Defeitos provocados por excesso de ERO na anemia de Fanconi a nível mitocondrial. (Modificado de Kumari et al 2012).....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Os mais importantes e conhecidos oxidantes.....	16
Quadro 2. O papel do estresse oxidativo nas doenças do organismo.....	28
Quadro 3. Frequência de anomalias em AF	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas da amostra.....	64
Tabela 2. Parâmetros de saliva estimulada.....	64
Tabela 3. Parâmetros de saliva não estimulada	65
Tabela 4. Parâmetros de saliva estimulada divididos por idade.....	65
Tabela 5. Parâmetros de saliva estimulada divididos por sexo e idade.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. (a) Média da concentração do EOT e CAT medidas em saliva estimulada..... 86

Gráfico 1. (b) Média da concentração de vitamina E medidas em saliva estimulada..... 86

Gráfico 1. (c) Média da concentração de vitamina C medidas em saliva estimulada..... 87

Gráfico 2. (a) Média da concentração de EOT e CAT medidas em saliva não estimulada.....87

Gráfico 2. (b) Média da concentração de vitamina E medidas em saliva não estimulada.....88

Gráfico 2. (c) Média da concentração de vitamina C medidas em saliva não estimulada.....88

LISTA DE SIGLAS

-SH	-	Grupos sulfidrilas
-SS	-	Pontes de dissulfetos
¹ O ₂	-	Oxigênio singleto
AF	-	Anemia de Fanconi
AOX	-	Antioxidantes
ATP	-	Tri-fosfato de adenosina
CAT	-	Capacidade antioxidante total
CEC	-	Carcinoma espinocelular
DEB	-	Diepoxibutano
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
e-	-	Elétron
EOT	-	Estado oxidante total
ER	-	Espécies Reativas
ERN	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO(s)	-	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
GSH	-	Glutaciona reduzida
GSH-Px	-	Glutaciona peroxidase
GSH-Rd	-	Glutaciona redutase
GSSG	-	Glutaciona oxidada
GST	-	Glutaciona transferase
IEO	-	Índice de estresse oxidativo
MDA	-	Malondialdeído
MMC	-	Mitomicina C
NADPH	-	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato

Nrf2	-	Fator de transcrição nuclear erythroid 2-related factor
OSCN ⁻	-	Tiocianato
PBS	-	Tampão fosfato salino
RE	-	Reticulo endoplasmático
RL	-	Radicais livres
SCN ⁻	-	Tiocianeto
SOD	-	Superóxido dismutase
SOD 1	-	Superóxido dismutase do citosol
SOD 2	-	Superóxido dismutase mitocondrial
TCA	-	Acido tricloroacético
TCTH	-	Transplante de células tronco hematopoiéticas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	ESPÉCIES REATIVAS	16
1.2	ANTIOXIDANTES.....	19
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO	24
1.3.1	ESTRESSE OXIDATIVO: CAUSA OU CONSEQUÊNCIA?.....	28
1.4	ANEMIA DE FANCONI	29
1.4.1	FRAGILIDADE CROMOSÔMICA, DANO NO REPARO DO DNA E SUSCETIBILIDADE A TUMORES SÓLIDOS.....	30
1.4.2	FENOTIPO	31
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM AF.....	33
1.6	ESTUDOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM SALIVA	36
2	OBJETIVO GERAL.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	40
3.2	DELINEAMENTO DA PESQUISA	40
3.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	40
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	40
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	40
3.6	COLETA DE DADOS.....	41
3.7	COLETA DE SALIVA E FLUXO SALIVAR.....	41
3.8	ANÁLISES BIOQUÍMICA DA SALIVA.....	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4	CAPITULO 1.....	44
	CONFLITO DE INTERESSE	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICES.....	80
	TABELAS.....	83
	GRÁFICOS	86
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES REATIVAS

As espécies reativas abrangem em especial as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), e os radicais livres (RL) (Quadro 1) (HALLIWELL et al., 2007). Cabe ressaltar que nem todas estas espécies reativas são radicais livres (STOREY et al., 2004).

As espécies reativas podem ser geradas de diversas maneiras, tais como por radiação ionizante, por meio de reações químicas, enzimáticas, por processos redox catalisados por íons de metais de transição livres, e íons metálicos ligados a enzimas. Desta maneira, fontes celulares importantes de formação de espécies reativas são: (A) a formação de espécies reativas de oxigênio por redução incompleta do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial; e (B) os sistemas de defesa do hospedeiro, o que inclui a "explosão oxidativa" mediada por NADPH-oxidase, produzindo radical superóxido e mieloperoxidase, que conduz à formação de ácido hipocloroso nos fagócitos (STOREY et al., 2004).

Dentre as espécies reativas outra molécula importante é o óxido nítrico, que é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases. Elas transformam a L-arginina em NO[•] e L-citrulina. O NO[•] é pouco reativo por si só, mas na presença de oxigênio ou de superóxido, NO[•] é convertido em espécies mais reativas, tais como o dióxido de nitrogênio e peroxinitrito respectivamente (STOREY et al., 2004).

O Quadro 1 mostra os mais importantes e conhecidas espécies reativas divididas em RL e não RL.

Quadro 1. Os mais importantes e conhecidos oxidantes	
Radicais livres	Não radicais livres
Superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrogenio H_2O_2
Hidroperoxila HOO^{\bullet}	Alquil hidroperóxido LOOH
Peroxila LOO^{\bullet}	Oxigênio singlete $^1\text{O}_2$
Alcolxia LO^{\bullet}	Ozônio O_3
Hidroxila $^{\bullet}\text{OH}$	Ácido hipocloroso HOCl
Óxido nítrico $^{\bullet}\text{NO}$	Peróxinitrito ONOO^-
Dióxido nitroso $^{\bullet}\text{NO}_2$	

Tomado de Halliwell e Cols, 2007.

As espécies reativas não radicais livres, são espécies químicas de alta reatividade (menor que as dos radicais livres), que apresentam todos seus elétrons emparelhados. Quando apresentam como átomo central o oxigênio são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), e de espécies reativas nitrogênio (ERN) quando tem como o átomo central o nitrogênio.

As diferenças entre as ERO/N e os RL são: a reatividade entre elas, a meia vida de cada molécula e as concentrações em que elas se apresentam nos diferentes compartimentos celulares e tecidos (WINTERBOURN, 2008).

As espécies não radicais livres, podem evoluir para radicais livres, tornando-se em moléculas mais reativas que podem danificar biomoléculas por oxidação. O risco destas reações é que os produtos de oxidação formados são os próprios radicais livres, que em muitos casos, podem propagar-se causando danos extensivos (STOREY et al., 2004).

O Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o $\cdot OH$ (o RL mais reativo). Além disso o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas pelas aquaporinas reagindo com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{3+} . Portanto, pode ser altamente tóxico para as células uma vez que pode estar presente em qualquer compartimento da célula; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (FERREIRA et al, 1997; REUTER et al., 2010).

Na cavidade bucal, bebidas como chás e principalmente café instantâneo são fonte comum de H_2O_2 , e possui a capacidade de rapidamente se difundir pelas células da cavidade bucal e do trato gastrointestinal pelos transportadores de água. No entanto, possui algumas ações benéficas. Na boca é bactericida, em presença de peroxidase salivar, sendo que o H_2O_2 produzido pelas bactérias, é utilizado pelas peroxidases salivares para oxidar o tiocianeto (SCN^-) em tiocianato ($OSCN^-$), um produto tóxico que combaterá certas bactérias (HALLIWELL et al., 2000).

O H_2O_2 também atua no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, por meio da produção de ácidos hipoclorosos nos fagócitos (HALLIWELL et al., 2000). Além disso, devido a sua composição química e alta concentração no meio intracelular, possui atividade como sinalizador interagindo com os grupos tiol das enzimas (RECZEK et al., 2015).

O oxigênio singleto (1O_2) é outra conhecida espécie reativa não RL, e é a forma

excitada de oxigênio molecular. Não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, e mesmo tendo importância em certos eventos biológicos, poucas alterações ou doenças foram relacionadas à sua presença (HALLIWELL et al., 1990).

Já o RL, por sua vez, é uma espécie química (átomo, íon ou molécula) que contém um elétron (e^-) desemparelhado na sua última camada, o que lhe confere alta reatividade (STOREY et al., 2004). Os radicais livres são extremamente reativos devido a sua particular configuração molecular (STOREY et al., 2004).

Como os radicais livres (RL) apresentam pelo menos um e^- desemparelhado no seu último orbital, eles têm a capacidade de ceder ou receber um elétron, oxidando-se, ou reduzindo-se respectivamente. Isto se chama reações de óxido-redução, que implicam em ganho de elétrons, que são as reações de redução, ou perda de elétrons, que neste caso são as reações de oxidação. Neste sentido conclui-se que os radicais livres (RL) são formados em um cenário de reações de óxido-redução (STOREY et al., 2004).

Dentre os RL mais estudados estão o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^\bullet), que são moléculas altamente reativas normalmente geradas durante a respiração celular e metabolismo normal da célula. Em condições fisiológicas normais, os radicais livres podem também funcionar como ativadores de moléculas envolvidas na função celular, como por exemplo, na transmissão de sinais de expressões de genes (HALLIWELL et al., 1990).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado após a primeira redução do O_2 , e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL et al., 1990).

O radical hidroperoxila (HO_2^\bullet) representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, e por isso, possui uma maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas por meio da peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 1990).

O radical hidroxila ($^\bullet OH$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da peroxidação lipídica por ser o RL mais reativo dos sistemas biológicos. Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro (Fe) também desempenha papel determinante na iniciação deste processo de peroxidação lipídica, uma vez que geralmente é oxidado pela reação de Fenton com a subsequente produção do radical hidroxila. Isto acontece porque o ferro é o metal pesado mais

abundante do organismo, mas a reação de Fenton também pode ser desencadeada com a presença de Cu (MINOTTI et al., 1987; HORTON et al., 1989). Neste sentido, verifica-se que $\cdot\text{OH}$ é o radical livre protagonista da maioria de lesões oxidativas.

Sua reatividade é muito alta, sendo que uma vez formado reage com moléculas próximas que levam a lesões oxidativas ou produção de outros RL (WINTERBOURN, 2008). Assim, se a hidroxila for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado em um metal (situação comum uma vez que as fitas de DNA são negativas e atraem os ânions metálicos), poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), também podem iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica) (HALLIWELL et al., 1986).

Portanto, apesar dos radicais livres participarem de muitos processos fisiológicos, eles podem apresentar-se extremamente prejudiciais para os tecidos quando a sua produção é descontrolada (PARKINSON, 1995; BLAKE et al., 1990).

1.2 ANTIOXIDANTES

Existem diversos mecanismos antioxidantes intrínsecos e adquiridos para manter o equilíbrio Redox da célula e dos tecidos. Esses mecanismos combatem os agentes oxidantes e são conhecidos como sistema de defesa antioxidante

Define-se um antioxidante (AOX) como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo” (HALLIWELL B, 2000).

Os AOX podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta alimentar. São os responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres e responsáveis por inibir e/ou reduzir os danos causados pelas ERO/N.

O fator de transcrição Nrf2 nuclear é o principal regulador da expressão gênica de enzimas antioxidantes (HYBERTSON et al., 2011).

Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser divididos em quatro subclasses:

1. Defesas antioxidantes primárias, de natureza enzimática ou não enzimática. Dentre os antioxidantes não enzimáticos existem os que são produzidos pelo

organismo e os que são adquiridos pela dieta alimentar. Todas as defesas primárias que interagem diretamente com as espécies reativas de oxigênio (STOREY et al., 2004), são conhecidos também como sistemas de prevenção, que atuam impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não radicais livres. Neste grupo ainda encontram-se alguns outros AOX que pertencem aos sistemas varredores, os quais atuam impedindo a ação desses oxidantes (CLARKSON et al., 2000).

2. Defesas auxiliares, que suportam a função do sistema antioxidante primário (por exemplo, por meio da reciclagem ou sintetizando substratos de enzimas antioxidantes) (STOREY et al., 2004), são conhecidas também como sistemas de prevenção e sistemas varredores (CLARKSON, et al., 2000).

3. Proteínas / enzimas quelantes (por exemplo, a ferritina-complexação de metal, transferrina, ceruloplasmina, metalotioneína) e compostos de baixo peso molecular, que impedem ou minimizam a participação do ferro e de cobre (e outros metais pesados) na geração de radicais livres (STOREY et al., 2004). Comportam-se também como sistemas de prevenção e sistemas varredores (CLARKSON et al., 2000).

4. Sistemas de reparação enzimática, que reparam as biomoléculas danificadas por ERO e ERN. Este último grupo de defesas consiste principalmente de uma grande variedade das enzimas de reparo de DNA oxidado. Além disso, algumas enzimas recém-descobertas também proporcionam algum grau de reparação de proteínas oxidadas (STOREY et al., 2004). São conhecidos também como sistemas de reparo que favorecem a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (CLARKSON et al., 2000).

Antioxidantes enzimáticos:

- Superóxido dismutase (SOD)

Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (SOD 1) que está presente principalmente no citosol, e a SOD-manganês (SOD 2) que está localizada primariamente na mitocôndria. A SOD 1 não é afetada pelo aumento de ERO/N, enquanto que a SOD 2 da mitocôndria aumenta sua atividade com o aumento do estresse oxidativo (BABIOR et al., 1997).

Em 1969 a SOD foi descoberta por Mc Cord e Cols., isolada de eritrócitos, e o que descobriram foi sua capacidade de catalisar a reação dismutação de RL. Assim remove o radical superóxido (MCCORD et al., 1969).

A SOD tornou-se vital para a Teoria da Toxicidade do Oxigênio (MCCORD et al.,

1969).

Na presença do próton H^+ catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 (BABIOR et al., 1997) e é capaz de atuar como mediador inibitório da inflamação mediada por neutrófilos, porém tem um rol secundário na atividade antioxidante da saliva (NAGLER et al. 2002).

- Catalase

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Muitas vezes continua o trabalho da SOD, sendo que a Catalase elimina o superóxido liberado pela SOD, produzindo H_2O_2 . Sua atividade é dependente de NADPH (BABIOR et al., 1997).

A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (SCOTT et al., 1991), e apresenta ação antioxidante marginal na saliva (NAGLER, et al., 2002).

- Peroxidase salivar

É a enzima antioxidante mais importante presente na saliva (NAGLER et al., 2002). Além da função antioxidante, possui uma ação antibacteriana (NAGLER et al., 2002). Apresenta um duplo papel no qual controla os níveis de H_2O_2 , catalisando sua reação de peroxidação (reduzir H_2O_2 a H_2O), e apresenta atividade específica antibacteriana, inibindo o metabolismo e proliferação de algumas bactérias (NAGLER et al. 2002). Apesar da sua importância na saliva, equivale somente a 0.01% de todas as proteínas presentes na saliva (NAGLER et al., 2002).

- Glutathione peroxidase (GSH-Px)

É uma enzima selênio dependente. Graças a esta particularidade, alguns autores outorgam para o selênio a capacidade de ser um cofator antioxidante, uma vez que sem o substrato a GSH-Px não apresentaria sua atividade (BABIOR et al., 1997).

Apresenta ação antioxidante marginal na saliva (NAGLER et al., 2002). A GSH-Px catalisa a redução do H_2O_2 e dos peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH (Glutathione reduzida) em GSSG (Glutathione oxidada) (SHAN et al., 1990). Após exposição da GSH a um agente oxidante, ocorre sua oxidação à GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd (Glutathione Redutase), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (HALLIWELL, 1995).

Este ciclo de oxidação e redução da GSH resulta em uma relação de oxidação e

redução GSSG/GSH, que é um conhecido método para mensurar os níveis de EO no local de interesse, sendo que GSSG é a GSH oxidada, e necessita apresentar-se reduzida (GSH) para atuar como um AOX de novo. Quanto maior a quantidade de GSSG presente na célula proporcionalmente maiores serão os níveis de agentes oxidantes que esse tecido ou célula possui.

A GSH então, é um tripeptídeo que além de ajudar neste ciclo antioxidante, auxilia também na remoção de xenobióticos, intervém no metabolismo do ácido ascórbico, pode quelar Cu (unir-se com Cu), (SHAN et al., 1990) e tem ação protetora na cavidade bucal, contra o estresse oxidativo induzido por íons metálicos de materiais dentários (NAGLER et al., 2002).

- Glutathione S-transferase e Glutathione S-transferase

Atuam no ciclo de óxido redução da GSH, como já foi mencionado. Após exposição da GSH a um agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG, e a recuperação da GSH será feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (SHAN et al., 1990). A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (SHAN et al., 1990).

A glutathione S-transferase catalisa a conjugação do GSH com xenobióticos incluindo aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (SHAN, et al., 1990).

Principais antioxidantes não enzimáticos:

- Vitamina C

A Vitamina C, ascorbato, ou ácido ascórbico, é um antioxidante hidrossolúvel obtido pela dieta. Atua eficientemente sobre o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito, radical hidroxila e peroxila. O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana (FREI et al., 1989). Mas, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação (CHAKRABORTHY et al., 2015).

Dihidroascorbato redutase é a enzima encarregada de reduzir o RL ascorbil de novo em ascorbato para ajudar tanto no ciclo de regeneração do tocoferol quanto da sua própria função AOX (CHAN, 1993).

O ácido ascórbico apresenta-se concentrado no fluído crevicular gengival em relação ao plasma (NAGLER et al., 2002).

- Vitamina E

É constituído por 4 tocoferóis (MEYDANI, 1995).

É um Antioxidante (AOX) lipossolúvel que combate geralmente a peroxidação lipídica por facilmente se adaptar a esse ambiente (FREI, 1994). É o antioxidante lipossolúvel mais abundante no organismo, por isso é o antioxidante estrutural da membrana, diferente da maior parte dos agentes antioxidantes que estão no meio intracelular (FREI, 1994).

Atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas além de interceptar o radical hidroxila. Sistemicamente existe uma correlação entre a vitamina C e a vitamina E, porque a vitamina C regenera a vitamina E (ABDOLSAMADI et al., 2013). Quando a vitamina E reage com um RL, geralmente com um radical peroxila, se forma o radical tocoferil, e a vitamina C consegue ceder um elétron para o tocoferil se transformar de novo em tocoferol e poder combater mais RL (FREI et al., 1989; CHAN, 1993).

- Vitamina A

Os carotenoides são conhecidos como a Vitamina A, são AOX lipossolúveis também provenientes da dieta alimentar. São efetivos varredores de oxigênio singlete, e também podem inibir a peroxidação lipídica da membrana. Sua concentração é muito menor que a da vitamina E, e começa a proteger a membrana após se esgotarem os suprimentos dessa vitamina E (FREI, 1994).

O β -caroteno interage com os radicais livres especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 , diferente da vitamina E (FREI, 1994).

- Ácido Úrico

Produzido pelo organismo por meio das bases nitrogenadas, como produto secundário do metabolismo. É hidrossolúvel, portanto reage com os RL, e em especial, com o peroxinitrito antes que este chegue a danificar a membrana. Assim, como a vitamina E, seu RL o ânion radical urato pode ser regenerado pelo ascorbato. É responsável por grande parte da atividade antioxidante total da saliva, cerca de 85%, sendo o principal antioxidante encontrado na saliva e no fluído crevicular (NAGLER et al., 2002).

- Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) da saliva é a junção de todos os AOX presentes na cavidade bucal. É a linha de defesa contra os oxidantes presentes na cavidade bucal. Apresenta uma redução em pacientes fumantes, com líquen plano e câncer bucal. Quando a saliva entra em contato com a fumaça proveniente do cigarro ela perde a sua CAT e torna-se um ambiente produtor de oxidantes (NAGLER et al., 2002).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Desde 1969 com o descobrimento da superóxido dismutase (SOD), foi confirmado que os radicais livres poderiam se formar e atuar dentro da célula. Com base nessa informação surgiram as primeiras hipóteses sobre os radicais livres atuando na sinalização celular (MCCORD et al., 1969).

Define-se o estresse oxidativo (EO), como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (JONES, 2006).

Esta definição de estresse oxidativo é a mais completa; visto que foi provado que as ERO, e as ERN, podem ser consideradas segundos mensageiros relevantes na transdução de sinais celulares, sendo benéficos e necessários no organismo. No entanto, são processos muito complexos e não totalmente compreendidos (STOREY et al., 2004).

O excesso de ERO/ERN em um tecido contribui para condições patológicas, sendo os responsáveis por danificar moléculas extracelulares e intracelulares, bem como a ativação excessiva de processos celulares (HALLIWELL et al., 1999).

A intensidade e patogenicidade das doenças relacionadas com EO irão depender naturalmente: das concentrações locais de espécies pró-oxidantes e antioxidantes, das constantes de velocidade da reação com moléculas-alvo como também da compartimentalização celular, no qual a solubilidade e disseminação são determinantes (GOW et al., 2001; WINTERBOURN, 2008).

O desenvolvimento do estresse oxidativo, por um desequilíbrio no estado oxidativo num tecido, tem sido implicado na patogênese de muitas doenças (EREL et al., 2004; FERREIRA et al., 1997) (Figura 2), e no envelhecimento (LIOCHEV et al.,

2013).

As reações oxidativas prejudiciais no estresse oxidativo provocam a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, que podem desencadear mudanças no volume e formato da matriz extracelular e mitocondrial, desnaturação de proteínas, e inclusive levar a morte celular. Essas modificações são conhecidas como dano oxidativo (Figura 1) (JONES, 2006). Porém, no organismo existem mecanismos antioxidativos tanto enzimáticos como não enzimáticos para combater estes processos (EREL et al., 2004; JONES, 2006).

Sendo assim, o monitoramento do estresse oxidativo em humanos de forma indireta pode ser feito por meio dos produtos de dano produzido, ou investigando o potencial de organismos, tecidos ou fluidos de resistir mais oxidação, ou seja, estudando o comportamento dos antioxidantes (ABUJA, 2001).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação dos radicais livres, porém as membranas celulares são as mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que é a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares ou das organelas que acarretam alterações na estrutura e permeabilidade da célula ou organelas (MELLO et al., 1984). Após a perda da função da membrana celular, haverá perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos ou liberação do Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE), e formação de produtos citotóxicos (como aldeídos, o malondialdeído é o mais conhecido: MDA), levando a morte celular (HERSHKO, 1989; SHAN et al., 1990; WINTERBOURN, 2008).

Cabe ressaltar que nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória, ou na formação de epinefrina e noradrenalina e do grupo heme da hemoglobina (HALLIWELL, et al., 1999). Todavia, como já se mencionou, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS et al., 1991) às diferentes moléculas celulares.

A figura 1 mostra como o estresse oxidativo modifica ou altera os diferentes tecidos no organismo, e as modificações que produz.

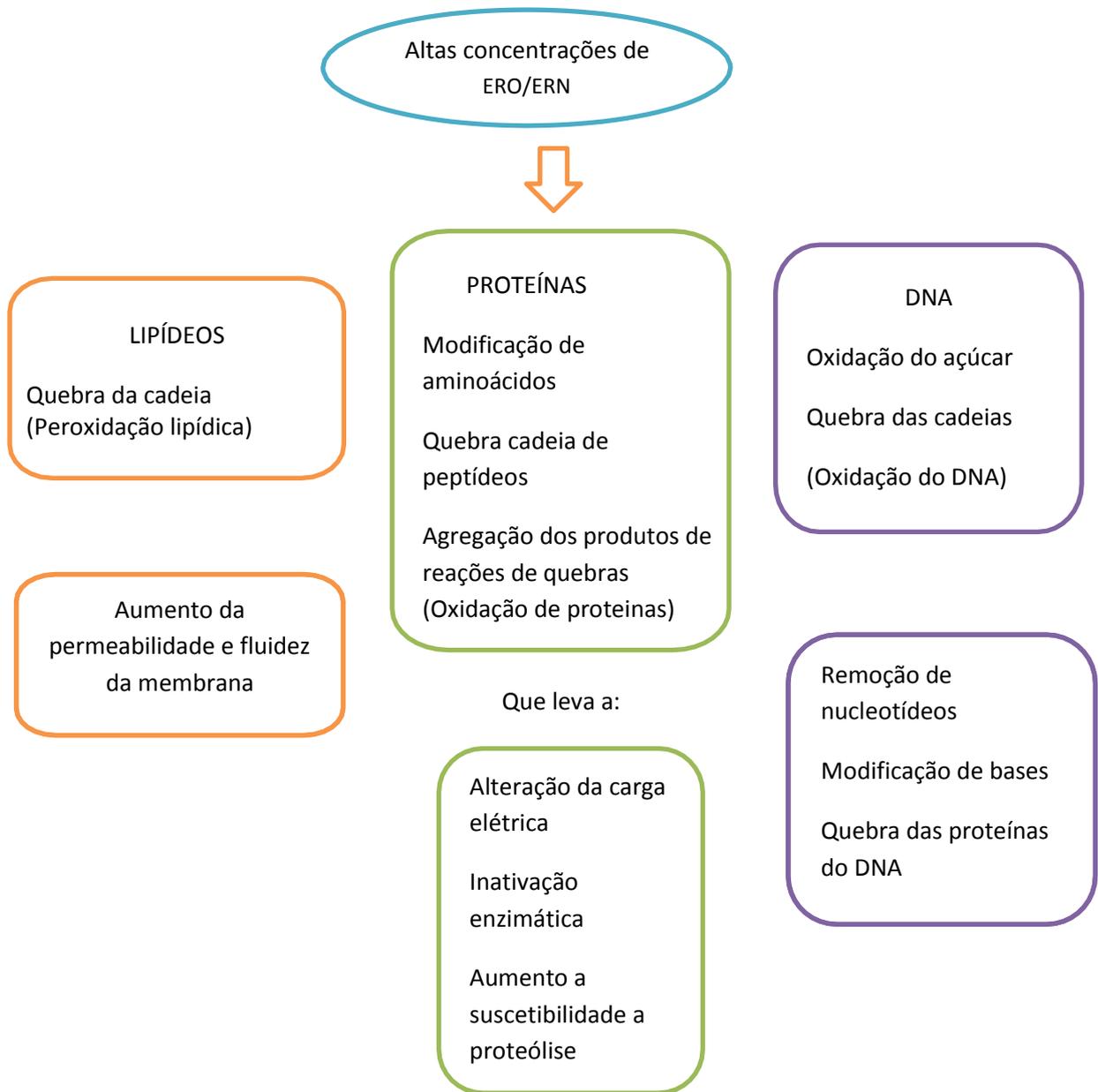


Figura 1. Esquema resumo das alterações que o estresse oxidativo pode produzir nos diferentes componentes celulares (SHARMA et al., 2012).

Existem então várias doenças e condições relacionadas ao estresse oxidativo, como as enumeradas na figura 2 (BRIEGER et al., 2012).



Figura 2. Esquema resumo das doenças estudadas com relação no estresse oxidativo.

1.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO: CAUSA OU CONSEQUÊNCIA?

Diversos estudos demonstram a participação dos radicais livres em inúmeros processos patológicos. Por exemplo, no câncer, o estresse oxidativo pode ativar os fatores de crescimento, as citocinas inflamatórias, as quimiocinas, as moléculas reguladoras do ciclo celular e as moléculas antiinflamatórias. Então são ativadas as vias inflamatórias que levam à transformação de uma célula normal em célula tumoral. Essas observações sugerem que o estresse oxidativo, a inflamação crônica e o câncer estão intimamente ligados (REUTER et al., 2010). Porém, nestas condições sistêmicas em que se sugere associação ao estresse oxidativo, ainda não há evidências científicas suficientes para provar se o estresse oxidativo causou a alteração sistêmica ou se a alteração sistêmica levou a um estado de estresse oxidativo no organismo (Quadro 2) (HALLIWELL et al., 2007).

Quadro 2. O papel do estresse oxidativo nas doenças do organismo			
Condição	Será o estresse oxidativo a causa primária?	Será o estresse oxidativo a causa secundária e contribuí na patogênese da doença?	Existe evidência se os antioxidantes podem ajudar terapeuticamente?
Dano induzido radiação	Sim	Não	Sim
Aterosclerose	As vezes	Sim	Sim
Diabetes	Provavelmente não	Provavelmente pelo ataque fagocítico ao islotes	Por agora limitado
Câncer	Em poucos casos sim	Provavelmente	Muito limitado
Alzheimer	Não	Provavelmente	Limitado
Parkinson	Não	Pouco provável	Muito limitado
Deficiência de vitamina E	Provavelmente	Não	Sim
Hipertensão	As vezes	As vezes	Um pouco

Fonte: Traduzida e adaptada de Halliwell e Cols. 2007.

Um fato importante que percebe-se no quadro 2, é que nem sempre os antioxidantes produzem benefícios quando são usados como terapia; mesmo sendo os compostos encarregados de defender o organismo do ataque das espécies reativas.

Por exemplo no câncer, vários antioxidantes não produzem benefício nenhum. Sendo que o aparecimento de câncer está ligado aos reparos do DNA de uma célula afetada (que apresenta alguma mutação); nos quais, os sinalizadores celulares de sobrevivência da célula são ativados, e aumentam as concentrações das defesas antioxidantes, e a célula com mutações termina sobrevivendo ou sendo imortalizada, resultando em câncer (FRANCO et al., 2009).

Então os antioxidantes por sua vez podem proteger células vitais de alguma mutação e aumentar a sobrevida, permitindo a sua duplicação, iniciando o tumor. Combinado neste processo pode estar também a super-expressão dos fatores de crescimento e de angiogênese, ajudando na progressão do tumor (REUTER et al., 2010).

Dentre as alterações associadas ao EO, uma das mais estudadas é o envelhecimento, no qual, propõe-se que poderia ser secundário ao estresse oxidativo, que levaria a reações de oxidação lipídica, proteica, e com o DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético (LIOCHEV et al., 2013).

Doenças frequentes na velhice e já consagradas com uma relação direta com o estresse oxidativo são: a doença de Parkinson (RAY et al., 2014), acidente vascular cerebral onde há falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes, doença de Alzheimer e artrite reumatoide quando há produção de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HClO_4$ por células fagocíticas ativadas (ALIEV et al., 2013) e a anemia de Fanconi, que apresenta uma excessiva produção de EROs nas suas células (PAGANO et al., 2004), por disfunção mitocondrial (PAGANO, et al., 2015).

1.4 ANEMIA DE FANCONI

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, de caráter autossômico recessivo, que afeta 1: 360 000 indivíduos, se reporta em pessoas de todas as raças e não tem predileção por sexo (TISCHKOWITZ et al., 2003). É uma síndrome com fragilidade cromossômica. Caracteriza-se por apresentar malformações congênitas diversas, e em diferentes órgãos (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003; TISCHKOWITZ et al., 2003; KUTLER et al., 2003; ALTER, 2005).

14.1 FRAGILIDADE CROMOSSÔMICA, DANO NO REPARO DO DNA E SUSCETIBILIDADE A TUMORES SÓLIDOS

A instabilidade cromossômica, em conjunto com excessiva sensibilidade a clastogênicos, como Mitomicina C (MMC), e Diepoxibutano (DEB), são as principais falhas celulares da AF (ALTER, 2002). Quando uma célula saudável é exposta *in vitro* a DEB ou MMC ela tem a capacidade de se reparar, apresentando ao final do experimento poucas quebras cromossômicas. No entanto, o mesmo não ocorre em células de pessoas com AF. Nestas, as quebras são excessivas (maior do que 1.3 quebras por metáfase) evidenciando a falha de reparo do DNA (AUERBACH, 1989).

Essa instabilidade se apresenta pela mutação de mais de 15 genes, aos quais atribuem as funções de sinalização e reparo, necessárias para a proteção do DNA; uma vez que esses genes encarregados de proteger o DNA apresentam mutações esse DNA é mais frágil e com isso mais instável (WANG, 2007; KEE, 2010).

Os pacientes com AF apresentam um alto risco de desenvolver lesões malignas precocemente. Uma vez que se apresenta falha no reparo do DNA e instabilidade cromossômica, se desenvolvem mutações, aumentando a chance de transformações malignas (ALTER, 1996; ROSENBERG et al., 2003; ILURDOZ et al., 2003; JOENJE et al., 2001). São suscetíveis a tumores de cabeça e pescoço e ao desenvolvimento de leucemias e tumores de fígado (D'ANDREA et al., 1997).

Frente às diversas manifestações da anemia de Fanconi, a morte precoce como consequência das suas complicações hematológicas, efeitos adversos do transplante de medula óssea, e o câncer tornam-se comum nos indivíduos portadores desta síndrome (D'ANDREA et al., 1997).

O risco de desenvolver tumores malignos tem sido calculado por três diferentes autores. Segundo Deeg e Cols, estima-se ser de 10 000 a 15 000 vezes maior em indivíduos com AF, do que na população não afetada pela doença (DEEG et al., 1996). Segundo Alter nas suas revisões de literatura tomando todos os casos reportados de câncer da sua base de dados, estimou que um terço dos indivíduos com AF desenvolvem tumores sólidos com um risco acumulado de 76% maior nas idades de 45 aos 48 anos (ALTER et al., 2013; ALTER et al., 2003), e que os cânceres mais frequentes, mais de 40% ocorreram na via aerodigestiva, (carcinoma espinocelular da boca, região orofaríngea, faríngea e esofágica) (ALTER et al., 2003). Por último, segundo Kutler e cols., a incidência de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é 500 vezes maior, em indivíduos com anemia de Fanconi (AF),

que do que na população em geral (KUTLER et al., 2003; KUTLER et al., 2003), o que é muito relevante e confere à anemia de Fanconi (AF) ser um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC), sendo que, os indivíduos com anemia de Fanconi são uma população que não faz uso de nenhum fator predisponente ao câncer, como tabaco ou álcool, e mesmo assim se apresentam os tumores sólidos precocemente nas mucosas.

Essa suscetibilidade a malignidades é de muita importância na Odontologia visto que muitos dos carcinomas espinocelulares acometem a mucosa bucal (KUTLER et al., 2003; TISCHKOWITZ et al., 2003; ACIKGOZ et al., 2005). Num estudo com 754 indivíduos com AF, 3% da amostra apresentou carcinoma espinocelular em membranas mucosas. Estes indivíduos não estavam expostos aos fatores de risco para câncer bucal, como tabaco e álcool, e a prevalência foi maior nas mulheres (KUTLER et al., 2003).

1.4.2 FENOTIPO

O fenótipo destes indivíduos é amplo e muda de pessoa a pessoa, sendo que as malformações podem ser unilaterais ou bilaterais, e estão relacionadas a anormalidades congênitas ou a distúrbios hematológicos tardios (KERVILLER et al., 2000) e progressivos. Estas manifestações clínicas compreendem: defeitos ou anomalias físicas existentes ao nascimento, endocrinopatias, falhas no crescimento, ocorrência de tumores sólidos e anomalias hematológicas, nas quais incluem a insuficiência medular e o desenvolvimento de leucemia ou síndromes mielodisplásicas (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003).

As anomalias físicas são:

- Alterações na pele: pigmentação da pele alterada - manchas café com leite, áreas com hipo e hiperpigmentação, petéquias e hematomas;
- Baixa estatura, deficiências de crescimento, microcefalia, hidrocefalia, microssomia, microftalmia, microdontia e atraso no desenvolvimento.
- Anomalias nos pés e mãos, polegar e anomalias radiais, defeitos na eminência tênar do radio.
- Malformações do sistema auditivo: podem apresentar implantação baixa das orelhas, mudanças no pavilhão, hipoplasia do canal auricular, ausência de meato anterior e até perda da audição.
- Malformações renais (em tamanho e forma): podem apresentar um rim só, rins fusionados, e presença de rins displásicos e císticos.

- Defeitos gastrointestinais, problemas cardíacos, malformações nas vértebras, defeitos na medula óssea, cerebelo, nervo óptico, sistema respiratório e hipospádia da uretra (ALTER, 2002; TISCHKOWITZ et al., 2003; AUERBACH, 2009). No quadro 3, adaptada e traduzida de Dokal, pode-se observar a porcentagem e a frequência das diferentes anomalias fenotípicas encontradas em indivíduos com AF (DOKAL, 2000).

Quadro 3. Frequência de anomalias em AF	
ANOMALIAS	FREQUÊNCIA (%)
Esquelética (Radial, de cadeira, escoliose vertebral, costelas)	76
Pigmentações na pele (manchas café com leite, hiper e hipopigmentações)	64
Baixa estatura	63
Olhos (microftalmia)	38
Renais e do trato urinário	34
Genitais masculinos	20
Retardo mental	16
Gastrointestinal (ano retal, duodenal atresia)	14
Cardíacas	13
Auditivas	11
Do Sistema Nervoso Central (hidrocefalia, septo pelúcido)	8
Sem anomalias	30

Em relação à saúde bucal, são poucos os estudos na literatura, porém mostram uma condição de higiene oral deficiente com índice de cárie e gengivite de 35% nos 26 indivíduos estudados (TEKCICEK et al., 2007); e uma alta predisposição a desenvolver cárie dental e doenças periodontais (15 participantes) (AÇIKGÖZ et al., 2005).

Um estudo mais amplo encontrou a presença de doenças periodontais em 36%, porém o aparecimento destas lesões orais foi atribuído à higiene oral deficiente (DE ARAUJO et al., 2007), tendo em consideração que após um levantamento bacteriano salivar, encontravam-se presentes algumas das principais espécies periodontopatogênicas, sendo que o comportamento da sua condição bucal não apresenta diferenças significativas com a da população em geral (LYKO et al., 2013). E reportam-se com alta frequência, lesões na mucosa bucal, principalmente traumáticas (25%), e leucoplasias (12%) (CAVALCANTI et al., 2015).

Desta maneira estes indivíduos apresentam uma alta prevalência de leucoplasias na mucosa bucal quando comparada a da população normal, que é de 2%, (PETTI et

al., 2003), e exige um acompanhamento contínuo, visto que esta lesão bucal é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer bucal (VAN DER WALL, 2009).

Em síntese, indivíduos com AF apresentam uma maior prevalência de lesões bucais com potencial de malignização (PETTI et al., 2003; VAN DER WALL, 2009), defeitos no reparo do DNA somado a instabilidade cromossômica, que os levam à predisposição genética de desenvolver tumores sólidos (PAGANO et al., 2013).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM AF

A toxicidade da célula pelo oxigênio vem sendo estudada desde os anos 80 (HALLIWELL B., 1999), e na anemia de Fanconi não foi exceção.

Foi observada a presença excessiva do oxigênio nas células de pacientes com anemia de Fanconi causando uma toxicidade e conseqüentemente a indução de estresse oxidativo. Estes trabalhos relacionam o estresse oxidativo com a doença, e consideram-lhe como um fator crítico em sua patogênese (DU et al., 2008; LI et al., 2014).

Este estresse oxidativo é evidenciado também em estudos *in vitro* e *in vivo*, nos quais se encontraram acúmulos de subprodutos de dano ao DNA (8-hydroxideoxiguanosina) (DEGAN et al., 1995) e outras anomalias de âmbito oxidoreduativas, como um aumento na proporção de glutathiona reduzida: glutathiona oxidada (GSH:GSSG), (PAGANO et al., 2004) e expressão da SOD (PETROVIE et al., 2011).

Assim, baseados no fenótipo da doença, os autores sugerem que AF é uma doença relacionada com a formação de ERO (PAGANO et al., 2003). E propõe-se, um vínculo entre o fenótipo da AF e o estresse oxidativo (PAGANO et al., 2005).

O estresse oxidativo é então considerado um fator etiológico na patogênese da doença. Por exemplo, atribui-se o desenvolvimento da falência medular à produção de ERO, resultante do contato com agentes físicos e químicos, baseados na conhecida sensibilidade das células hematopoiéticas as ERO (PAGANO et al., 2005). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado a outras características clínicas como a pigmentação anormal da pele, que está atribuída a mecanismos moleculares regulados por processos redox, sendo graças aos processos oxidativos, que se consegue a biossíntese da melanina, relacionado com a expressão de Tioredoxina (AHMAD, 2006). Outras malformações podem ser atribuídas à exposição ao estresse

oxidativo no desenvolvimento intrauterino (PAGANO et al., 2015). De fato, na literatura existe uma controvérsia se o fenótipo dos pacientes com AF reflete melhor o cenário de uma resposta deficiente ao dano no DNA ou se deve apenas a um desequilíbrio no estado oxidativo do paciente (AHMAD, 2006).

A figura 3 mostra as alterações no nível de EO e proteínas nos indivíduos com AF.

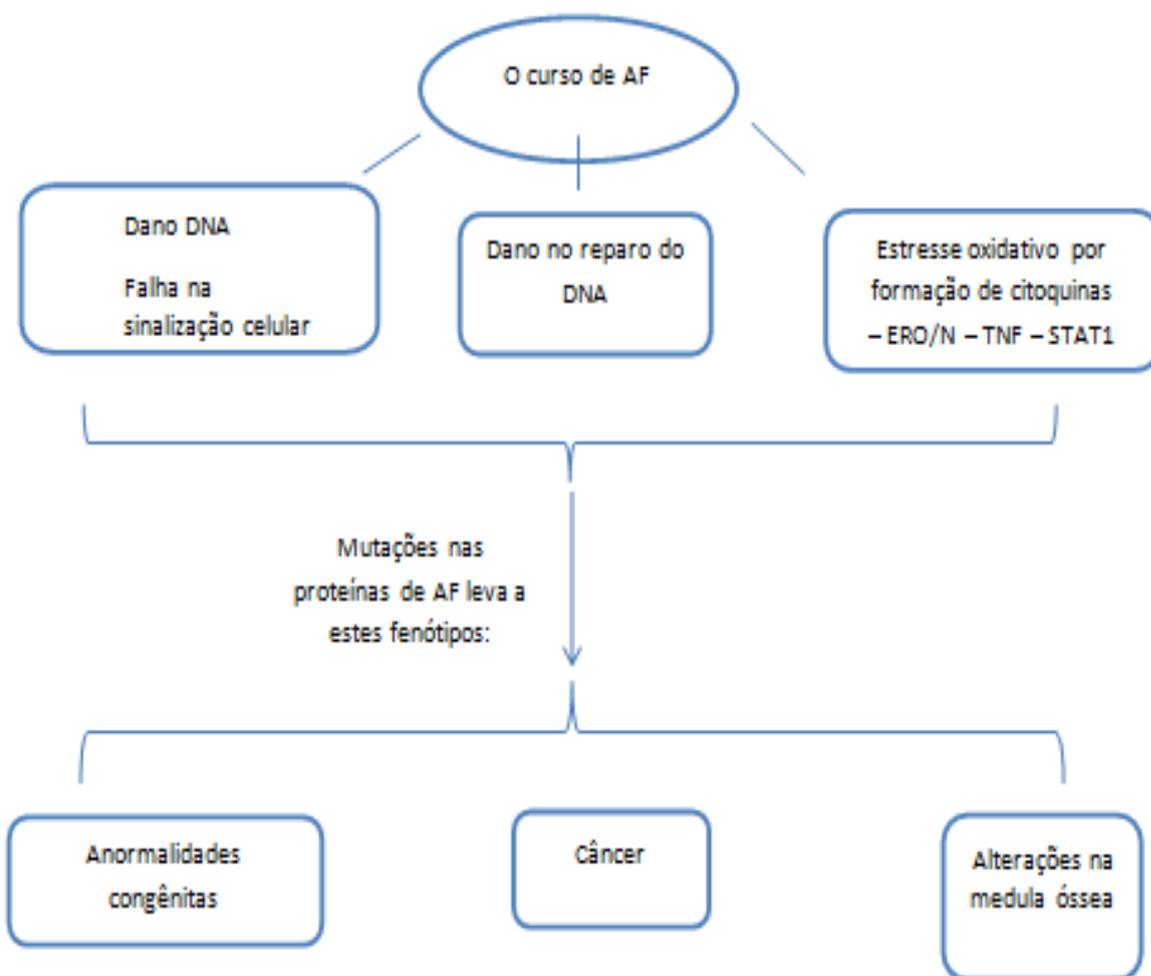


Figura 3. Mecanismo de produção de EO e alterações fenotípicas na anemia de Fanconi. (Modificado de Li et al., 2014).

É sugerido um estado pró-oxidante após encontrar em pacientes com AF pré-transplante um aumento de 8-OhdG e níveis aumentados de GSSG. Como se encontraram valores diferentes em pacientes transplantados, sendo menores os valores de GSSG no indivíduos que já tinham sido transplantados, entende-se que

esse ambiente pró-oxidante pode ser reduzido após o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) (PAGANO et al., 2004).



Figura 4. Defeitos provocados por excesso de ERO na anemia de Fanconi a nível mitocondrial (Modificado de Kumari et al., 2012).

Defeitos genéticos próprios da AF contribuem na acumulação de ERO (Figura 4), que afeta as mitocôndrias e vai gerar uma diminuição no seu potencial de membrana, tornando o sistema de desintoxicação das ERO incapazes de responder ao excesso dessas espécies. Isto leva à anormalidades mitocondriais (fragmentação), resultando em diminuição do consumo de oxigênio, baixa produção de ATP e, provavelmente, outras consequências como citotoxicidade e morte celular (KUMARI et al., 2012).

Alterações nas funções mitocondriais das células de AF apresentam então, maiores níveis de ERO, menores valores de potencial de membrana mitocondrial, que leva a uma mudança na morfologia da mesma, uma diminuição na produção de ATP, consequência da perda do potencial de membrana, diminuição do consumo de oxigênio, aumento da SOD 1, e uma falha na resposta do complexo NADPH ante a presença de H_2O_2 para tentar compensar a produção diminuída de ATP (KUMARI et al., 2012).

Também na AF, tem-se evidenciado um envolvimento das ERO na hipersensibilidade aos clastogênicos do DNA (PAGANO, 2000). Os resultados que suportam esta evidência são o fato de diminuir essa hipersensibilidade após a presença de antioxidantes como a catalase, SOD, e vitamina E (NORDENSON et al., 1977; PINCHEIRA et al., 2001), o que explica uma vez mais o desequilíbrio oxidativo

nestes indivíduos, a nível celular e de DNA.

Acredita-se que a GST está envolvida no mecanismo principal de desintoxicação por DEB (PELIN et al., 1996), no qual parece que essa sensibilidade aumentada aos clastógenos é relacionada a anormalidades nas expressões desse tripeptídeo (PAGANO et al., 2015). Outra enzima envolvida nessa proteção à clastógenos é a tiorredoxina, a qual protege os fibroblastos de indivíduos com AF da toxicidade induzida por eles (RUPPITSCH et al., 1998).

Outro indicador na AF de produção de ERO, são as concentrações elevadas TNF- α encontradas em pacientes com AF em níveis significativamente aumentados em comparação com plasma dos controles (SCHULZ et al., 1993). Desde que TNF- α é um reconhecido indutor na produção de ERO, uma vez que ativa os fagócitos, e eles liberam ERO (SCHULZ et al., 1993).

1.6 ESTUDOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM SALIVA

Atualmente biomarcadores salivares são válidos como medidores para avaliar o estresse oxidativo, e elucidar seus mecanismos. A 8- hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), produto da oxidação do DNA e o malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, podem ser facilmente avaliados à partir da saliva. Deficiências no sistema de defesa antioxidante levarão ao aumento na concentração destes biomarcadores para estresse oxidativo e do estado antioxidante total tanto em soro quanto na saliva. Os níveis aumentados destes produtos da oxidação estão relacionados a níveis mais altos de doença (SOTILLO et al., 2011).

Wang e Cols. apresentam os principais estudos que foram feitos com saliva pesquisando níveis de oxidantes e antioxidantes, os quais objetivam identificar desequilíbrios a nível oxidativo segundo as condições estudadas (WANG et al., 2015).

Há o desenvolvimento de técnicas bioquímicas de amostragem que quantificam as substâncias envolvidas no sistema oxidante-antioxidante em diversos fluidos corporais (EREL, 2004; EREL, 2005; BENEDETTI et al., 2014).

Os métodos mais utilizados para aferição indireta dos radicais livres e, conseqüentemente, das lesões oxidativas, são os espectrofotométricos e cromatográficos, que medem separadamente a atividade enzimática da SOD, da catalase, da GSH-Px, da GSH-Rd ou a concentração dos tripeptídeos (GSH, GSSG) e dos aldeídos (MDA). Por exemplo, a peroxidação lipídica é habitualmente medida pelo

método do MDA, e o estresse oxidativo por dosagens de GSSG e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH (STOREY et al., 2004).

Quando as diferentes espécies de oxidantes e antioxidantes são medidas separadamente, apresentam técnicas demoradas, trabalhosas, dispendiosas e complicadas. Portanto foi proposto o estudo do estado oxidante total (EOT) (EREL, 2004) e da capacidade antioxidante total (CAT) (EREL, 2004; BENEDETTI et al., 2014). Uma vez que seus efeitos são aditivos (EREL, 2004).

Atualmente, têm sido estudadas com estas metodologias laboratoriais doenças sistêmicas como Diabetes Mellitus, esclerose múltipla, síndrome de Down, Alzheimer e condições orais como lesões pré-malignas, estomatite aftosas recorrentes, câncer de boca, cárie dental, periodontite, entre outros (WANG et al., 2015).

Na doença periodontal por exemplo o dano induzido pelos radicais livres é estudado por seu envolvimento na maioria das condições patológicas de origem inflamatória. Se atribui aos leucócitos a produção de EROs, para a destruição das bactérias envolvidas na patogênese da doença. Entretanto essas bactérias também são produtoras de EROs. Então quando há um desequilíbrio biológico, estes radicais podem danificar também as células do próprio organismo, neste caso o tecido periodontal (DIAB-LADKI et al., 2003).

Foram estudados biomarcadores (MDA, CAT) de estresse oxidativo em úlceras aftosas recorrentes e em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, nos quais foram medidas a nível salivar e a nível sérico, em ambos os estudos os valores estiveram fortemente correlacionados demonstrando a validade da saliva como fluido corporal para diagnóstico (SARAL et al., 2005; AL-RAWI et al., 2011).

Hegde et al. (2009) avaliaram a CAT em crianças com cárie da primeira infância e cárie rampante, e verificaram que há um aumento da CAT nas crianças com cárie em relação aos seus grupos controles. E verificou-se que os níveis aumentados de CAT se dão devido à resposta inflamatória gerada pela infecção da cárie ou pela má higienização oral observada. E por fim, verificaram que em crianças mais velhas a CAT tem níveis aumentados, sugerindo para este resultado que se alimentaram de alimentos mais sólidos e com maiores quantidades de antioxidantes (HEGDE et al., 2009).

Valores aumentados de CAT foram encontrados também em doenças sistêmicas como Diabetes Mellitus- tipo 1 (ASTANEIE et al., 2005), escleroderma (ZALEWSKA et al., 2014), e em doenças locais como líquen plano oral (BATTINO et al., 2008), e

periodontite crônica (SU et al., 2009). Os autores sugerem que os níveis aumentados de CAT são devido à resposta inflamatória do organismo frente a infecção ou como uma resposta doença que o indivíduo apresenta.

Um número de biomarcadores de estresse oxidativo têm sido identificados e quantificados na saliva. Esses biomarcadores, representam moléculas que tenham sido submetidas a modificações in vivo, na presença de ERO/N causadas por as diferentes doenças estudadas (WANG et al., 2015). Porém, este é o primeiro estudo que faz uma análise salivar em indivíduos com Anemia de Fanconi.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar o estado oxidativo salivar nos pacientes com anemia de Fanconi.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Mensurar o estado oxidante total presente na saliva dos indivíduos com AF.

2.1.2 Estudar a capacidade antioxidante total da saliva, e avaliar as concentrações de vitaminas C e E nestes indivíduos.

2.1.3 Analisar diferenças entre a saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com AF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná com parecer de número 1.032.358. Os indivíduos foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação voluntária na pesquisa.

3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Estudo transversal, pareado por sexo e idade.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes do presente estudo são todos os pacientes com anemia de Fanconi em pré-transplante atendidos de Janeiro a Dezembro 2015 no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Paraná (HC UFPR).

A amostra foi por conveniência. Após passar pela consulta médica, os pacientes elegíveis eram convidados a participar do estudo.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes com diagnóstico de AF não transplantados no HC UFPR com idade igual ou superior a 4 anos, no período de maio a novembro 2015.

Uma vez coletado um caso, procurava-se o controle saudável. Cada controle foi cuidadosamente selecionado segundo o sexo e a idade do indivíduo previamente coletado com anemia de Fanconi.

Todos os participantes do grupo controle eram saudáveis sistemicamente, não apresentavam doenças orais e não faziam uso de nenhum medicamento. Foram abordados em escolas de Curitiba, da triagem da Clínica de odontopediatria, e de estudantes de Odontologia.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os participantes que não estavam aptos para cuspir, tabagistas, presença de outras doenças locais e/ou desordens sistêmicas.

Indivíduos em uso de medicação com vitamina C e /ou vitamina E, assim como qualquer outro vitamínico, que pudesse influenciar nas concentrações.

3.6 COLETA DE DADOS

Informações como sexo, idade, e medicamentos que utilizavam foram coletados dos indivíduos com AF. Dos prontuários médicos foram extraídos o fenótipo dos pacientes, alguma restrição da dieta e confirmados os medicamentos que tomavam.

3.7 COLETA DE SALIVA E FLUXO SALIVAR

Foi solicitado aos participantes não comer, beber nem escovar os dentes por um período de, pelo menos, uma hora antes da coleta de saliva. As coletas de saliva foram feitas entre os períodos de 8:00 e 11:30h da manhã, sob condições padronizadas. Antes do início da coleta foi solicitado que deglutisse a saliva presente na cavidade bucal.

Foram coletadas saliva não estimulada e estimulada, com o objetivo de ver as diferenças entre as salivas sendo que na população em geral, a saliva estimulada apresenta maiores níveis de AOX, quando comparada com a não estimulada (NAGLER et al., 2002). O aumento do fluxo mediante a estimulação muda as concentrações de vários constituintes da saliva (APS et al., 2004).

Para a coleta da saliva não estimulada, foi orientado para o participante permanecer sentado com a boca aberta durante 5 minutos e que cuspiisse conforme a saliva ficasse no assoalho de boca.

A saliva estimulada foi coletada pelo método de spitting (o método do cuspe), sendo estritamente estimulada com um filme de parafina. A saliva coletada foi acondicionada em recipientes estéreis devidamente identificados. Durante a coleta, e para seu transporte, as amostras permaneceram em um isopor com gelo. As amostras foram centrifugadas a $9.030 \times g$ (10.000 RPM) durante 4 minutos.

O fluxo salivar foi medido com a ajuda de micropipetas calibradas em laboratório. A coleta da saliva dos controles seguiu o mesmo protocolo. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C e todas as análises realizadas em menos de 15 dias.

Após a coleta da saliva prosseguiu -se uma avaliação clínica intraoral, e anotada a condição bucal deles.

3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICA DA SALIVA

3.8.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Determinou-se a CAT pelo método de Erel (Erel, 2004), no qual as reações de radicais livres são iniciadas com a produção do radical hidroxilo por meio de reação de Fenton e a velocidade desta é monitorada seguindo a absorvância de radicais

dianisidil coloridos.

Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75 mM de solução de Clark e Lubs (160 ml de KCl (75 mM) e 40 ml de HCl 37% (75 mM), pH final 1,8), 10 mM de o-dianisidina e 45 μ M de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorbância de 450nm. Após a primeira leitura foi adicionada uma alíquota de uma solução 7.5 μ M de H₂O₂, preparada na solução de Clark e Lubs, e após de 7 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L.

3.8.2 DETERMINAÇÃO DO ESTADO OXIDANTE TOTAL (EOT)

O EOT foi determinado pelo método de Erel (EREL, 2005). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico na presença de várias espécies oxidantes em meio ácido e a medição do íon férrico pelo laranja de xilenol.

Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo: 150 μ M de xilenol, 140 μ M de NaCl, 90 ml de H₂SO₄ 25 μ M e 10 ml de glicerol 1,35 M. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorbância de 550 nm. Após a primeira leitura foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo: 5 mM de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O e 10 mM de o-dianisidina em 10 ml de H₂SO₄ 25 mM. Após 4 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com H₂O₂. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em μ mol H₂O₂ equivalente /L.

3.8. 3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA E

A vitamina E foi determinada pela redução do Mo (VI) a Mo (V), produzida pelo analito da amostra e a subsequente formação do complexo fosfato/Mo(V) de cor verde a pH ácido (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

Uma alíquota de 100 μ l de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 1000 μ l de Reagente 1 (4 m M molibdato de amoníaco, 0.6 M ácido sulfúrico, 28 mM sódio fosfato). Posteriormente foi realizada a leitura das amostras a uma absorbância de 695 nm. Os resultados foram expressos em mmol/L (mM) e curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4).

3.8.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA C

A vitamina C foi determinada pela formação da cor proveniente da interação do ácido ascórbico com o reagente de Folin (Jagota e Dani, 1982). A saliva foi preparada com 0.2 ml de TCA 10%, depois colocada em um banho de gelo e por último uma centrifugação de 3000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 200 µl de saliva de cada amostra preparada foi adicionada a uma solução contendo 1,5 ml de água miliQ e 0.2 de Folin. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras a uma absorbância de 720 nm. Os resultados foram determinados mediante a fórmula de tomada de ensaio e expressos em mg/L.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados e organizados estatisticamente por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences® (versão 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Os resultados das variáveis foram analisados aplicando os testes t de student (para comparação dos grupos com distribuição normal dos dados) e de U de Mann Whitney (para dados não paramétricos).

Foi realizada uma regressão linear, para determinar no laboratório a concentração de cada variável e outra com dados pareados para ajustar os dados por sexo idade, presença de doença periodontal e cárie, que pudesse influenciar no resultado, no grupo caso. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ e R^2 sejam maiores que 0,98, respectivamente.

Para avaliação da normalidade dos dados foi usado o Teste Shapiro Wilk por compreender uma amostra de 40 participantes.

4 CAPITULO 1

- ARTIGO

Título:

ESTADO OXIDATIVO SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

Autores

Cristina Berrocal Salazar

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

Rafaela Cristina Costa Carlos

Estudante de Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

Cassius Carvalho Torres-Pereira

Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

José Miguel Amenábar Céspedes*

Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

* Endereço para correspondência: José Miguel Amenábar Céspedes
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do
Paraná

Av. Pref. Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico

80210-170 Curitiba, PR.

Tel: +55(41) 3360-4024 / Fax: +55(41) 3360-4134

jamenaba@gmail.com

RESUMO

O estresse oxidativo (EO) é considerado um fator na etiopatogênese da anemia de Fanconi (AF) devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio nas células destes indivíduos. Por outro lado, o EO também é responsável por produzir alterações genéticas que promovem a iniciação e a proliferação de neoplasias malignas. Por causa das mutações genéticas que a AF apresenta, as células não possuem a capacidade de reparação do DNA. Portanto um aumento no EO pode provocar aberrações cromossômicas e mutações, aumentando assim a chance do aparecimento de lesões malignas, entre as quais podemos citar o carcinoma espinocelular (CEC). A saliva tem um papel importante no equilíbrio do estado oxidativo intrabucal. No entanto, o aumento na quantidade de radicais livres pode favorecer o aparecimento do CEC. Considerando as evidências mencionadas, o objetivo deste trabalho foi determinar o estado oxidativo da saliva de indivíduos com AF. Foi coletada saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com AF e de indivíduos saudáveis (controles). Em ambos os grupos foram analisadas as seguintes variáveis: estado oxidante total (EOT), capacidade antioxidante total (CAT), vitamina C, vitamina E. Todas as análises foram realizadas laboratorialmente por espectrofotometria e a comparação estatística através dos testes t e Mann Whitney, escolhendo $p < 0,05$ para rejeição da hipótese nula. Os resultados mostraram que a CAT teve uma média estatisticamente maior em ambas as salivas analisadas, assim como as concentrações de vitamina C. Dentro dos limites do estudo pode-se concluir que os indivíduos com AF tem o estado oxidativo alterado.

Palavras-chave: Antioxidantes. Oxidantes. Estresse oxidativo. Saliva. Anemia de Fanconi.

ABSTRACT

Oxidative stress (OE) is considered a factor on the etiopathogenesis of Fanconi anemia (FA) due to its excessive production of reactive oxygen species on their cells. On the other hand, OE is also responsible for producing genetic alterations that promote the initiation and proliferation of malignant neoplasms. As in individuals with FA, cells do not have an efficient DNA repair capacity; the increase in OE can cause chromosomal aberrations and mutations, thus increasing the appearance chance of malignant lesions, among them, squamous cell carcinoma (SCC). Saliva has an important role in intraoral oxidative balance; however, the increase in the amount of salivary free radicals may promote the onset of SCC. Considering this, the aim of this study is to determine the salivary oxidative status of individuals with FA. Stimulated saliva was collected from patients with FA and healthy individuals (controls). In both groups the following variables were analyzed: Total oxidant status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), vitamin C, vitamin E. All laboratory assessments were performed by spectrophotometry. T test and Mann Whitney were used choosing $p < 0.05$ for statistical differences. The results showed that, TAC was statistically higher in both of analyzed saliva, and so were vitamin C concentrations. Within the study limits it can be concluded that, individuals with FA have an altered oxidative status.

Keywords: Antioxidants, oxidants, oxidative stress, saliva, Fanconi anemia.

INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) é definida como uma síndrome de fragilidade cromossômica, autossômica recessiva, caracterizada por apresentar malformações congênitas diversas em 70% dos casos e em diferentes órgãos. Estas manifestações clínicas se agrupam em quatro grandes grupos: defeitos ou anomalias físicas existentes ao nascimento, endocrinopatias e falhas no crescimento, ocorrência de tumores sólidos malignos e anomalias, que incluem a insuficiência medular e desenvolvimento de leucemia ou síndromes mielodisplásicas, resultando em incontáveis fenótipos nestes pacientes (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003), com uma patogênese muito diversa e pouco compreendida.

São poucos os estudos sobre a condição bucal em portadores de AF (TEKCICEK et al., 2007, AÇIKGÖZ et al., 2005; DE ARAUJO et al., 2007 ;LYKO, et al., 2013, CAVALCANTI et al., 2015) e reportam com uma alta frequência à presença de lesões em mucosa bucal, principalmente de origem traumática, como hiperkeratoses, e em menor prevalência, lesões leucoplásicas (CAVALCANTI et al., 2015). Fato que é de alta relevância ao associar a predisposição destes pacientes a desenvolver tumores sólidos malignos, visto que as leucoplasias são lesões com potencial de malignização (VAN DER WAAL, 2009).

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre o número total de oxidantes ou espécies reativas do oxigênio (ERO) contra a capacidade antioxidante total, em favor dos oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (JONES, 2006) podendo produzir alterações nos componentes biológicos.

Os indicadores do estresse oxidativo incluem bases de DNA alteradas, produtos de oxidação de proteínas, estado oxidante total alterado, e produtos de peroxidação de lipídeos que podem relacionar-se com o desenvolvimento de lesões malignas (HALLIWELL et al., 1999), ou na patogênese de várias doenças degenerativas crônicas, (HALLIWELL, 1994) como a anemia de Fanconi (PAGANO et al., 2003).

Alguns autores atribuem à toxicidade excessiva do oxigênio molecular nas

células dos pacientes a causa da anemia de Fanconi (AF), relacionando o estresse oxidativo com a doença, considerando-o como um fator crítico na patogênese da mesma (DU et al., 2008; LI et al., 2014). Outros autores, baseados no fenótipo da doença, sugerem que AF é uma doença relacionada com a formação de ERO (PAGANO et al., 2003).

Propõe-se então, na literatura, uma associação entre o fenótipo clínico da AF e o estresse oxidativo como um fator etiológico da doença. Por exemplo, atribui-se o desenvolvimento da falência medular à produção de ERO, resultante do contato com agentes físicos e químicos, baseados na conhecida sensibilidade das células hematopoiéticas as ERO.

Além disso, o estresse oxidativo está relacionado a outras características clínicas da doença, como a pigmentação anormal da pele, que é atribuída a mecanismos moleculares regulados por processos redox, sendo responsáveis os processos oxidativos na biossíntese da melanina, relacionado com a expressão de Tiorredoxina. Outras malformações podem dar-se pela exposição ao estresse oxidativo no desenvolvimento intrauterino. De fato, na literatura existe uma controvérsia se o fenótipo dos pacientes com AF reflete um cenário de resposta deficiente ao dano ao DNA ou deve-se apenas a um desequilíbrio no estado oxidativo do paciente (AHMAD, 2006).

Os pacientes com AF apresentam um alto risco de desenvolver lesões malignas precocemente, apresentando mais chances de desenvolver tumores de cabeça e pescoço quando comparados com a população em geral (TISCHKOWITZ et al., 2003; KUTLER et al., 2003; ACIKGOZ et al., 2005). Sua predisposição parece estar ligada a uma falha no mecanismo de reparo que estes pacientes apresentam no DNA, o que deve resultar em mutações, aumentando chance de transformações malignas. (ALTER, 1996; ROSENBERG et al., 2003). Pela mesma causa, a detecção precoce de lesões potencialmente malignas é de extrema importância nestes indivíduos, uma vez que os tratamentos com radioterapia e quimioterapia são contraindicados, devido a excessiva toxicidade, deixando somente a possibilidade de cirurgia, que pode ser curativa só em casos de detecção precoce e sem disseminação (SALUM et al., 2006).

No câncer, o estresse oxidativo pode ativar os fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas reguladoras do ciclo celular, e as

moléculas de processos antiinflamatórios. Como o estresse oxidativo ativa vias inflamatórias que levam à transformação de uma célula normal em célula tumoral, as observações sugerem que o estresse oxidativo, inflamação crônica e o câncer estão intimamente ligados (REUTER et al., 2010). A extensão do dano ao DNA é proporcional à magnitude do estresse oxidativo. Este estresse reflete o dano dos agentes oxidantes e a efetividade da capacidade de defesa dos antioxidantes (A O X) (BAHAR et al., 2007).

Células com um funcionamento normal reconhecem e eliminam ou reparam esses danos ao DNA, mas células com defeito na reparação de DNA pode resultar em aberrações cromossômicas, como as observadas em AF (NORDENSON et al., 1977). Esta situação é de suma importância, sendo os pacientes com anemia de Fanconi suscetíveis ao desenvolvimento de massas tumorais sólidas, e tendo um comprovado estresse oxidativo intrínseco.

A saliva pode demonstrar praticamente todo o espectro de estados normais e de doença de um indivíduo. Quase tudo o que pode ser medido no sangue também pode ser medido na saliva (KAUFMAN et al., 2002). A saliva tem também um papel importante no equilíbrio do estresse oxidativo intrabucal, por ser considerada um fluido com potencial antioxidante. No entanto, o aumento na quantidade de ERO no fluido salivar pode favorecer o aparecimento de câncer espinocelular de boca, como observado no estudo de Nagler e colaboradores, no qual a saliva ao perder sua capacidade antioxidante se converteu em um fluido pró-oxidante (NAGLER et al., 2006). Frente a estas evidências, esta pesquisa se propôs a estudar pela primeira vez em indivíduos com AF o estado oxidativo salivar.

MATERIAIS E MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná com parecer de número 1.032.358. Os indivíduos foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação voluntária na pesquisa.

POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes do presente estudo são todos os pacientes com anemia de Fanconi em pré-transplante atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Paraná (HC UFPR).

A amostra foi por conveniência. Após passar pela consulta médica, os pacientes elegíveis eram convidados a participar do estudo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes com diagnóstico de AF não transplantados no HC UFPR com idade igual ou superior a 4 anos, no período de maio a novembro 2015.

Uma vez coletado um caso, procurava-se o controle saudável. Cada controle foi cuidadosamente selecionado segundo o sexo e a idade do indivíduo previamente coletado com anemia de Fanconi.

Todos os participantes do grupo controle foram saudáveis sistemicamente, não apresentavam doenças orais e não faziam uso de nenhum medicamento. Foram abordados em escolas de Curitiba, da triagem da Clínica de odontopediatria, e de estudantes de Odontologia.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os participantes que não estavam aptos para cuspir, tabagistas, presença de outras doenças locais e/ou desordens sistêmicas.

Indivíduos em uso de medicação com vitamina C e /ou vitamina E, assim como qualquer outro vitamínico, que pudesse influenciar nas concentrações salivares.

COLETA DE SALIVA E FLUXO SALIVAR

Foi solicitado aos participantes não comer, beber nem escovar os dentes por um período de, pelo menos, uma hora antes da coleta de saliva. As coletas de saliva foram feitas entre os períodos de 8:00 e 11:30h da manhã, sob condições padronizadas. Antes do início da coleta foi solicitado que deglutisse a saliva presente na cavidade bucal.

Foram coletadas saliva não estimulada e estimulada, com o objetivo de ver as diferenças entre as salivas sendo que na população em geral, a saliva estimulada apresenta maiores níveis de AOX, quando comparada com a não estimulada (NAGLER et al., 2002). O aumento do fluxo mediante a estimulação muda as

concentrações de vários constituintes da saliva (APS et al., 2004).

Para a coleta da saliva não estimulada, foi orientado para o paciente permanecer sentado com a boca aberta durante 5 minutos e que cuspsse conforme a saliva ficasse no assoalho de boca.

Na saliva estimulada foi coletada pelo método de spitting (o método do cuspe), sendo estritamente estimulada com um filme de parafina. A saliva coletada foi acondicionada em recipientes estéreis devidamente identificados. Durante a coleta, e para seu transporte, as amostras permaneceram em um isopor com gelo. As amostras foram centrifugadas a $9.030 \times g$ (10.000 RPM) durante 4 minutos.

A coleta da saliva dos controles seguiu o mesmo protocolo. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C e todas as análises realizadas em menos de 15 dias.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DA SALIVA

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Determinou-se a CAT pelo método de Erel (Erel, 2004), no qual as reações de radicais livres são iniciadas com a produção do radical hidroxilo por meio de reação de Fenton e a velocidade desta é monitorada seguindo a absorvância de radicais dianisidil coloridos.

Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75 mM de solução de Clark e Lubs (160 ml de KCl (75 mM) e 40 ml de HCl 37% (75 mM), pH final 1,8), 10 mM de o-dianisidina e 45 μM de Fe $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorvância de 450nm. Após a primeira leitura foi adicionada uma alíquota de uma solução 7.5 μM de H_2O_2 , preparada na solução de Clark e Lubs, e após de 7 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L.

DETERMINAÇÃO DO ESTADO OXIDANTE TOTAL (EOT)

O EOT foi determinado pelo método de Erel (EREL, 2005). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico na presença de várias espécies oxidantes em meio ácido e a medição do íon férrico pelo laranja de xilenol.

Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo: 150 μ M de xilenol, 140 μ M de NaCl, 90 ml de H₂SO₄ 25 μ M e 10 ml de glicerol 1,35 M. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras num leitor de microplaca a uma absorvância de 550 nm. Após a primeira leitura foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo: 5 mM de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O e 10 mM de o-dianisidina em 10 ml de H₂SO₄ 25 mM. Após 4 minutos, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com H₂O₂. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em μ mol H₂O₂ equivalente /L.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA E

A vitamina E foi determinada pela redução do Mo (VI) a Mo (V), produzida pelo analito da amostra e a subsequente formação do complexo fosfato/Mo(V) de cor verde a pH ácido (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

Uma alíquota de 100 μ l de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 1000 μ l de Reagente 1 (4 mM molibdato de amoníaco, 0.6 M ácido sulfúrico, 28 mM sódio fosfato). Posteriormente foi realizada a leitura das amostras a uma absorvância de 695 nm. Os resultados foram expressos em mmol/L (mM) e curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA C

A vitamina C foi determinada pela formação da cor proveniente da interação do ácido ascórbico com o reagente de Folin (Jagota e Dani, 1982). A saliva foi preparada com 0.2 ml de TCA 10%, depois colocada em um banho de gelo e por último uma centrifugação de 3000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 200 μ l de saliva de cada amostra preparada foi adicionada a uma solução contendo 1,5 ml de água miliQ e 0.2 de Folin. Posteriormente foi realizada a leitura das amostras a uma absorvância de 720 nm. Os resultados foram determinados mediante a fórmula de tomada de ensaio e expressos em mg/L.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados e organizados estatisticamente por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences® (versão 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Os resultados das variáveis foram analisados aplicando os testes t de student (para comparação dos grupos com distribuição normal dos dados) e de U

de Mann Whitney (para dados não paramétricos).

Foi realizada uma regressão linear, para determinar no laboratório a concentração de cada variável e outra com dados pareados para ajustar os dados por sexo idade, presença de doença cárie e periodontal, que pudesse influenciar no resultado, no grupo caso. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ e R^2 sejam maiores que 0,98, respectivamente.

Para avaliação da normalidade dos dados foi usado o Teste Shapiro Wilk por compreender uma amostra de 40 participantes.

RESULTADOS

A amostra do grupo com anemia de Fanconi foi composta por 40 indivíduos, não transplantados. A saliva estimulada foi coletada de todos os participantes, porém, a não estimulada, somente de 20, devido à dificuldade em obter saliva não estimulada nas crianças.

Os dados sócio-demográficos de cada indivíduo podem ser observados na Tabela 1 na qual a porcentagem de homens e mulheres é praticamente igual. A idade média da amostra foi de 14,5 anos (4 a 33 anos). A porcentagem de indivíduos que aguardavam o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é 67,5% e a média de tempo do diagnóstico foi de 5 anos. Nenhum dos participantes possuem restrição alimentar.

Os valores do EOT, CAT, vitamina E e vitamina C na saliva estimulada de todos os participantes e seus controles pode ser observada na da Tabela 2. Tanto a CAT como a Vitamina C apresentaram valores significativamente maiores nos indivíduos com AF.

O mesmo resultado foi observado na saliva não estimulada, porém, quando comparadas as médias de cada parâmetro entre os dois tipos de saliva, os da estimulada foram significativamente maiores, tanto na CAT quanto na Vitamina C, com um $p = 0,07$ e $p = 0,001$ respectivamente (Tabela 3).

Os participantes foram divididos de acordo com a faixa etária, sendo que, os de 4 a 11 anos foram considerados crianças, de 13 aos 17 anos como adolescentes, e adultos aqueles com idade superior a 18 anos.

Foram comparados os indivíduos com AF de cada faixa etária e resultou que, os adolescentes e adultos apresentaram maiores níveis de oxidantes do que

as crianças, o que foi estatisticamente significativo. Já entre adolescentes e adultos não houve diferenças significativas.

Quando se compararam os níveis de EOT, CAT, vitamina E e vitamina C dos indivíduos com AF em cada faixa etária com seus controles o comportamento da CAT e da vitamina C, continua igual ao das tabelas anteriores (maior nos indivíduos com AF). A CAT foi significativamente maior nos indivíduos com AF, em crianças e adolescentes especificamente. E a vitamina C foi maior nas crianças e adultos com AF do que nos controles. Todavia houve também uma diferença significativa entre as concentrações de oxidantes nas crianças, sendo maior nos controles. E os níveis de vitamina E foram maiores nos controles no grupo dos adolescentes (Tabela 4).

Também na tabela 4, nos resultados exclusivos do grupo controle, observou-se que eles tiveram significância estatística nas concentrações do EOT, sendo maior sua concentração nos adultos quando comparado com as crianças e adolescentes. Porém quando comparadas as concentrações nas crianças e os adolescentes, os valores não apresentaram significância estatística. Na CAT, todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre eles, diminuindo segundo a faixa etária da amostra. Por outro lado nas concentrações de vitaminas esse efeito não foi linear, e apresentaram um $p < 0,05$ nas concentrações de vitamina E no grupo dos adolescentes quando comparados com crianças e adultos, sendo os primeiros aqueles que tinham valores superiores. Nas concentrações de vitamina C, adolescentes e adultos tiveram significâncias estatísticas quando comparados com as crianças, sendo as crianças as que apresentavam uma menor concentração.

Além da divisão por idade, os participantes foram agrupados de acordo com o gênero (Tabela 5). Compararam-se os valores dos homens e das mulheres em cada faixa etária, e resultou que: nas crianças o EOT e a CAT foi maior no sexo masculino, e a vitamina C foi maior no sexo feminino. Já nos adolescentes foi no sexo feminino que tiveram um maior EOT, por último na faixa etária dos adultos somente a vitamina E que teve uma diferença estatística, sendo um valor maior no sexo masculino. Quando foram comparados os controles de cada faixa etária, somente houve diferenças significativas nas concentrações de vitamina E, nos adolescentes, sendo maior no sexo masculino, e nos adultos as

concentrações de vitamina E e C que também apresentou concentrações maiores no sexo masculino. (Tabela 5). Os testes estatísticos entre os controles e os indivíduos com AF não foram apresentados porque obteve-se os mesmos resultados quando divididos somente por idade.

DISCUSSÃO

Atualmente, apesar da demonstração do papel do estresse oxidativo na patogênese da anemia de Fanconi (PAGANO et al., 2015), as conclusões sobre o estado oxidativo salivar em indivíduos com AF são incertas. Desta forma torna-se um estudo importante, por analisar o perfil de oxidantes e antioxidantes da saliva secretada de um amplo número de pacientes com AF não transplantados. Um aspecto interessante foi o aumento da CAT e da Vitamina C dos indivíduos com AF.

A CAT sempre foi maior, quando comparado com o controle, embora a EOT não apresenta-se valores elevados. Isto sugere um aumento no comportamento de defesa do organismo. Uma possível explicação perante esse aumento do CAT, é o fato da AF ser uma doença conhecida por manter um estresse oxidativo intrínseco, o que pode produzir uma necessidade de aumentar essa defesa no organismo completo (ZALEWSKA et al. 2014) e estar frente a uma resposta do organismo para a condição da doença.

Como a vitamina C está dentro dessa capacidade antioxidante elevada, o fato de encontrar seus níveis aumentados, sugere que a vitamina C influenciou nesse resultado. Porém a vitamina E, não teve esse comportamento. Por isso, um dado importante para avaliar seria a dieta; a qual, nesta pesquisa, foi realizada apenas uma pergunta sobre restrição de algum grupo alimentício. A dieta seria importante pois as vitaminas antioxidantes provém dela (HALLIWELL et al., 1995), e sua concentração se vê afetada pelo consumo. Em um estudo foi avaliada a suplementação de AOX no organismo e foi sugerido que além de melhorar a condição sistêmica do participante, aumentou as concentrações do parâmetros mensurados, os quais foram analisados em plasma (ASSMANN et al., 2015).

Estudos futuros podem direcionar maiores questões a respeito da frequência e qualidade das refeições, para obter mais informações sobre o perfil vitamínico da saliva. Não obstante, um outro estudo no qual se avaliaram 44

indivíduos com AF, encontrou-se que 52% apresentavam uma baixa renda familiar (FURQUIM et al., 2014), o que poderia refletir na dieta da família, sugerindo que a metade da amostra não tem as condições econômicas para seguir uma dieta rica em vitaminas (GALOBARDES, et al., 2001).

A CAT considera a ação sinergista e cumulativa dos antioxidantes presentes na amostra biológica, conferindo essa capacidade de eliminar os radicais livres (RL). Porém uma explicação do porquê no grupo com AF, a vitamina C apresentou diferença significativa e a vitamina E não, pode ter sido ocasionado pelo fato da CAT depender de muitos outros fatores, como o envelhecimento, a doença base, tratamentos farmacológicos, entre outros (ZALEWSKA et al. 2014).

Na literatura existe somente um outro estudo no qual se avaliaram as concentrações de antioxidantes (AOX) em comparação com um grupo controle (PAGANO et al., 2004). Neste estudo foi medido em plasma concentrações de vitamina C, ácido úrico e vitamina E, e não apresentaram nenhuma diferença em relação ao grupo controle (PAGANO et al., 2004).

Estudos mais específicos devem ser feitos para saber quais desses antioxidantes estão elevados na saliva, pois pode ser produto de um desequilíbrio ao nível nuclear, de sinalização, que por sua vez provoca uma sobrevida celular, e uma conseqüente formação de tumores sólidos, como foi explicado por Li et al. (LI et al., 2014).

As metodologias utilizadas neste estudo por ser colorimétricas apresentam apenas uma estimativa, que reflete as concentrações dos parâmetros estudados, porém, como não são métodos específicos apresentam uma limitação. Para isso recomendam-se novos estudos re-dirigidos a traçar um perfil salivar dos antioxidantes e métodos mais específicos para avaliar dano oxidativo na cavidade oral desses indivíduos.

Esse comportamento de defesa antioxidante mantém-se, em menor medida (concentrações mais baixas), na saliva não estimulada, quando comparada com a saliva estimulada (Tabela 3), conferindo credibilidade aos testes laboratoriais, vendo que o curso da doença é a mesma nos dois tipos de saliva.

Como o envelhecimento é uma condição conhecida, no qual o estresse oxidativo tem muita influência (HERSHKOVICH, et al., 2007), se dividiram os

parâmetros por idade, os quais estão elucidados na tabela 4.

Com respeito aos parâmetros salivares comparados entre as diferentes faixas etárias dos indivíduos com AF (Tabela 4), os adolescentes e adultos se comportam de maneira semelhante, sem mostrar diferenças significativas. Talvez, pelo fato de ter um envelhecimento precoce (NEVELING et al., 2009), no qual os adolescentes apresentam já características iguais ou muito parecidas aos adultos. Esse dado é de difícil estudo, pois a expectativa de vida nestes pacientes ainda é curta, fato pelo qual não se sabe se esses parâmetros chegam a um pico na adolescência e continuam assim, ou se há uma mudança quando mais velhos, como observado no envelhecimento de um adulto saudável (SALVOLINI et al., 2000).

Se demonstra também, que a CAT aumentada pode estar relacionada aos valores dos grupos mais novos (crianças e adolescentes), o que era de se esperar, sendo que com o aumento de idade as defesas AOX do organismo vão diminuindo (HERSHKOVICH, et al., 2007). De fato um resultado muito importante do presente estudo foi o comportamento do EOT e da CAT nos controles quando foram divididos por faixas etárias (Tabela 4), no qual observou-se um aumento esperado de EOT e diminuição da CAT, conforme passam os anos dos indivíduos (HERSHKOVICH, et al., 2007; SALVOLINI et al., 2000).

A divisão em grupos foi feita baseado no artigo de Pagano e Cols., no qual houve diferenças por sexo e idade (PAGANO et al., 2004). No presente estudo teve-se a vantagem, que os grupos de cada faixa etária ficaram distribuídos de forma homogênea, diminuindo a influência negativa que o tamanho da amostra pode ter nas diferenças estatísticas.

Quando foi comparado cada parâmetro segundo o sexo, resultou que a maioria das diferenças estatísticas foram maiores no sexo masculino, diferente ao encontrado por Pagano et al., porém seus experimentos foram in vitro (PAGANO et al., 2004). Quanto às diferenças encontradas nos controles o mais provável é que sejam pela dieta, já que estas apresentaram-se somente nas concentrações de vitaminas (Tabela 5).

Cabe ressaltar que na AF, por ser uma doença rara, geralmente os estudos apresentam números de amostras pequenos. Com respeito a sua cavidade bucal, este estudo é um dos que apresenta uma das maiores amostras (AÇIKGÖZ et al.,

2005; DE ARAUJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007; LYKO et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015).

Dessa forma, este estudo abre caminho para uma nova área de pesquisa nos indivíduos com anemia de Fanconi, no qual o comportamento do estresse oxidativo da doença parece provocar localmente, na boca, alterações no sistema de defesa. Porém, ainda muito deve ser feito para compreender o porquê da preferência das mucosas no aparecimento de tumores sólidos como o carcinoma espinocelular.

CONCLUSÃO

Indivíduos com AF tem o estado oxidativo alterado, com os níveis de CAT e vitamina C aumentados quando comparada com os controles.

CONFLITO DE INTERESSE

Este trabalho não apresenta nenhum conflito de interesse na sua elaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAGASETA DE ILURDOZ, M.; MOLINA, J.; LEZÁUN, I., VALIENTE, A.; DURÁN G. Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales ANALES Sis San Navarra v. 1, n. 26 p. 63-78, 2003. ISSN 1137-6627
2. TEKCICEK, M., et al. Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. **Pediatric Dentistry**. v. 29, n.3, p. 248-252, 2007.
3. ACIKGOZ, A. et al. Oral and dental findings in Fanconi's anemia. **Pediatr Hematol Oncol**. v. 22, n. 6, p. 531-9, Sep 2005.
4. DE ARAUJO, MR. et al. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. **Oral Diseases**. v. 13,n. 1, p. 291–295, 2007.
5. LYKO K, BONFIM C, BENELLI EM, et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. **Anaerobe**. v. 64, n. 13, p. 153-154, 2013.
6. GREIN CAVALCANTI L.; LYKO KF.; FUENTES R. A.; AMENABAR J. M.; BONFIM C.; TORRES-PEREIRA C. C. Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation: an underdiagnosed phenotype. **Pediatric Blood & Cancer**.v. 62, n. 6, p. 1024-1026, 2015.
7. VAN DER WAAL I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**. v. 45 n. 4, p. 317-323, 2009.
8. JONES DP. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & redox signaling**. v. 8, n. 9, p. 1865–1879 , 2006.
9. HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine (3rd edn.) Oxford Science Publications, Oxford (1999).

10. HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. **Lancet** v. 344 p. 721-724, 1994.
11. PAGANO G, MANINI P, BAGCHI D. Oxidative stress-related mechanisms in chromium(VI)-induced toxicity to Fanconi anaemia cells. **Environ Health Persp.** v. 111, n. 1, p. 1699–1703, 2003.
12. DU W, ADAM Z, RANI R, ZHANG X, and PANG Q. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. **Antioxid Redox Signal.** v.10, p. 1909–1921, 2008.
13. LI J, Pang Q. Oxidative Stress-Associated Protein Tyrosine Kinases and Phosphatases in Fanconi Anemia. **Antioxidants & redox signaling.** v. 20, n. 14, p. 2291-2301, 2014.
14. AHMAD SI, KIRK S. **Molecular Mechanisms of Fanconi Anemia.** (1st ed.), Springer, US (2006).
15. TISCHKOWITZ MD, HODGSON SV. Fanconi anaemia. **J Med Genet.** v. 40, p. 1-10, 2003.
16. ALTER, B. P. Fanconi's anemia and malignancies. **American Journal of Hematology.** v. 53, n.2, p. 99 - 110, 1996.
17. ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. Cancer incidence in persons with Fanconi's anemia. **Blood.** v. 101, n. 3, p.822-826, 2003.
18. SALUM, F. G. et al. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. **Braz Dent J,** v. 17, n. 2, p. 161-165, 2006.
19. REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med.** v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

20. BAHAR G, FEINMESSER R, SHPITZER T, POPOVTZER A, NAGLER RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. **Cancer**. v. 109, n. 1, p.54-59, 2007.
21. NORDENSON I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. **Hereditas**. v. 86, p. 147–150, 1977.
22. KAUFMAN, E.; LAMSTER I. B. The diagnostic application of saliva- A review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n,2, p.197-212, 2002.
23. NAGLER, R. et al. The Dual Role of Saliva in Oral Carcinogenesis. **Oncology**. v.71, p.10–17,2006.
24. EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Bioch**. v. 2, p. 112-119, 2004.
25. EREL O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**. v. 38, n.12, p. 1103-1111, 2005.
26. PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**. v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
27. JAGOTA SK, DANI HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. **Anal Biochem**. v. 127, p.178–182, 1982.
28. PAGANO G, D'ISCHIA M, PALLARDO FV. REVIEW-Fanconi Anemia (FA) and Crosslinker Sensitivity: Re-Appraising the Origins of FA Definition **Pediatr Blood Cancer**. v. 62, p. 1137–1143, 2015.

29. ZALEWSKA, A.; KNAS, M.; GINDZIENSKA-SIESKIEWICZ, E.; WASZKIEWICZ, N.; KLIMIUK, A.; LITWIN, K.; SIERAKOWSKI, S.; WASZKIEL, D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 43, p. 61–68, 2014.
30. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-8, 1995.
31. ASSMANN, KE, ANDREEVA VA, JEANDEL C, HERCBERG S, GALAN P, KESSE-GUYOT E. Healthy Aging 5 Years After a Period of Daily Supplementation With Antioxidant Nutrients: A Post Hoc Analysis of the French Randomized Trial U.VI.MAX. **American Journal of Epidemiology**. v.182, n. 8, p.694-704, 2015.
32. FURQUIM CP, PIVOVAR A, CAVALCANTI LG, ARAÚJO RF, SALES BONFIM CM, TORRES-PEREIRA CC. Mouth self-examination as a screening tool for oral cancer in a high-risk group of patients with Fanconi anemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. v. 118, n. 4, p. 440-446, 2014.
33. GALO BARDES B, MORABIA A, BERNSTEIN MS. Diet and socioeconomic position: does the use of different indicators matter? **Int J Epidemiol**. v. 30, n. 2, p. 334-40, 2001.
34. PAGANO G, DEGAN P, D'ISCHIA M, KELLY FJ, PALLARDO FV, ZATTERALE A, ANAK SS, AKISIK EE, BENEDEUCE G, CALZONE R, DE NICOLA E, DUNSTER C, LLORET A, MANINI P, NOBILI B, SAVIANO A, VUTTARIELLO E, AND WARNAU M. Gender- and age-related distinctions for the in vivo prooxidant state in Fanconi anaemia patients. **Carcinogenesis**. v. 25, p.1899–1909, 2004.
35. HERSHKOVICH O, SHAFAT I, NAGLER RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. **J Gerontol Ser A-Biol Sci Med Sci**. v. 62, p. 361–6, 2007.

36. NEVELING K, ENDT D, HOEHN H, SCHINDLER D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. **Mutat Res** v.668, p.73-91, 2009.

37. SALVOLINI E, MARTARELLI D, DI GIORGIO R, MAZZANTI L, PROCACCINI M, CURATOLA G. Age-related modifications in human unstimulated whole saliva: a biochemical study. **Aging Clin Exp Res.** v. 12 p.445–448, 2000.

TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas da amostra estudada de AF*.

Idade		
MÉDIA	14.5	
N	40	
Gênero (n, %)		
MASCULINO	19	47,50%
FEMENINO	21	52,50%
Precisam de TCTH	NÃO	SIM
N	13- 32,5%	27- 67,5%
Anos diagnóstico AF		
ME, rango	5,12	[0,4-18]

Fonte: O autor.

* Como os controles foram pareados por sexo e idade apresentam as mesmas características socio-demográficas.

Tabela 2. Parâmetros de saliva estimulada medidos em indivíduos com anemia de Fanconi, e os valores de *p*.

Parâmetros de saliva estimulada (n: 40)	Anemia de Fanconi (±DP)	Controle (±DP)	Valores <i>p</i>
EOT µmol/ml	3,720 (±4,310)	1,567 (±1,103)	0,443
CAT mmol/ml	0,591 (±0,367)	0,181 (±0,179)	≥0,001*
VITAMINA E mmol/ml	0,321 (±0,151)	0,301 (±0,160)	0,493
VITAMINA C mg/ml	0,006 (±0,004)	0,002 (±0,0018)	≥0,001*

*Significância estatística. DP= Desvio Padrão. Fonte: O autor.

Tabela 3. Parâmetros de saliva não estimulada medidos em indivíduos com anemia de Fanconi, e os valores de *p*.

Parâmetros de saliva não estimulada (n: 20)	Anemia de Fanconi (±DP)	Controle (±DP)	Valores <i>p</i>
EOT µmol/ml	1,250 (±0,889)	1,286 (±0,767)	0,595
CAT mmol/ml	0,239 (±0,1098)	0,065 (±0,0157)	0,007*
VITAMINA E mmol/ml	0,262 (±0,289)	0,298 (±0,196)	0,628
VITAMINA C mg/ml	0,0037 (±0,003)	0,0007 (±0,0006)	0,001*

*Significância estatística. DP= Desvio Padrão. Fonte: O autor.

Tabela 4. Parâmetros de saliva estimulada em indivíduos com AF e seus controles, divididos por idade.

PARAMETRO SALIVAR	ANEMIA DE FANCONI			CONTROLE		
	CRIANÇAS (4-12) N:16	ADOLESCENTES (13-17) N: 14	ADULTOS (> 18) N:10	CRIANÇAS (4-12) N:16	ADOLESCENTES (13-17) N: 14	ADULTOS (> 18) N:10
EOT µmol/ml	0,518 * (±0,475)	4,119 (±4,726) **	5,822 (±4,601) **	1,383 (±1,017)	1,724 (±0,253)	5,853 # (±5,370)
CAT mmol/ml	0,662 * (±0,395)	0,546 * (±0,319)	0,563 (±0,504)	0,255 (±0,197) #	0,106(±0,173) #	0,085 # (±0,058)
VITAMINA E µmol/ml	0,318 (±0,092)	0,356 * (±0,236)	0,418 (±0,186)	0,283 (±0,123)	0,609(±0,391) #	0,290(±0,224)
VITAMINA C mg/ml	0,007 * (±0,004) ***	0,003 (±0,0016)	0,0061* (±0,004)	0,0004 (±0,0001) #	0,0029 (±0,002)	0,00202 (±0,0016)

*Significância estatística quando comparado com controle. ** Significância estatística quando comparado com criança, grupo AF *** Significância estatística quando comparado com adolescente, grupo AF # Significância estatística, grupo controles. Fonte: O autor.

Tabela 5. Parâmetros de saliva estimulada em indivíduos com AF e seus controles divididos por sexo e idade.

FAIXA ETÁRIA	EOT $\mu\text{mol/ml}$ ME, (DP)	CAT mmol/ml ME, (DP)	VITAMINA E $\mu\text{mol/ml}$ ME, (DP)	VITAMINA C mg/ml ME, (DP)
CRIANÇAS (4-12 ANOS)				
AF				
HOMEM	2,136 (1,941)*	1,015 (0,112)*	0,341 (0,111)	0,010 (0,002)
MULHER	0,412 (0,413)	0,302 (0,166)	0,282 (0,038)	0,0044 (0,0041)*
CONTROLES				
HOMEM	1,341 (0,831)	0,302 (0,221)	0,305 (0,106)	0,0008 (0,0008)
MULHER	1,425 (1,233)	0,160 (0,143)	0,263 (0,141)	0,001 (0,001)
ADOLESCENTES (13-17 ANOS)				
AF				
HOMEM	0,951 (0,878)	0,668 (0,331)	0,366 (0,169)	0,006 (0,004)
MULHER	5,316 (4,983)*	0,363 (0,219)	0,486 (0,470)	0,0034 (0,0016)
CONTROLES				
HOMEM	1,593 (0,387)	0,164 (0,218)	0,722 (0,288)*	0,0041 (0,0017)
MULHER	1,696 (0,302)	0,0112 (0,001)	0,255 (0,106)	0,002 (0,002)
ADULTOS (18- 33 ANOS)				
AF				
HOMEM	7,487 (5,099)	0,513 (0,646)	0,829 (0,463)*	0,0066 (0,004)
MULHER	4,713 (4,338)	0,613 (0,578)	0,327 (0,142)	0,004 (0,0002)
CONTROLES				
HOMEM	5,846(4,650)	0,058 (0,061)	0,401 (0,165)*	0,003 (0,0004)*
MULHER	5,858 (6,241)	0,189 (0,179)	0,099 (0,086)	0,0004 (0,0001)

*Significância estatística; as comparações foram feitas entre sexo, dentre cada faixa etária.

Fonte: O autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Indivíduos com AF tem o estado oxidativo alterado, com os níveis de CAT e vitamina C aumentados quando comparada com os controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLSAMADI H, RAFIEIAN N, GOODARZI MT, FERADMAL J, DAVOODI P, JAZAYERI M, TAGHAVIZ, HOSEYNI S, AHMADI-MOTAMAYEL F. Levels of Salivary Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Patients with Oral Lichen Planus and Healthy Individuals. **Chonnam Med.** v. 50, p.58-62, 2014.

ABUJA PM., ALBERTINI R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin Chim Acta.** v. 306, p.1–17, 2001.

ACIKGOZ, A. OZDEN FO, FISGIN T, AÇIKGÖZ G, DURU F, YARALI N, ALBAYRAK D. Oral and dental findings in Fanconi's anemia. **Pediatr Hematol Oncol,** v. 22, n. 6, p. 531-539, 2005.

AHMAD SI, KIRK S. **Molecular Mechanisms of Fanconi Anemia,** (1st ed.), Springer, US (2006).

ALIEV G, PRIYADARSHINI M, REDDY VP, GRIEG NH, KAMINSKY Y, CACABELOS R, ASHRAF GM, JABIR NR, KAMAL MA, NIKOLENKO VN, ZAMYATNIN AA, BENBERIN VV, BACHURIN SO. Oxidative Stress Mediated Mitochondrial and Vascular Lesions as Markers in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. **Curr Med Chem.** v. 21, n. 19, p.2208-2217, 2013.

AL-RAWI NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. **Diab. Vasc. Dis. Res.** v. 8, p.22–28, 2011.

ALTER, B. P. Fanconi's anemia and malignancies. **American Journal of Hematology.** v. 53, n.2, p.99 - 110, 1996.

ALTER, B. P. Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients. **Radiotherapy and Oncology.** v. 62, n. 3, p.345–347, 2002.

ALTER, B. P. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. **Cancer**. v.97, n. 2, p. 425–440, 2003.

ALTER BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. **Pediatr Transplant**. v. 9, n. 7, p.81-86, 2005.

ASSMANN, KE, ANDREEVA VA, JEANDEL C, HERCBERG S, GALAN P, KESSE-GUYOT E. Healthy Aging 5 Years After a Period of Daily Supplementation With Antioxidant Nutrients: A Post Hoc Analysis of the French Randomized Trial U.VI.MAX. **American Journal of Epidemiology**. v.182, n. 8, p.694-704, 2015.

ASTANEIE F, AFSHARI M, MOJTAHEDI A, MOSTAFALOU S, ZAMANI MJ, LARIJANI B, ABDOLLAHI M. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. **Arch. Med. Res**. v. 36, p. 376–381, 2005.

APS JK, MARTENS LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Sci Int**. v. 10, n. 150(2-3), p. 119-131, 2005.

AUERBACH AD. of Clinical Symptoms to Diepoxyhutane. **Blood**. v. 73, n. 2, p. 391–396, 1989.

AUERBACH AD. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 668, n. 1-2, p.4–10, 2009.

BAHAR G, FEINMESSER R, SHPITZER T, POPOVTZER A, NAGLER RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. **Cancer**. v. 109, n. 1, p.54-59, 2007.

BATTINO M, GREABU M, TOTAN A, BULLON P, BUCUR A, TOVARU S, MOHORA M, DIDILESCU A, PARLATESCU I, SPINU T, TOTAN C. Oxidative stress markers in oral lichen planus. **Biofactors**. v. 33, p.301–310, 2008.

BENEDETTI S, PRIMITERRA M, FINCO A, CANESTRARI F, CORNELLI U. Validation of a patented method to determine the antioxidant capacity of human saliva based on the reduction of iron: the SAT test. **Clin Lab.** v. 60, n. 3, p.475-82, 2014.

BLAKE DR. et al. Iron free radicals and arthritis. **Proc Nutr Soc,** v. 49, n. 2, p. 239-45, 1990.

BRIEGER K, SCHIAVONE S, MILLER FJ JR, KRAUSE KH. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med Wkly.** v. 17, n. 142, p.1-14, 2012.

CAVALCANTI LG, LYKO KF, FUENTES RA, AMENABAR JM, BOMFIM C, TORRES-PEREIRA CC. Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation: an underdiagnosed phenotype?. **Pediatric Blood & Cancer.** v. 62, n. 6, p. 1024-1026, 2015.

CHAKRABORTHY A, RAMANI P, SHERLIN HJ, PREMKUMAR P, NATESAN A. Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. **Indian J Dent Res.** v. 25, p.499-504, 2015.

CLARKSON PM, THOMPSON HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr.** v.72, n. 2, p. 637-46, 2000.

D'ANDREA AD, GROMPE M. Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. **Blood.** v. 90, p. 1725–1736, 1997.

DE ARAUJO, MR. DE OLIVEIRA RIBAS M, KOUBIK AC, MATTIOLI T, DE LIMA AA, FRANÇA BH. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. **Oral Diseases,** v. 13, n. 1, p.291–295, 2007.

DEEG HJ, SOCIÉ G, SCHOCH G, et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and Fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. **Blood.**v. 87, p.386-392, 1996.

DEGAN P, BONASSI S, DE CATERINA M, KORKINA LG, PINTO L, SCOPACASA F, ZATTERALE A, CALZONE R, PAGANO G.. In vivo accumulation of 8-hydroxy-2-dioxiguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. **Carcinogenesis**. v. 16, p. 735–741, 1995.

DIAB-LADKI R, PELLAT B, CHAHINE R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. **Clin Oral Investig**. v. 7, n. 2, p. 103-107, 2003.

DOKAL, I. The genetics of Fanconi's anaemia. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Haematology**. v. 13, n. 3, p. 407–425, 2000.

DU W, ADAM Z, RANI R, ZHANG X, and PANG Q. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. **Antioxid Redox Signal** 10: 1909–1921, 2008.

EL-BASSYOUNI HT, AFIFI HH, EID MM, KAMAL RM, EL-GEBALI HH, EL-SAEED G, ET AL. Oxidative stress -a phenotypic hallmark of Fanconi anemia and Down syndrome: The effect of antioxidants. **Ann Med Health Sci Res**. v.5, p. 205-12, 2015.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Bioch**. v. 2, p. 112-119, 2004.

EREL. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, v. 38, n. 12, p.1103-1111, 2005.

FRANCO R, SÁNCHEZ-OLEA R, REYES-REYES EM, PANAYIOTIDIS MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. **Mutation Research** v. 674 p.3–22, 2009.

FERREIRA AL, MATSUBARA LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar 1997.

FREI B, ENGLAND L, AMES BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 88, p.6337-6381 1989.

FREI B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **Am J Med**. v. 97, p.5-13, 1994.

FURQUIM CP, PIVOVAR A, CAVALCANTI LG, ARAÚJO RF, SALES BONFIM CM, TORRES-PEREIRA CC. Mouth self-examination as a screening tool for oral cancer in a high-risk group of patients with Fanconi anemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. v. 118, n. 4,440-446, 2014.

GALOBARDES B, MORABIA A, BERNSTEIN MS. Diet and socioeconomic position: does the use of different indicators matter? **Int J Epidemiol**. v. 30, n. 2, p. 334-40, 2001.

GOW A J, ISCHIROPOULOS H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 3, p. 277-82, Jun 2001.

HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. **Lancet** v. 344 p. 721-724, 1994.

HALLIWELL B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine** (3rd ed.) Oxford Science Publications, Oxford (1999).

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. (4ta ed.) Oxford: Clarendon (2007).

HALLIWELL B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea. **Trends in Biochemical Sciences**. v.24, n.7, p.255-259, 1999.

HALLIWELL B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, n. 2, p. 501-14, 1986.

HEGDE AM, RAI K, PADMANABHAN V. Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries. **J Clin Pediatr Dent**. v. 33, n. 3, p. 231-234, 2009.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v. 26, n. 4, p. 277-85, 1989.

HERSHKOVICH O, SHAFAT I, NAGLER RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. **J Gerontol Ser A-Biol Sci Med Sci**. v. 62, p.361–6, 2007.

HORTON, R.; RICE-EVANS, C.; FULLER, B. J. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. **Free Radic Res Commun**, v. 5, n. 4-5, p. 267-75, 1989.

HYBERTSON BM, GAO B, BOSE SK, MCCORD JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 32, n. 4 p.234–46, 2011.

JAGOTA SK, DANI HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. **Anal Biochem**. v. 127, p.178–182, 1982.

JONES DP. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & redox signaling**. v. 8, n. 9, p. 1865–1879 , 2006.

JOENJE H, PATEL KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. **Nat Rev Genet**. v. 2, p. 446-459, 2001.

KEE Y & D'ANDREA AD Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. **Genes Dev**. v. 24, p, 1680–1694, 2010.

KERVILLER E, GUERMAZI A, ZAGDANSKI A-M et al. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. **Clin Radiol**. v. 55, p. 340–345, 2000.

KUMARI U, YA JUN W, HUAT BAY B, LYAKHOVICH A. Evidence of mitochondrial dysfunction and impaired ROS detoxifying machinery in Fanconi anemia cells. **Oncogene**. v. 33, n. 2, p. 165-72, 2014.

KUTLER DI, SINGH B, SATAGOPAN J, BATISH SD, BERWICK M, GIAMPIETRO PF, HANENBERG H, AUERBACH AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**. v. 101, p.1249-1256, 2003.

KUTLER DI, AUERBACH AD, SATAGOPAN J, GIAMPIETRO PF, BATISH SD, HUVOS AG, GOBERDHAN A, SHAH JP, SINGH B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in patients with Fanconi anemia (FA). **Arch Otolaryngol**. v. 129, p. 106-112, 2003.

LI J, PANG Q. Oxidative Stress-Associated Protein Tyrosine Kinases and Phosphatases in Fanconi Anemia. **Antioxidants & redox signaling**. v. 20, n. 14, p. 2291-2301, 2014.

LIOCHEV, SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**. v.60, p. 1–4, 2013.

LYKO K, BONFIM C, BENELLI EM, TORRES-PEREIRA CC, AMENÁBAR JM. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. **Anaerobe**. v. 24, p.32-35, 2013.

MCCALL MR, FREI B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 7-8, p.1034-1053, 1999.

MCCORD J, FRIDOVICH I. Superoxido dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**. v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MELLO FILHO AC, HOFFMANN ME, MENEGHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984.

MINOTTI G, AUST SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, v. 262, n. 3, p. 1098-1104, 1987.

NAGLER RM, KLEIN I, ZARZHEVSKY N, DRIGUES N, REZNICK AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 32, n. 3, p.268-77, 2002.

NAGLER R, DAYAN D. The Dual Role of Saliva in Oral Carcinogenesis. **Oncology**. v.71 p.10–17, 2006.

NEVELING K, ENDT D, HOEHN H, SCHINDLER D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. **Mutat Res**. v.668, p. 73-91, 2009.

NORDENSON I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. **Hereditas**. v. 86, p.147–150, 1977.

PAGANO G, MANINI P, BAGCHI D. Oxidative stress-related mechanisms in chromium(VI)-induced toxicity to Fanconi anaemia cells. **Environ Health Persp**. v. 111, n. 1, p. 1699–1703, 2003.

PAGANO G, DEGAN P, D'ISCHIA M, KELLY FJ, NOBILI B, PALLARDO FV, YOUSSEOUFIAN H, AND ZATTERALE A. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. **Eur J Haematol.** v. 75, p. 93–100, 2005.

PAGANO G. Mitomycin C and diepoxybutane action mechanisms and FANCC protein functions: further insights into the role for oxidative stress in Fanconi's anaemia phenotype. **Carcinogenesis.** v. 21, n. 1, p.1067–1068, 2000.

PAGANO G, DEGAN P, D'ISCHIA M, KELLY FJ, PALLARDO FV, ZATTERALE A, ANAK SS, AKISIK EE, BENEDEUCE G, CALZONE R, DE NICOLA E, DUNSTER C, LLORET A, MANINI P, NOBILI B, SAVIANO A, VUTTARIELLO E, AND WARNAU M. Gender- and age-related distinctions for the in vivo prooxidant state in Fanconi anaemia patients. **Carcinogenesis.** v. 25, p. 1899–1909, 2004.

PAGANO G, TALAMANCA AA, CASTELLO G, PALLARDO FV, ZATTERALE A, AND DEGAN P. Oxidative stress in Fanconi anaemia: from cells and molecules towards prospects in clinical management. **Biol Chem.** v. 393, p. 11–21, 2012.

PAGANO G, TALAMANCA AA, CASTELLO G, D'ISCHIA M, PALLARDÓ FV, PETROVIC S, ET AL. From clinical description, to in vitro and animal studies, and backward to patients: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Fanconi anemia. **Free Radic Biol Med.** v.58, p. 118-25, 2013.

PAGANO G, D'ISCHIA M, PALLARDO FV. REVIEW-Fanconi Anemia (FA) and Crosslinker Sensitivity: Re-Appraising the Origins of FA Definition **Pediatr Blood Cancer.** v. 62, p. 1137–1143, 2015.

PARKINSON D. Oxygen free radicals: in search of a unifying theory of disease. **Intensive Crit Care Nurs.** v. 11, n. 6, p. 336-40, 1995.

PELIN K, HIRVONEN A, NORPPA H. Influence of erythrocyte glutathione S-transferase T1 on sister chromatid exchanges induced by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis.** v.11, p. 213–215, 1996.

PERERA RM, BARDEESY N. Cancer: When antioxidants are bad. **Nature**. v. 475, p.43–44, 2011.

PETTI S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**. v. 39, n. 8, p. 770–780, 2003.

PINCHEIRA J, BRAVO M, SANTOS MJ, DE LA TORRE C, LOPEZ-SAEZ JF. Fanconi anemia lymphocytes: Effect of DL- α -tocopherol (Vitamin E) on chromatid breaks and on G2 repair efficiency. **Mutation Research - DNA Repair**. v. 461, n. 4, p. 265–271, 2001.

PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry** v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

RAY A, MARTINEZ BA, BERKOWITZ LA, CALDWELL GA, CALDWELL KA. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neurodegeneration elicited by a bacterial metabolite in a *C. elegans* Parkinson's model. **Cell Death Dis**, v. 9, n.5, p.984, 2014.

REUTER, S. GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**. v. 49, n. 11, p. 1603-1166, 2010.

RECZEK CR, CHANDEL NS. ROS-dependent signal transduction. **Curr Opin Cell Biol**. v. 33: p. 8-13, 2015.

ROSS D, MOLDEUS P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress**. In Vigo-Pelfrey C (1 ed): Membrane lipid oxidation. CRC Press, 1991.

ROSENBERG PS, GREENE MH, ALTER B P. Cancer incidence in persons with Fanconi's anemia. **Blood**. v. 101, n. 3, p.822-826, 2003.

RUPPITSCH W, MEISSLITZER C, HIRSCH-KAUFFMANN M. SCHWEIGER M. Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. **FEBS Lett.** v. 422, p.99-102, 1998.

SAGASETA DE ILURDOZ M, MOLINA J, LEZÁUN I, VALIENTE, A, DURÁN G. Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales. **Anales sis san navarra.** v. 1, n. 26 p.63-78, 2003.

SALUM FG, MARTINS GB, DE FIGUEIREDO MA, CHERUBINI K, YURGEL LS, TORRES-PEREIRA C. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. **Braz Dent J.** v. 17, n. 2, p.161-5, 2006.

SARAL Y, COSKUN BK, OZTURK P, KARATAS F, AYAR A. Assessment of salivary and serum antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with recurrent aphthous ulceration. **Tohoku J. Exp. Med.** v. 206, p.305–312, 2005.

SCHULZ JC, SHAHIDI NT. Tumor necrosis factor- α overproduction in Fanconi's anemia. **Am. J. Hematol.** v. 42, p.196-201, 1993.

SCOTT MD. et al. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.** v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SHAN XQ, AW TY, JONES DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther,** v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SHARMA P, JHA AB, DUBEY RS, PESSARAKLI M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany.** v. 2012, n. 1, p. 1-26, 2012.

SOTILLO DR, VELLY AM, HADLEY M, FRICTON JR. Evidence of oxidative stress in temporomandibular disorders:a pilot study. **J Oral Rehabil.** v. 38, n.10, p.722– 728, 2011.

STOREY KB. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 1st ed., Wiley- Liss Publications, New Jersey; 2004. (Capítulo HERMES-LIMA, M.)

SU H, GORNITSKY M, VELLY AM, YU H, BENARROCH M, SCHIPPER HM. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. **Free Radic. Biol. Med.** v.46, p.914–921, 2009.

TEKCICEK M, TAVIL B, CAKAR A, PINAR A, UNAL S, GUMRUK F. Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. **Pediatric Dentistry.** v. 29, n.3, p.248-252, 2007.

TISCHKOWITZ MD, HODGSON SV. Fanconi anaemia. **J Med Genet.** v. 40, n. 1, p.1-10, 2003.

VAN DER WAAL I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45 n. 4, p.317-323, 2009.

WANG W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. **Nat Rev Genet.** v. 8, p.735–748, 2007.

WANG J, SCHIPPER HM, VELLY AM, MOHIT S, GORNITSKY M. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 85, p.95–104, 2015.

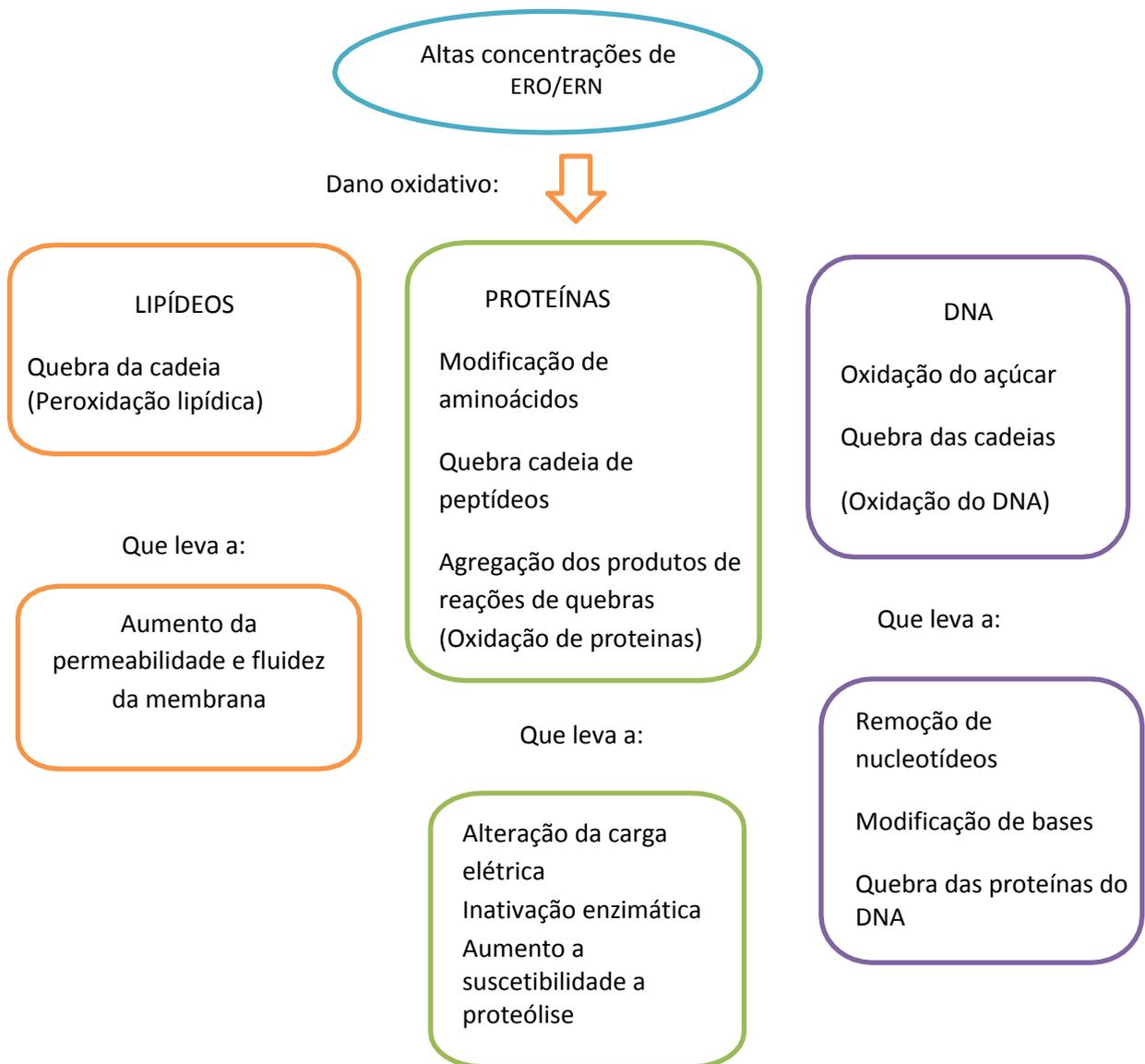
WINTERBOURN CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology.** v. 4, n. 5, p.278-286, 2008.

ZALEWSKA A, KNAS M, GINDZIENSKA-SIESKIEWICZ E, WASZKIEWICZ N, KLIMIUK A, LITWIN K, SIERAKOWSKI S, WASZKIEL D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 43, p.61–68, 2014.

APÊNDICES

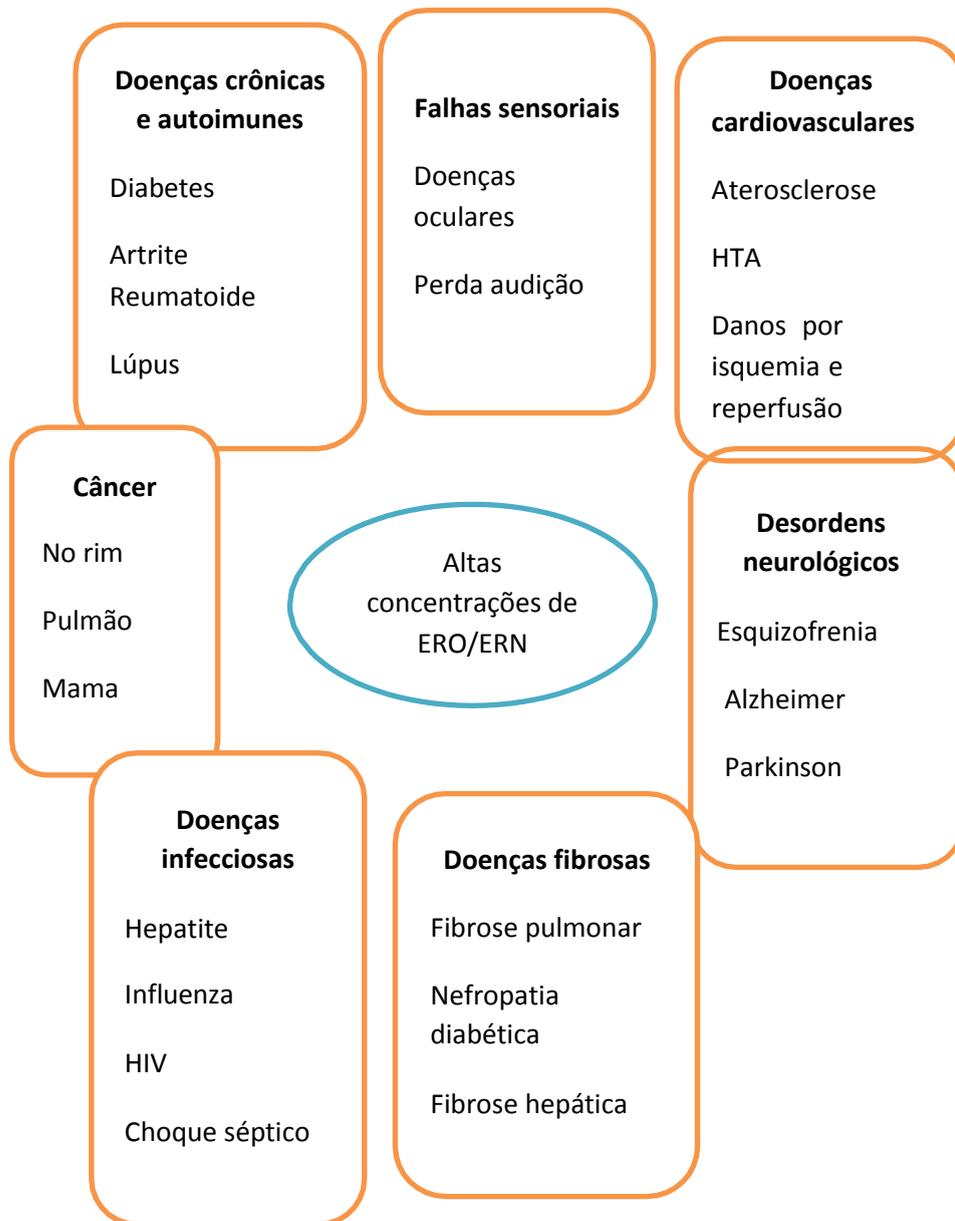
FIGURAS

FIGURA 1. Esquema resumo das alterações que o estresse oxidativo pode produzir nos diferentes componentes celulares (SHARMA et al., 2012).



(SHARMA et al., 2012).

FIGURA 2. Esquema resumo das doenças estudadas com relação no estresse oxidativo.



(BRIEGER et al., 2012).

FIGURA 3. Mecanismo de produção de EO e alterações fenotípicas na anemia de Fanconi. (Modificado de Li et al., 2014).

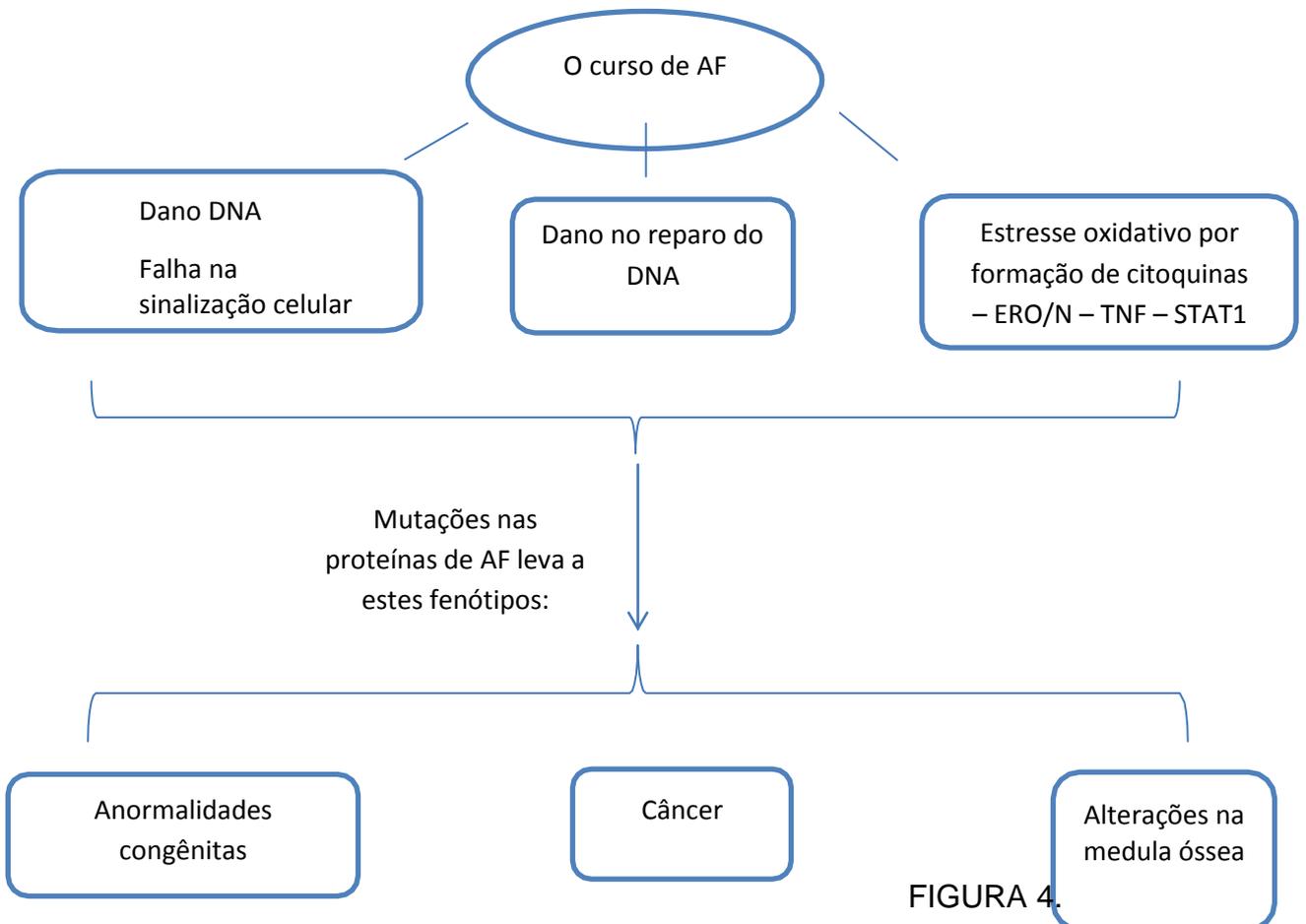
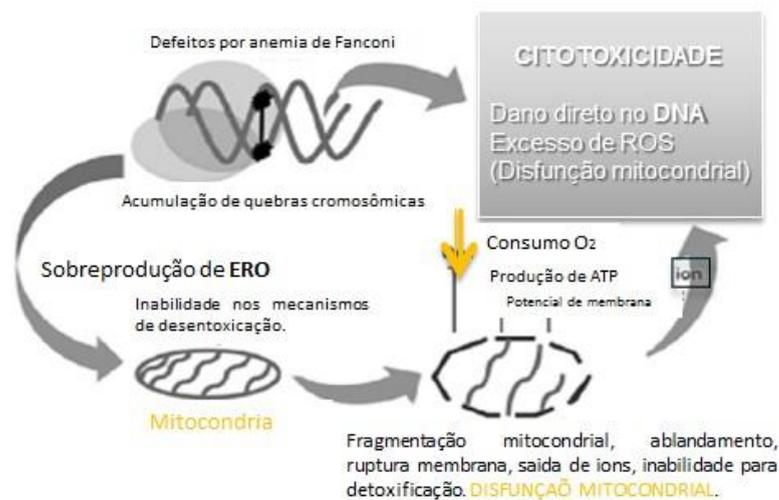


FIGURA 4.

Defeitos provocados por excesso de ERO na anemia de Fanconi a nível mitocondrial (Modificado de Kumari et al., 2012).



(Modificado de Kumari, 2012)

TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas da amostra estudada*.

Idade		
MÉDIA	14.5	
N	40	
Gênero (n, %)		
MASCULINO	19	47,50%
FEMENINO	21	52,50%
Precisam de TCTH	NÃO	SIM
N	13- 32,5%	27- 67,5%
Anos diagnóstico AF		
ME, rango	5,12	[0,4-18]

Fonte: O autor.

* Como os controles foram pareados por sexo e idade apresentam as mesmas características socio-demográficas.

Tabela 2. Parâmetros de saliva estimulada medidos em indivíduos com anemia de Fanconi, e os valores de *p*.

Parâmetros de saliva estimulada (n: 40)	Anemia de Fanconi (±DP)	Controle (±DP)	Valores <i>p</i>
EOT µmol/ml	3,720 (±4,310)	1,567 (±1,103)	0,443
CAT mmol/ml	0,591 (±0,367)	0,181 (±0,179)	≥0,001*
VITAMINA E mmol/ml	0,321 (±0,151)	0,301 (±0,160)	0,493
VITAMINA C Mg/ml	0,006 (±0,004)	0,002 (±0,0018)	≥0,001*

*Significância estatística. DP= Desvio Padrão. Fonte: O autor.

Tabela 3. Parâmetros de saliva não estimulada medidos em indivíduos com anemia de Fanconi, e os valores de *p*.

Parâmetros de saliva não estimulada (n: 20)	Anemia de Fanconi (±DP)	Controle (±DP)	Valores <i>p</i>
EOT µmol/ml	1,250 (±0,889)	1,286 (±0,767)	0,595
CAT mmol/ml	0,239 (±0,1098)	0,065 (±0,0157)	0,007*
VITAMINA E mmol/ml	0,262 (±0,289)	0,298 (±0,196)	0,628
VITAMINA C mg/ml	0,0037 (±0,003)	0,0007 (±0,0006)	0,001*

*Significância estatística. DP= Desvio Padrão. Fonte: O autor.

Tabela 4. Parâmetros de saliva estimulada em indivíduos com AF e seus controles, divididos por idade.

PARAMETRO SALIVAR	ANEMIA DE FANCONI			CONTROLE		
	CRIANÇAS (4-12) N:16	ADOLESCENTES (13-17) N: 14	ADULTOS (> 18) N:10	CRIANÇAS (4-12) N:16	ADOLESCENTES (13-17) N: 14	ADULTOS (> 18) N:10
EOT µmol/ml	0,518 * (±0,475)	4,119 (±4,726) **	5,822 (±4,601) **	1,383 (±1,017)	1,724 (±0,253)	5,853 # (±5,370)
CAT mmol/ml	0,662 * (±0,395)	0,546 * (±0,319)	0,563 (±0,504)	0,255 (±0,197) #	0,106(±0,173) #	0,085 # (±0,058)
VITAMINA E µmol/ml	0,318 (±0,092)	0,356 * (±0,236)	0,418 (±0,186)	0,283 (±0,123)	0,609(±0,391) #	0,290(±0,224)
VITAMINA C mg/ml	0,007 * (±0,004) ***	0,003 (±0,0016)	0,0061* (±0,004)	0,0004 (±0,0001) #	0,0029 (±0,002)	0,00202 (±0,0016)

*Significância estatística quando comparado com controle. ** Significância estatística quando comparado com criança, grupo AF *** Significância estatística quando comparado com adolescente, grupo AF # Significância estatística, grupo controles. Fonte: O autor.

Tabela 5. Parâmetros de saliva estimulada em indivíduos com AF e seus controles divididos por sexo e idade.

FAIXA ETÁRIA	EOT $\mu\text{mol/ml}$ ME, (DP)	CAT mmol/ml ME, (DP)	VITAMINA E $\mu\text{mol/ml}$ ME, (DP)	VITAMINA C mg/ml ME, (DP)
CRIANÇAS (4-12 ANOS)				
AF				
HOMEM	2,136 (1,941)*	1,015 (0,112)*	0,341 (0,111)	0,010 (0,002)
MULHER	0,412 (0,413)	0,302 (0,166)	0,282 (0,038)	0,0044 (0,0041)*
CONTROLES				
HOMEM	1,341 (0,831)	0,302 (0,221)	0,305 (0,106)	0,0008 (0,0008)
MULHER	1,425 (1,233)	0,160 (0,143)	0,263 (0,141)	0,001 (0,001)
ADOLESCENTES (13-17 ANOS)				
AF				
HOMEM	0,951 (0,878)	0,668 (0,331)	0,366 (0,169)	0,006 (0,004)
MULHER	5,316 (4,983)*	0,363 (0,219)	0,486 (0,470)	0,0034 (0,0016)
CONTROLES				
HOMEM	1.593 (0.387)	0.164 (0.218)	0.722 (0.288)*	0,0041 (0,0017)
MULHER	1,696 (0,302)	0,0112 (0,001)	0,255 (0,106)	0,002 (0,002)
ADULTOS (18- 33 ANOS)				
AF				
HOMEM	7,487 (5,099)	0,513 (0,646)	0,829 (0,463)*	0,0066 (0,004)
MULHER	4,713 (4,338)	0,613 (0,578)	0,327 (0,142)	0,004 (0,0002)
CONTROLES				
HOMEM	5,846(4,650)	0,058 (0,061)	0,401 (0,165)*	0,003 (0,0004)*
MULHER	5,858 (6,241)	0,189 (0,179)	0,099 (0,086)	0,0004 (0,0001)

*Significância estatística; as comparações foram feitas entre sexo, dentre cada faixa etária.

Fonte: O autor.

GRÁFICOS

Gráfico 1. (a) Média da concentração do EOT e CAT medidas em saliva estimulada.

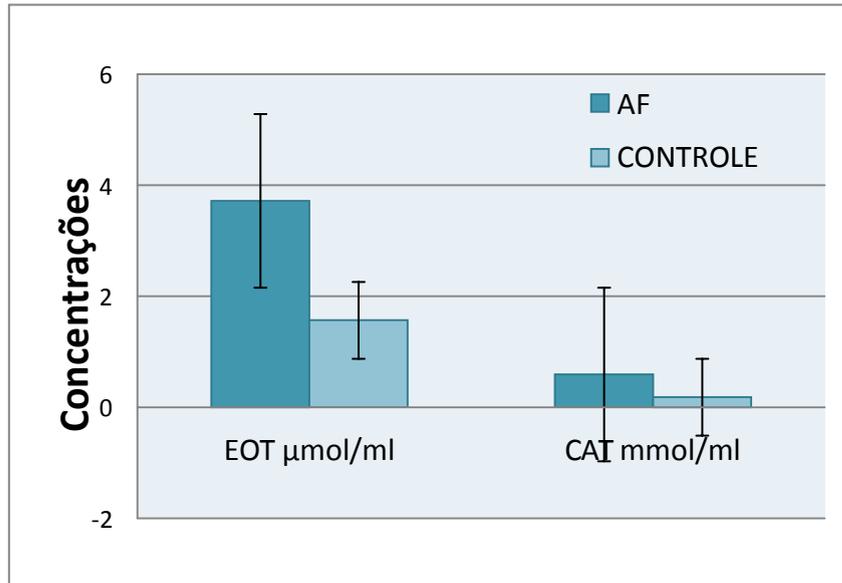


Gráfico 1. (b) Média da concentração de vitamina e medidas em saliva estimulada.

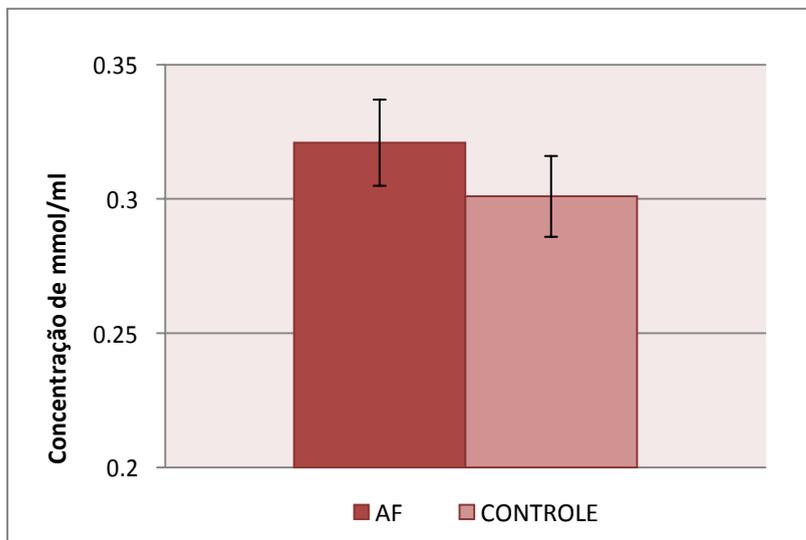


Gráfico 1. (c) Média da concentração de vitamina c medidas em saliva estimulada.

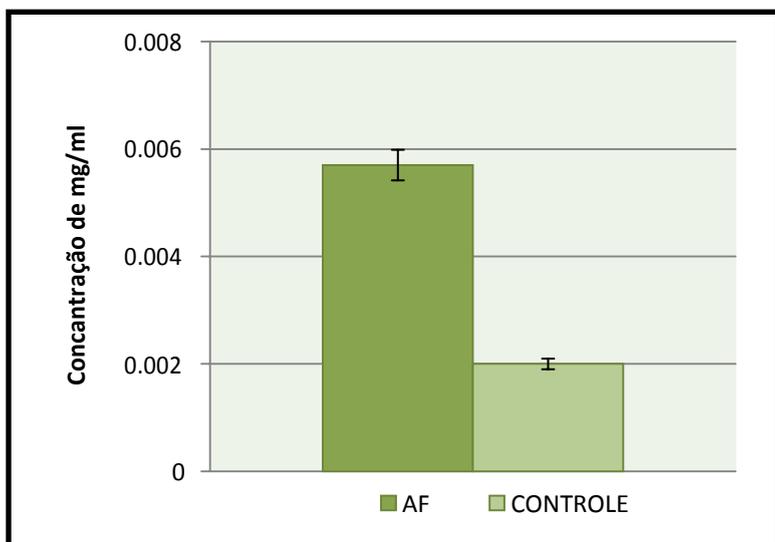


Gráfico 2. (a) Média da concentração de EOT e CAT, medidas em saliva não estimulada.

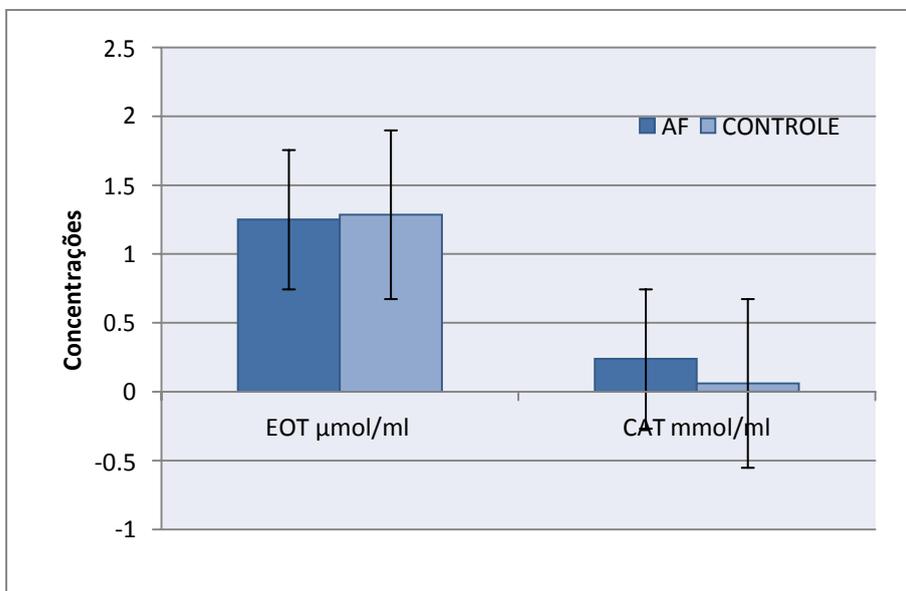


Gráfico 2. (b) Média da concentração de vitamina e medidas em saliva não estimulada.

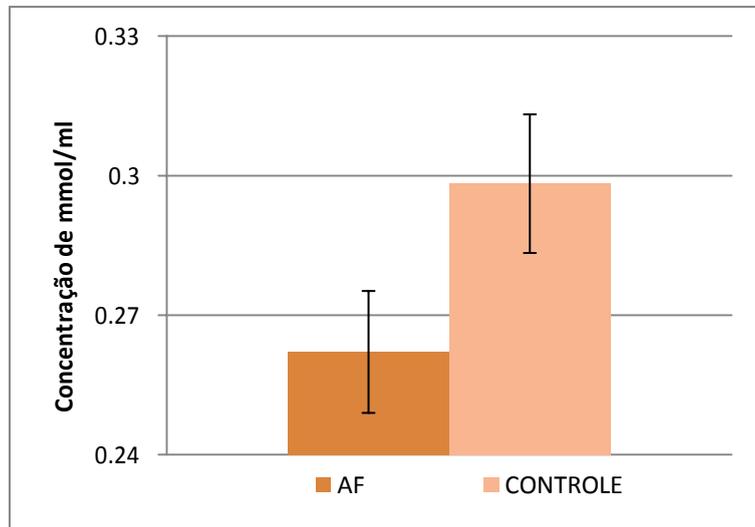
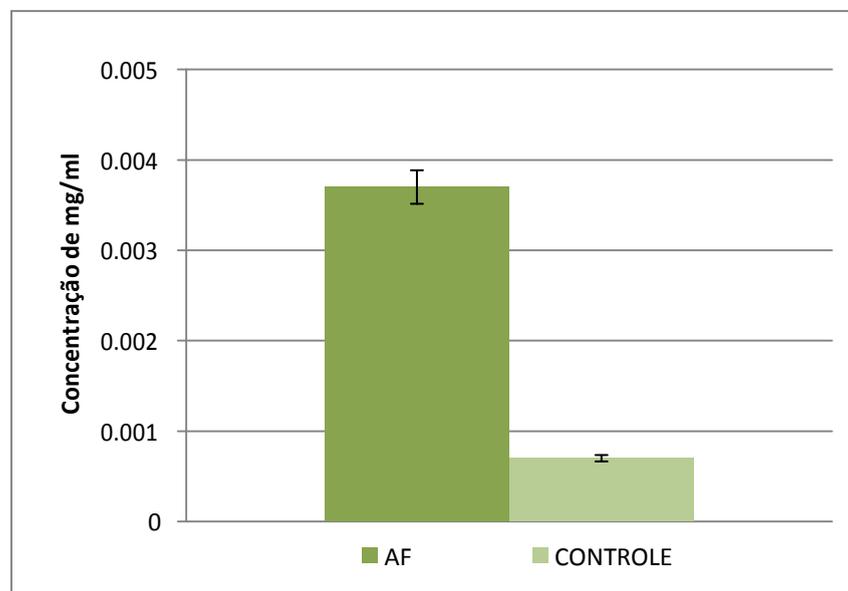


Gráfico 2. (c) Média da concentração de vitamina c medidas em saliva não estimulada.



ANEXOS

Anexo 1 - Comitê de ética em pesquisa (CEP) em seres humanos do setor de ciências da saúde

	HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HCUFPR	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Elaborado pela Instituição Coparticipante		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Estado Oxidativo salivar em indivíduos com doenças onco-hematológicas		
Pesquisador: José Miguel Amenábar Céspedes		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 42164815.9.3001.0096		
Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Odontologia		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.032.358		
Data da Relatoria: 30/03/2015		
Apresentação do Projeto:		
Trata-se de pesquisa que avaliará indivíduos com diagnóstico de DOH (doença onco-hematológica) em pré e pós-transplante que recebem assistência na clínica ambulatorial do HC da Universidade Federal de Paraná.		
Pesquisa aprovada pelo CEP Setor da Saúde UFPR		
Objetivo da Pesquisa:		
Analisar o estado oxidativo salivar dos indivíduos com doenças onco-hematológicas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Desconforto pela coleta de saliva e constrangimento aos indivíduos participantes. Benefício relacionado ao atendimento odontológico aos participantes.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
HC será centro co-participante.		
A saliva tem sido usada como uma recurso de fácil obtenção para realização de diagnóstico com eficiência. Porém, poucos estudos envolvem a análise da saliva de indivíduos com doenças onco-hematológicas.		
Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181		
Bairro: Alb. da Glória		
CEP: 80.060-900		
UF: PR		
Município: CURITIBA		
Telefone: (41)3360-1041		
Fax: (41)3360-1041		
E-mail: cep@hc.ufpr.br		



Continuação do Parecer: 1.032.358

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Revisados pelo CEP do Setor de Ciências da Saúde com recomendações anteriormente atendidas pelos pesquisadores.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Quanto à viabilidade de execução nas dependências do Hospital de Clínicas, o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



CEP/HCUFPR

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Protocolo: 1.022.358

CURITIBA, 23 de Abril de 2015

Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para os participantes adultos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, José Miguel Amenáber Céspedes, Geisy Rebouças Lima Brasil, Cristina Berrocal Salazar, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) Senhor(a) a participar de um estudo intitulado “Estado oxidativo salivar em indivíduos em tratamento no Hospital de Clínicas”. Este estudo visa analisar a quantidade de oxidantes e antioxidantes na sua saliva.

- a) O objetivo desta pesquisa é analisar o estado oxidativo (quantidade de oxidantes e antioxidantes) da saliva dos indivíduos em tratamento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 10 minutos uma única vez.
- c) Para tanto você deverá estar presente no Hospital de Clínicas da UFPR para a realização da coleta da saliva por aproximadamente 10 minutos pela manhã, que poderá ser realizado enquanto você aguarda atendimento de consulta. Você não poderá comer, beber e escovar os dentes por uma hora antes da coleta da saliva. Ficará sentado e a cada 30 segundos cuspirá num recipiente, controlado pelo examinador.
- d) Existe o risco que durante o protocolo de coleta de saliva, você poderá se sentir com algum descontentamento ou desconforto, porém, serão tomados cuidados específicos para seu resguardo, para que não haja prejuízos à sua integridade física e moral.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: descrição do estado oxidativo salivar (quantidade de oxidantes e antioxidantes) dos indivíduos, possibilitando futuros estudos para criação de métodos de diagnósticos menos invasivos; quando houver necessidade de tratamento odontológico, serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar tratamento.
- f) O pesquisador José Miguel Amenábar Céspedes, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 041 3360-4024 ou pelo email: jamenaba@gmail.com, colaboradora Geisy Rebouças Lima Brasil pelo telefone [REDACTED] ou e-mail geisylima@hotmail.com e colaboradora Cristina Berrocal pelo [REDACTED] 3692 ou e-mail cristinaberrocals@gmail.com, ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632, para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) Sr.(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 990023
na data de 18/03/2015

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

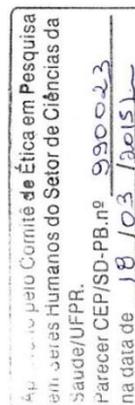
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.
- h) As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa 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 esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa, ficar uma hora antes da coleta da saliva sem comer, beber e escovar os dentes. Fui informado que serei atendido sem custos.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

 (Assinatura do Participante de pesquisa ou responsável legal)
 Local e data

 Assinatura do Pesquisador



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

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido para candidatos adolescentes

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO
(Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos).

Título do Projeto: Estado oxidativo salivar em indivíduos em tratamento no Hospital de Clínicas

Investigador: Pesquisador José Miguel Amenábar Céspedes

Local da Pesquisa: Serviço De Transplante De Medula Óssea (STMO) Do Hospital De Clínicas (HC) Da Universidade Federal Do Paraná.

Endereço: Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR - CEP 80.060-900

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de analisar o estado oxidativo salivar (quantidade de oxidantes e antioxidantes na saliva) dos indivíduos em tratamento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Para que fazer a pesquisa? Como será feita? Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 990023
na data de 18/03/2015

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Este estudo visa analisar o estado oxidativo salivar (quantidade de oxidantes e antioxidantes na saliva) dos indivíduos em tratamento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

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

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 10 minutos uma única vez.

Para tanto você deverá estar presente no Hospital de Clínicas da UFPR para a realização da coleta por aproximadamente 10 minutos, que poderá ser realizado enquanto você aguarda sua consulta no Hospital.

Existe o risco que durante o protocolo de coleta de saliva, você poderá se sentir algum descontentamento ou desconforto, porém, serão tomados cuidados específicos para seu resguardo, para que não haja prejuízos à sua integridade física e moral.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: descrição do estado oxidativo salivar (quantidade de oxidantes e antioxidantes na saliva) dos indivíduos em tratamento, possibilitando futuros estudos para criação de métodos de diagnósticos menos invasivos, quando houver necessidade de tratamento odontológico, serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar tratamento.

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento e/ou tratamento.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 990023
na data de 18/03/2015

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe. O pesquisador José Miguel Amenabar, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: [REDACTED] ou pelo email: jamenaba@gmail.com, colaboradora Geisy Rebouças Lima Brasil pelo telefone 041 9203-1415 ou e-mail geisylima@hotmail.com e colaboradora Cristina Berrocal pelo [REDACTED] ou e-mail cristinaberrocals@gmail.com, ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632, para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 041 3360-7259. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 990023
na data de 18/03/2015

NOME DO ADOLESCENTE ASSINATURA DATA

NOME DO INVESTIGADOR ASSINATURA DATA

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Anexo 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido para candidatos pediátricos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, José Miguel Amenáber Céspedes, Geisy Rebouças Lima Brasil, Cristina Berrocal Salazar, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) seu filho(a) a participar de um estudo intitulado “Estado oxidativo salivar em indivíduos em tratamento no Hospital de Clínicas”. Este estudo visa analisar a quantidade de oxidantes e antioxidantes na saliva.

- a) O objetivo desta pesquisa é analisar o estado oxidativo (quantidade de oxidantes e antioxidantes) da saliva dos indivíduos em tratamento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.
- b) Caso seu filho(a) participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 10 minutos uma única vez.
- c) Para tanto seu filho (a) deverá estar presente no Hospital de Clínicas da UFPR para a realização da coleta da saliva por aproximadamente 10 minutos pela manhã, que poderá ser realizado enquanto aguarda atendimento de consulta. Ele(a) não poderá comer, beber e escovar os dentes por uma hora antes da coleta da saliva. Ficará sentado(a) e a cada 30 segundos cuspirá num recipiente, controlado pelo examinador.
- d) Existe o risco que durante o protocolo de coleta de saliva, seu filho(a) poderá se sentir com algum descontentamento ou desconforto, porém, serão tomados cuidados específicos para seu resguardo, para que não haja prejuízos à sua integridade física e moral.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: descrição do estado oxidativo salivar (quantidade de oxidantes e antioxidantes) dos indivíduos, possibilitando futuros estudos para criação de métodos de diagnósticos menos invasivos; quando houver necessidade de tratamento odontológico, seu filho(a) poderá ser encaminhado(a) pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar tratamento.
- f) O pesquisador José Miguel Amenábar Céspedes, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 041 3360-4024 ou pelo email: jamenaba@gmail.com, colaboradora Geisy Rebouças Lima Brasil pelo telefone [REDACTED] ou e-mail geisylima@hotmail.com e colaboradora Cristina Berrocal pelo 041 [REDACTED] 3-[REDACTED] ou e-mail cristinaberrocals@gmail.com, ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632, para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) Sr.(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 990023
Data de 18/03/2015

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

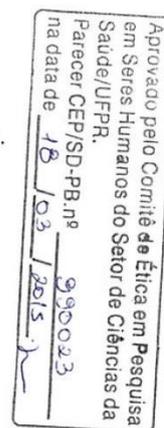
- g) A participação do seu filho (a) neste estudo é voluntária e se não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de atendimento e/ou tratamento dele(a), que está assegurado.
- h) As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **identidade do seu filho (a) seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo vocês não receberão qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de seu filho(a), e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei na participação do meu filho(a). A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do meu filho(a) a qualquer momento sem justificar esta decisão afete seu tratamento. Eu entendi o que meu filho(a) não pode fazer durante a pesquisa, ficar uma hora antes da coleta da saliva sem comer, beber e escovar os dentes. Fui informado que ele(a) será atendido(a) sem custos.

Eu concordo que meu filho participe voluntariamente deste estudo.

 (Assinatura do Participante de pesquisa ou responsável legal)
 Local e data

 Assinatura do Pesquisador



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

Anexo 5. Ficha de coleta de dados para os indivíduos com AF.

Ficha de identificação
Hospital de Clínicas
Pacientes pre transplante ANEMIA de FANCONI

Identificação: A

Nome:

Idade:

Idade diagnóstico:

Famílias com AF:

Consanguinidade dos pais? s n

Precisa TMO: s n

Motivo de diagnóstico:

- Aplasia medular
- Cansaço excessivo
- Aparecimento de hematomas
- Certificando a pós outro irmão ter sido diagnosticado

Medicamentos que toma:

Restrição grupo alimentar: s n

Fenótipo:

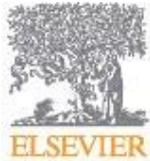
- Ausência polegar
- polidactilia
- Manchas café com leite
- baixa estatura devido ao retardo no crescimento
- hipotálamo hipoativo
- hipotireoidismo
- insuficiência de hormônio de crescimento
- fenótipo facial
- Anormalidade de gônadas
- Anomalias no sistema urinário
- Malformações otológicas
- Defeitos cardíacos
- Alterações no trato gastrointestinal

Orais:

- Gingivite
- Periodontite
- Cáries
- Aftas
- Úlceras
- Trauma
- Ceratoses reaccional

Anexo 6. Normas para publicação – ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

<https://www.elsevier.com/journals/archives-of-oral-biology/0003-9969?generatepdf=true>
Ficha de coleta de dados para os indivíduos com AF



ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0003-9969

DESCRIPTION

Archives of Oral Biology operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/aob> to submit a paper.

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.

AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

IMPACT FACTOR

2014: 1.735 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK

G.R. Holland, Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, The University of Michigan, 1011 N. University, Ann Arbor, MI 48109-1078, USA

Associate Editor:

S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

G. Murray, University of Sydney, Australia

L. Anderson, University of the Pacific

Editorial Board:

G.N. Belibasakis, Zürich, Switzerland

G.H. Carpenter, London, UK

M. Cole, Georgetown, USA

B. Dale-Crunk, Seattle, USA

C. Dawes, Manitoba, Canada

M.J. Dixon, Manchester, UK

C.W.I. Douglas, Sheffield, UK

X. Duan, Xi'an, Shaanxi

J.A. Garlick, Stony Brook, USA

D. Grenier, Quebec, Canada

S. Herring, Seattle, USA

T. Itota, Hyogo, Japan

M. Jontell, Göteborg, Sweden

R. Jordan, San Francisco, USA

H. Larjava, Vancouver, Canada

M. MacDougall, San Antonio, USA

S. Marshall, San Francisco, USA

J.R. Martinez, Bethesda, USA

C.P. McArthur, Kansas City, USA

C. McCulloch, Toronto, Canada

M. McCullough, Melbourne, Australia

M. McKee, Montreal, Canada

A.M. Moursi, Columbus, USA

M. Narhi, Turku, Finland

J. Richman, Vancouver, Canada

J.Y. Ro, Maryland, USA

C. Robinson, Leeds, UK

T. Salo, Oulu, Finland

L.P. Samaranayake, Queensland, Australia

B.J. Sessle, Toronto, Canada

P.T. Sharpe, London, UK

A.J. Smith, Birmingham, UK

P. Stashenko, Boston, USA

D. Steinberg, Jerusalem, Israel

H. Suda, Tokyo, Japan

A.L. Symons, Brisbane, Australia

T. Takata, Hiroshima, Japan

S. Tanase, Gifu, Japan

K. Tanne, Hiroshima, Japan

H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands

L. Villanueva, Paris, France

L.J. Walsh, Brisbane, Australia

T. Wright, North Carolina, USA

T. Zelles, Budapest, Hungary

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.

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.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

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.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ABSTRACTING AND INDEXING

Abstracts in Anthropology
Abstracts on Hygiene and Communicable
Diseases Agris
Animal Breeding Abstracts
Aquatic Sciences and Fisheries
Abstracts Arts and Humanities
Citation Index BIOBASE
BIOSIS
Elsevier
BIOBASE
Cancerlit
Chemical Abstracts
Current Contents/BIOMED
Database Current Contents/Life
Sciences Current
Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation
Index Dairy Science Abstracts
MEDLINE®
Index Veterinarius
Medical and Surgical
Dermatology GeoRef
Nutrition Research
Newsletter Pascal
Research Alert
Review of Medical and Veterinary
Entomology SPORTDiscus
Science Citation
Index Scisearch
Soils and Fertilizers
Sugar Industry
Abstracts Tropical
Diseases Bulletin
UnCover
Veterinary Bulletin
Biological
Abstracts
Current Awareness in Biological
Sciences CABI Information
TOXFILE
BIOSIS Previews
SIIC Data Bases
Inside
Conferences
Gale Database of Publications & Broadcast Media
RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical
Substances) Inpharma Weekly
Pharmacoeconomics and Outcomes
News Reactions Weekly
Scopus
Global

Health
Vitis Viticulture and Enology
Abstracts Nutrition Abstracts and
Reviews Series Pig News and
Information
Zoological Record
ISI Science Citation
Index Abstracts of
Mycology
AgBiotech News and
Information Maize Abstracts
Online Postharvest News and
Information Review of
Agricultural Entomology Small
Animals
Soybean Abstracts (Online
Edition) Speleological Abstracts
BIOSIS Toxicology

ACU AILCRS INFORMATION PACK 7 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio
2

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK

G.R. Holland, Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, The University of Michigan, 1011 N. University, Ann Arbor, MI 48109-1078, USA

Associate Editor:

S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

G. Murray, University of Sydney, Australia

N. Anderson, University of the Pacific

Editorial Board:

G.N. Belibasakis, Zürich, Switzerland

G.H. Carpenter, London, UK

O. Cole, Georgetown, USA

E. Dale-Crunk, Seattle, USA

F. Dawes, Manitoba, Canada

M.J. Dixon, Manchester, UK

C.W.I. Douglas, Sheffield, UK

X. Duan, Xi'an, Shaanxi

J.A. Garlick, Stony Brook, USA

G. Grenier, Quebec, Canada

U. Herring, Seattle, USA

V. Itota, Hyogo, Japan

M. Jontell, Göteborg, Sweden

R. Jordan, San Francisco, USA

H. Larjava, Vancouver, Canada

M. MacDougall, San Antonio, USA

S. Marshall, San Francisco, USA

J.R. Martinez, Bethesda, USA

C.P. McArthur, Kansas City, USA

C. McCulloch, Toronto, Canada

M. McCullough, Melbourne, Australia

M. McKee, Montreal, Canada

A.M. Moursi, Columbus, USA

M. Narhi, Turku, Finland

J. Richman, Vancouver, Canada

J.Y. Ro, Maryland, USA

C. Robinson, Leeds, UK

T. Salo, Oulu, Finland

L.P. Samaranayake, Queensland, Australia

B.J. Sessle, Toronto, Canada

P.T. Sharpe, London, UK

A.J. Smith, Birmingham, UK

P. Stashenko, Boston, USA

D. Steinberg, Jerusalem, Israel

H. Suda, Tokyo, Japan

A.L. Symons, Brisbane, Australia

T. Takata, Hiroshima, Japan

S. Tanase, Gifu, Japan

M. Tanne, Hiroshima, Japan

H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands

N. Villanueva, Paris, France

L.J. Walsh, Brisbane, Australia

T. Wright, North Carolina, USA

T. Zelles, Budapest, Hungary