

**PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ESTOMATOLOGIA**

**ADRIANE BASTOS POMPERMAYER**

**ESTUDO CITOLÓGICO DA MUCOSA BUCAL DE**  
**INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS HIV-1**

**CURITIBA – 2009**

ADRIANE BASTOS POMPERMAYER

# **ESTUDO CITOLÓGICO DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS HIV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

CURITIBA

2009

*“Mestre não é quem sempre ensina, mas  
quem de repente aprende.”*

Guimarães Rosa

Aos meus pais, Cleonice e Antonio Carlos, exemplos de pessoas e profissionais. Hoje, eu venço mais um degrau na tentativa de ser um dia espelho de tudo o que me ensinaram e sonharam para mim.

Aos meus irmãos, Débora e Danilo, que foram sempre os melhores amigos que tenho.

Ao meu esposo, Gustavo, por ter sido sempre o apoio quando tudo parecia perdido, o meu maior incentivador, nessa e tantas outras empreitadas.

A minha amiga, Natércia, pela fidelidade e amizade incondicionais de uma vida inteira.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica do Paraná –PUCPR, instituição de ensino que me acolheu e proporcionou meu crescimento científico, técnico e pessoal, tanto durante os anos do meu Curso de Graduação, quanto agora, na minha Pós-Graduação.

Ao professor Monir Tacla, Diretor do Curso de Odontologia, ao Prof. Dr. Sérgio Vieira, Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e ao Coordenador do Mestrado área de Concentração Estomatologia, Prof. Dr. Fernando Henrique Westphalen, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, exemplo de profissionalismo, ética, trabalho e competência há tantos anos. Àquele que eu, sinceramente, considero a personalidade mais importante na minha história e experiência, tanto com a Odontologia, quanto com a Pesquisa; chegou a hora de agradecer solenemente por tudo! Espero ter correspondido à sua confiança nas duas ocasiões em que trabalhamos juntos, e que possa ser um dia uma profissional tão completa como você.

Às professoras da PUCPR Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Ângela Naval Machado, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina Trevilatto e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Helena Sotille França, bem como ao professor convidado Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados, por aceitarem compor as bancas de qualificação e defesa deste trabalho e pela conseqüente ajuda.

Ao professor Sérgio Aparecido Ignácio, pela ajuda na Análise Estatística dos resultados dessa pesquisa.

Aos demais professores do Programa de Mestrado em Odontologia, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Trindade Grégio, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Reis Azevedo Alanis, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina de Oliveira Ribas, Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, Prof. Dr. Julio César Bisinelli, Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza e Prof. Dr. Wilson Denis Benato Martins; que me

ensinaram a cada dia a importância da perseverança e da constante dedicação para o “sacerdócio” de ser mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES- pelo apoio financeiro em o qual não seria possível ter concluir este curso e esta pesquisa.

Ao Hospital Oswaldo Cruz, especialmente ao Diretor Dr. Roberto Francisco Hoffmann e à Cirurgiã-Dentista, Dr<sup>a</sup>. Francisca Berenice Dias Gil, pela acolhida imprescindível para a realização dessa pesquisa, e experiência de vida inesquecível.

Aos pacientes e voluntários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pela importante participação na pesquisa.

Aos meus amigos do mestrado, Eli Luis Namba, Maitê Barroso da Costa, Lisiane Cândido (auxílio extremo na coleta da pesquisa) e Soraya de Azambuja Berti. Aprendi com cada um de vocês algo que levarei comigo para sempre.

Aos colegas do doutorado, especialmente à amiga Cíntia Contar, pela confiança e conselhos valiosos.

À amiga Neide Reis Borges, pela atenção e disposição em ajudar sempre.

Aos funcionários dos Laboratórios de Patologia Experimental e de Estomatologia da PUCPR, especialmente à Ana Paula, Marina e Rosimeire, pela ajuda na realização da parte prática desse trabalho.

Aos meus amigos do mestrado em Ortodontia, Raul e Mariana, à colega do doutorado, Mônica e às alunas da graduação, Juliana e Débora, pela ajuda no processamento laboratorial das lâminas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para tornar esse sonho uma realidade.

O meu eterno agradecimento!

## SUMÁRIO

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>1-ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b> | <b>01</b> |
| PÁGINA TÍTULO.....                | 02        |
| RESUMO.....                       | 03        |
| INTRODUÇÃO.....                   | 04        |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....          | 05        |
| RESULTADOS.....                   | 07        |
| DISCUSSÃO.....                    | 08        |
| REFERÊNCIAS.....                  | 13        |
| TABELAS.....                      | 19        |
| <b>2- ARTIGO EM INGLÊS.....</b>   | <b>21</b> |
| TITLE PAGE.....                   | 22        |
| ABSTRACT.....                     | 23        |
| INTRODUCTION.....                 | 24        |
| MATERIAL AND METHODS.....         | 25        |
| RESULTS.....                      | 27        |
| DISCUSSION.....                   | 27        |

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| REFERENCES.....                                                                                                          | 32        |
| TABLES.....                                                                                                              | 38        |
| <b>3- ANEXOS.....</b>                                                                                                    | <b>40</b> |
| ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....                                                                               | 41        |
| ANEXO 2- MÉTODO.....                                                                                                     | 42        |
| ANEXO 3- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....                                                                 | 50        |
| ANEXO 4- FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA.....                                                            | 52        |
| ANEXO 5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                        | 53        |
| ANEXO 6- ILUSTRAÇÕES.....                                                                                                | 55        |
| ANEXO 7- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE,<br>ORAL PATHOLOGY, ORAL RADIOLOGY AND<br>ENDODONTOLOGY..... | 58        |

## **1- ARTIGO EM PORTUGUÊS**

## **PÁGINA TÍTULO**

### **ESTUDO CITOLÓGICO DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS HIV-1**

Running Title: *Cytologic study of oral mucosa in type 1 HIV patients*

Adriane Bastos Pompermayer \*

Antonio Adilson Soares de Lima\*\*

\*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR Brazil

\*\*Department of Stomatology, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR Brazil

#### ***Correspondence to:***

Antonio Adilson Soares de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR

Avenida Imaculada Conceição 1155 Prado Velho

80215-901 Curitiba/PR, Brazil.

Tel. + 55 41 32711637

Fax. + 55 41 32711405

*E.mail:* [antollima@hotmail.com](mailto:antollima@hotmail.com)

## **Estudo Citológico da Mucosa Bucal de Indivíduos Portadores do Vírus HIV-1**

Adriane B. Pompermayer e Antonio Adilson S. de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo:

**Objetivo.** O objetivo do estudo foi avaliar as possíveis alterações morfológicas e morfométricas nas células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores do vírus HIV-1.

**Metodologia.** Foram coletadas células epiteliais da língua e mucosa jugal de 30 indivíduos portadores do vírus HIV-1 e 30 não portadores por meio da citologia esfoliativa em base-líquida. Os esfregaços foram analisados quanto à morfologia e as áreas nuclear (AN), citoplasmática (AC), e a relação AN/AC foram calculadas.

**Resultados.** Não foram encontradas alterações citomorfológicas entre os grupos. As médias da AC no grupo experimental mostraram-se diminuídas em relação ao grupo controle, tanto na região lingual ( $p=0,0006$ ) quanto na mucosa jugal ( $p=0,00242$ ). As médias da AN foram aumentadas no grupo experimental quando comparadas ao controle, nas mucosas jugal e lingual, ( $p=0,00308$  e  $0,00095$ ), respectivamente. As relações AN/AC foram aumentadas no grupo experimental, tanto na língua ( $p=0,00001$ ) quanto na mucosa jugal ( $p=0,00000$ ) em relação ao controle.

**Conclusão.** O estudo mostrou que a infecção pelo vírus HIV pode induzir alterações morfométricas nas células epiteliais bucais.

Palavras-chave: HIV, mucosa oral, epitélio oral, citologia esfoliativa.

## INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) é uma infecção crônica provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), retrovírus com pelo menos oito subtipos já identificados.<sup>1</sup> Este vírus infecta principalmente linfócitos CD4+, células que comandam a resposta imune do organismo, levando a uma redução progressiva destes.<sup>1,2</sup> O quadro resultante desse dano específico ao sistema imunológico caracteriza-se pelo surgimento de inúmeras doenças de natureza infecciosa.<sup>3</sup>

Diversos estudos demonstram a importância e a relevância das formas de manifestações bucais da AIDS, sendo que, durante as duas últimas décadas, mais artigos têm sido escrito sobre essa síndrome e seu vírus causador, o HIV, do que sobre qualquer outro processo infeccioso. Estudos epidemiológicos mostram que indivíduos portadores do HIV têm quatro vezes mais chances de apresentar lesões bucais em geral que indivíduos não infectados pelo vírus.<sup>4</sup>

Além de freqüentes, as lesões bucais associadas ao HIV representam, em geral, um achado precoce na infecção pelo HIV, interferindo na qualidade de vida do paciente e representando marcadores úteis da progressão da doença e do quadro de imunossupressão.<sup>5-7</sup>

A infecção da mucosa bucal pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo I (HIV-1) *in vivo* é uma área crítica da patogênese do HIV-1 que tem sido alvo de várias pesquisas. No entanto, um número grande de dúvidas importantes permanece sem resposta.<sup>8-10</sup> Os mecanismos que levam a essa maior suscetibilidade dos pacientes portadores da síndrome a possuírem lesões bucais ainda não estão bem definidos.<sup>11</sup>

Este campo de pesquisa é fundamental, pois a mucosa bucal está intimamente relacionada tanto com a transmissão horizontal quanto com a vertical deste lentivírus humano, bem como, está potencialmente envolvido com uma variedade de processos patogênicos na boca de indivíduos infectados pelo HIV-1, como, por exemplo, candidose, leucoplasia pilosa

e sarcoma de Kaposi<sup>12-15</sup> Tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* sugerem que as células epiteliais podem ser infectadas pelo HIV-1,<sup>16-18</sup> no entanto, não há relatos na literatura se o HIV é capaz de produzir alterações na forma e no tamanho das células da mucosa bucal humana. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações citomorfométricas e citomorfológicas nas células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores do vírus HIV-1.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR sob registro nº 2122.

### ***Sujeitos da Pesquisa***

A amostra empregada neste estudo foi composta de 60 indivíduos adultos pareados em sexo e idade que foram divididos em dois grupos: 30 pacientes portadores do vírus HIV-1 provenientes do Hospital Oswaldo Cruz, Curitiba, Paraná (grupo experimental) e outros 30 voluntários ou pacientes da clínica odontológica da PUCPR não portadores do HIV (grupo controle). Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram instruídos quanto à natureza do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídos da amostra os pacientes tabagistas, etilistas, usuários de enxaguatórios bucais ou ainda aqueles indivíduos que apresentassem lesões de qualquer natureza na mucosa bucal. Todos os indivíduos do grupo experimental tiveram a confirmação do diagnóstico da infecção pelo vírus HIV-1 por meio do teste anti-HIV (teste de Elisa).

### ***Coleta das Células***

A coleta das células epiteliais foi realizada por meio da técnica da citologia esfoliativa em base líquida em borda de língua e mucosa jugal, de forma a obter células de epitélios ceratinizado e não-ceratinizado (respectivamente) de cada paciente. A escolha das mucosas

estudadas deveu-se à facilidade de acesso na mucosa jugal e à alta incidência de câncer bucal na borda de língua. Inicialmente, os pacientes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água para remover possíveis restos alimentares, muco ou outras sujidades. Em seguida, a coleta de células epiteliais foi obtida por meio do *kit* do sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup>, denominado *Universal Collection Medium* (DIGENE, São Paulo, Brasil).

### ***Processamento Laboratorial***

Conforme as orientações do fabricante, cada amostra foi homogeneizada com auxílio de um agitador de tubos do tipo *vortex* por aproximadamente 20 segundos. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta monocal, uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi transferida do interior do frasco para a superfície de um filtro composto por uma membrana de policarbonato com diâmetro de 25 mm e poros de 5 µm de diâmetro (FiltroGene<sup>®</sup>, Digene, São Paulo/SP, Brasil). Depois, o material foi filtrado e as células prensadas foram transferidas para as lâminas de vidro (LamiGene<sup>®</sup>), sendo estas fixadas por imersão em solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos, e posteriormente, coradas pela técnica do Papanicolaou modificada.

### ***Análise Citomorfológica***

A análise das lâminas foi feita por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular (modelo Olympus BX50, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus, Japão) e objetiva PLAN 10X/0,25 (Olympus, Japão). As lâminas foram classificadas qualitativamente segundo os critérios citopatológicos do Papanicolaou,<sup>19</sup> e quantitativamente seguindo os critérios citológicos de maturação,<sup>20</sup> ou seja, foram contadas 50 células em cada lâmina e a quantidade de células epiteliais ceratinizadas e não-ceratinizadas foi analisada observando-se o predomínio do tipo celular em cada esfregaço.

### ***Análise Citomorfométrica***

Cinqüenta células de cada lâmina foram utilizadas para a análise morfométrica segundo a metodologia proposta por Ogden *et al.*<sup>21</sup> A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes, por uma câmera de vídeo *Sony CCD Íris Color* (Sony Model DXC-107A, Japão) e as avaliações das áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) e da relação AN/AC das células foram feitas por meio do sistema de análise de imagens *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring Md), versão 4.5.029 *for Windows* 98/NR/2000, segundo a metodologia descrita por Woyceichoski *et al.*<sup>22</sup>

### ***Análise Estatística***

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* estatístico *SPSS* versão 13.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Para a análise citomorfológica, foram aplicados os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Para a análise das variáveis citomorfométricas, o teste aplicado para todas as variáveis foram os testes de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, de homogeneidade da variância de *Levene* e o teste t de *Student*. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

Todos os participantes deste estudo eram do sexo masculino e a média de idade foi de 39,7 (24-58) anos. Dentre os participantes do grupo experimental, a média das contagens de CD4 foi de 332 CD4+/mm<sup>3</sup>.

Na análise citológica qualitativa, todas as lâminas analisadas foram classificadas como classe I ou classe II de Papanicolaou, ou seja, as lâminas apresentaram esfregaço normal com ou sem presença de células inflamatórias. Quando comparadas quanto à presença de células inflamatórias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle, independentemente da localização da coleta  $p > 0,05$  (Tab. 1).

A tabela 2 apresenta os resultados da análise citológica quantitativa. Não houve diferença estatisticamente significativa a respeito do predomínio celular dos esfregaços entre os dois grupos, na mucosa jugal e na região da língua ( $p>0,05$ ).

Os valores médios das variáveis AN, AC e da relação AN/AC são exibidos na tabela 3. A média da AC do grupo experimental mostrou-se significativamente diminuída em relação ao grupo controle, tanto para mucosa de língua quanto para mucosa jugal. De maneira inversa, as médias da AN do grupo experimental mostraram-se significativamente maiores que aquelas apresentadas pelo grupo controle, independente da localização da coleta. A relação AN/AC dos pacientes do grupo experimental mostrou-se significativamente aumentada quando comparada ao grupo controle, novamente para ambas as regiões anatômicas analisadas ( $p<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Desde os primeiros relatos, no início dos anos 80, até os dias de hoje, o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a infecção crônica por ele provocada, a AIDS, tornaram-se uma epidemia mundial e inúmeros estudos sobre ambos têm sido publicados. Como o alvo da infecção do vírus HIV são as células componentes do sistema imunológico do hospedeiro, muitas doenças oportunistas de natureza infecciosa ou neoplásica são relatadas nos pacientes por ele infectados.<sup>13</sup>

São inúmeras as manifestações bucais de pacientes infectados pelo HIV descritas até o momento.<sup>23</sup> As mais comuns são decorrentes de infecções fúngicas (por exemplo, candidose), bacterianas (*mycobacterium*) e virais (Epstein-Baar, vírus Herpes Simples, Papiloma Vírus Humano, entre outros), bem como neoplasias (Sarcoma de Kaposi e Linfoma) e outras de etiologia desconhecida.<sup>12-15,23,24</sup> Em um indivíduo sadio, há um equilíbrio tênue entre a ecologia microbiana complexa na boca e o sistema imunológico do corpo.<sup>4</sup> Ao entrar

no organismo do hospedeiro, o HIV ataca e destrói esse equilíbrio, levando o hospedeiro a uma maior suscetibilidade a várias infecções oportunistas, que, por diversas vezes, aumentam o risco de morbidade dessa população.

O processo de infecção da mucosa bucal pelo vírus HIV ainda permanece bastante enigmático. Vários estudos demonstraram que o vírus HIV pode ser detectado na saliva de pacientes infectados; não sendo, porém, a saliva considerada uma via de transmissão comum, já que o vírus é encontrado em menores concentrações quando comparado às vias comuns de transmissão, como sêmen e sangue.<sup>25</sup>

A citologia esfoliativa é um método auxiliar de diagnóstico que consiste em coletar células em uma determinada área de interesse, e pela posterior análise das características dessas células obtidas, orientar diagnósticos ou apontar alterações marcantes que possam estar acometendo o tecido epitelial envolvido. Os estudos citológicos, conforme discutido por Burzlaff *et al.*,<sup>26</sup> podem ser ferramentas úteis na avaliação de mudanças celulares em tecidos epiteliais aparentemente normais, onde a biópsia não é indicada.

À semelhança do estudo de Lourenço e Figueiredo,<sup>27</sup> onde se relatou que os pacientes portadores do vírus HIV que não apresentaram lesões bucais tinham em média 352 CD4+/mm<sup>3</sup> (números consideravelmente maiores do que aqueles portadores do vírus que apresentaram lesões); os pacientes analisados no grupo experimental do presente estudo tinham média os valores de 332 CD4+/mm<sup>3</sup> sangüíneo, e, conforme já citado anteriormente, não apresentaram lesões bucais.

Visando justamente visualizar possíveis alterações celulares em áreas não acometidas por lesões, neste estudo, as coletas celulares em ambos os grupos foram feitas apenas em áreas saudáveis da mucosa. Isso deve explicar o fato de que, quando os esfregaços foram classificados qualitativamente, todas as células epiteliais apresentaram aspecto normal, com ou sem presença de células inflamatórias, em ambos os grupos. Nenhuma alteração celular

sugestiva de displasia ou de neoplasia foi observada entre os grupos ou entre os sítios analisados.

Vários estudos têm demonstrado que as áreas nuclear e citoplasmática podem se modificar em virtude de várias condições sistêmicas e em resposta a vários agentes agressores locais, como diabetes, anemia, e uso de tabaco, álcool e outras drogas.<sup>20-22,28-32</sup> Entretanto, não existem estudos similares relacionando os possíveis efeitos citomorfométricos do vírus HIV sobre o epitélio da mucosa bucal.

O estudo de Ramaesh *et al.*<sup>33</sup> sugeriu que os valores dos diâmetros citoplasmáticos tendem a diminuir em lesões displásicas em relação aos tecidos saudáveis; e a diminuir ainda mais nas células neoplásicas. No sentido inverso, os diâmetros nucleares são aumentados conforme o potencial maligno das lesões aumenta. Da mesma forma, os resultados encontrados no presente estudo, em que as áreas citoplasmáticas estão diminuídas e as áreas nucleares aumentadas no grupo experimental, podem justificar em parte a maior incidência de lesões e mesmo neoplasias<sup>34</sup> na mucosa bucal dos pacientes portadores do vírus HIV.

Outra explicação para as alterações nesses valores pode ser uma alteração no processo de maturação, possivelmente provocado pela infecção pelo HIV. À medida que os ceratinócitos da camada basal passam pelo processo de maturação epitelial normal, têm seus citoplasmas gradualmente aumentados e os núcleos diminuídos, provocando uma diminuição gradual também da relação núcleo-citoplasma. É importante ressaltar, ainda, que o aumento citoplasmático progressivo é mais acentuado em epitélios não-ceratinizados, e a diminuição nuclear é maior nos epitélios ceratinizados, onde encontramos por vezes células anucleadas na camada córnea.<sup>35</sup>

No presente estudo, os resultados do grupo teste não mostraram diferenças significantes nos valores relacionados à localização da coleta; mas ainda assim, uma alteração nesse processo gradual de maturação, ou mesmo uma possível atrofia do epitélio no grupo

experimental, pode ter provocado a coleta de células localizadas habitualmente mais profundamente nesse epitélio.

A presença do vírus HIV junto aos ceratinócitos da camada basal foi confirmada em biópsias da mucosa bucal de pacientes infectados, sugerindo a infecção dessas células.<sup>17</sup> Além disso, a indução de apoptose nos ceratinócitos da mucosa bucal por meio de proteínas virais específicas pode representar um mecanismo complementar em potencial para que a barreira da mucosa bucal possa ser alterada pela infecção pelo HIV <sup>16</sup>. Essa apoptose induzida pela infecção pelo vírus HIV pode levar a uma provável atrofia no epitélio da mucosa oral, explicando, dessa forma, a coleta de células epiteliais mais profundas. De qualquer forma, apenas um estudo histopatológico, onde as camadas epiteliais sejam estudadas em sua distribuição original, poderia confirmar essa hipótese, uma vez que em citologia esfoliativa apenas células isoladas, ou seja, fora de sua conformação tecidual, são estudadas.

É importante considerar que pode haver relação, ainda, entre as alterações provocadas nos ceratinócitos bucais e o uso dos medicamentos antirretrovirais nos pacientes investigados. Vários estudos demonstram que a incidência de lesões bucais em geral entre os pacientes portadores do HIV é maior entre os pacientes que não fazem uso de medicação antirretroviral do que entre aqueles que fazem uso de medicação contínua, <sup>11,27</sup> com a exceção ainda não explicada das lesões verrucosas causadas pelo Papiloma-vírus Humano (HPV), que apresentam aumento no uso contínuo dessas medicações. <sup>36,37</sup> Vários estudos relatam também vários efeitos colaterais que podem ser provocados pela medicação antirretroviral acometendo a boca, tais como: úlceras bucais recorrentes, síndrome lipodistrófica, xerostomia, disgeusia, queilite, eritema multiforme, reações liquenóides e outros. <sup>37,38</sup>

É importante salientar que no presente estudo, dos trinta pacientes do grupo experimental, apenas seis (20%) não faziam uso dos medicamentos no momento da coleta, e que, apesar de não terem sido analisadas mucosas de pacientes que apresentassem lesões

bucais de quaisquer espécies, foram encontradas alterações citomorfométricas importantes. Não há estudos na literatura avaliando o efeito das drogas antirretrovirais sobre as células da mucosa bucal, porém, as mudanças encontradas neste estudo, poderiam indicar alguma associação entre as alterações observadas e o uso desses medicamentos; e explicar as maiores incidências de lesões bucais entre os pacientes que possuem o vírus HIV em relação à população geral.

Como as condições de vida dos pacientes portadores do vírus HIV, ao longo de tantos anos de pesquisa, apresentaram grandes melhorias, e grande parte delas está relacionada ao uso dos medicamentos antirretrovirais, e, ainda, levando em consideração que grande parte dos pacientes é acometida por lesões bucais, importantes marcadores da progressão da doença; muitos estudos ainda devem ser conduzidos de forma a antecipar as mudanças que de fato podem ocorrer na mucosa bucal desses pacientes e tentar relacioná-las aos diversos fatores associados à AIDS e aos tratamentos propostos.

## REFERÊNCIAS

1. Montagnier L. Historical essay. A history of HIV discovery. Science 2002; 298(5599):1727-8.
2. World Health Organization. Current and future dimensions of the HIV/AIDS pandemic – a capsule summary. Geneva, WHO, 1991.
3. Ranganathan K, Hemalatha R. Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. Adv Dent Res. 2006;19(1):63-8.
4. Adurogbangba MI, Aderinokun GA, Odaibo GN, Olaleye OD, Lawoyin TO. Orofacial lesions and CD4 counts associated with HIV/AIDS in an adult population in Oyo State, Nigeria. Oral Dis 2004; 10: 319-326.
5. Greenspan JS. Sentinels and signposts: the epidemiology and significance of the oral manifestations of HIV disease. Oral Dis 1997; 3(Suppl 1):S13-7.
6. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4+ cell count and viral load in Italian study population. J Oral Pathol Med 1999; 28:173–7.
7. Patton LL, McKaig RG, Eron JJ Jr, Lawrence HP, Strauss RP. Oral hairy leukoplakia and oral candidiasis as predictors of HIV viral load. AIDS 1999; 13:2174–6.

8. Cheingsong-Popov R, Callow D, Weber J, Holm-Hansen C, Constantine NT. Antibody to specific HIV-1 proteins in oral mucosal transudates. *Lancet* 1993; 341:1659-60.
9. Emmons WW, Paparello SF, Decker CF, Sheffield JM, Lowe-Bey FH. A modified ELISA and western blot accurately determine anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies in oral fluids obtained with a special collecting device. *J Infect Dis* 1995; 171:1406-10.
10. Langford A, Kunze R, Schmelzer S, Wolf H, Pohle HD, Reichart P. Immunocytochemical detection of herpes viruses in oral smears of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:49-57
11. Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Sierra-Madero J, Anaya-Saaverda G, González-Ramírez I, Ponce-de-León S. The changing clinical spectrum of human immunodeficiency virus (HIV)-related oral lesions in 1.000 consecutive patients. a 12-year study in a referral center in Mexico. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 39-50.
12. Baba TW, Trichel AM, An L, Liska V, Martin LN, Murphey-Corb M *et al.* Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science* 1996; 272:1486-9.
13. DePond W, Said JW, Tasaka T, de Vos S, Kahn D, Cesarman E *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and human herpesvirus 8 (KSHV/HHV8)-associated lymphoma of the bowel. Report of two cases in HIV-positive men with secondary effusion lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:719-24.

14. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T *et al.* Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 2000; 343:1369-77.
15. Shine N, Konopka K, Düzgünes N. The anti-HIV-1 activity associated with saliva. *J Dent Res* 1997; 76:634-40.
16. Acheampong EA, Parveen Z, Muthoga LW, Wasmuth-Peroud V, Kalayeh M, Bashir A *et al.* Molecular interactions of human immunodeficiency virus type 1 with primary human oral keratinocytes. *J Virol* 2005; 79: 8440-53.
17. Qureshi MN, Barr CE, Hewlitt I, Boorstein R, Kong F, Bagasra O *et al.* Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Dis* 1997; 3 Suppl 1: S73-8.
18. Liu X, Zha J, Chen H, Nishitani J, Camargo P, Cole SW *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 infection and replication in normal human oral keratinocytes. *J Virol* 2003; 77: 3470-6.
19. Armstrong BK, Muñoz N, Bosh FX. Epidemiology of cancer of the cervix. In: Coppleson M, editor. *Gynecologic oncology*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone: 1992; p.11-29.
20. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:126-30.
21. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.

22. Woyceichoski IE, de Arruda EP, Resende LG, Machado MA, Grégio AM, Azevedo LR *et al*. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:745-9.
23. Reznik DA. Oral manifestations of HIV disease. *Top HIV Med* 2005;13(5), 143-8.
24. Nokta M. Oral manifestations associated with HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2008;5,5-12.
25. Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Valenza A, Cataldo PT *et al*. Analysis of HIV load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS* 1996;10:F51-6.
26. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD *et al*. Exposure to alcohol and tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007;18,367-75.
27. Lourenço AG, Figueiro LT. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13,E281-6.
28. Orellana-Bustos AI, Spinoza-Santander IL, Franco-Martínez ME, Lobo-James-Freire N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of oral normal mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral* 2004;9:097-203.

29. Lima AAS, Woyceichoski IEC, Batista AB, Gregio AMT, Ignacio AS, Machado MAN *et al.* Cytopathological changes in oral epithellium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline* 2007;1:31-40.
30. Macleod RI, Hamilton PJ, Soames JV. Quantitative exfoliative oral cytology in iron-deficiency and megaloblastic anemia. *Anal Quant Cytol Histol* 1988;10:176-80.
31. Shareef BT, Ang KT, Naik VR. Qualitative and quantitative exfoliative cytology of normal oral mucosa in type 2 diabetic patients. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2008;13:E-693-6.
32. Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AA, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by smoking and alcohol consumption. *Acta Cytol* 2006;50:435-40.
33. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analyses of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
34. Epstein JB, Silverman S Jr. Head and neck malignancies associated with HIV-infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:193-200.
35. Ten Cate AR. *Oral Histology: development, structure, and function*. Saint Louis: Mosby-Year Book: 1998; p298-306.

36. Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci* 2004;328,57-63.
37. Hodgson TA, Greenspan D, Greenspan JS. Oral lesions of HIV disease and HAART in industrialized countries. *Adv Dent Res* 2006; 19,57-62.
38. Moura MD, Senna MI, Madureira DF, Fonseca LM, Mesquita RA. Oral adverse effects due the use of Nevirapine. *J Contemp Dent Pract* 2008;9,84-90.

## TABELAS

TABELA 1. Classificação das lâminas segundo a presença de inflamação de acordo com a localização e grupos ( $p>0,05$ ).

|                |           | Grupo        |          | p      |
|----------------|-----------|--------------|----------|--------|
|                |           | Experimental | Controle |        |
| Localização    |           |              |          |        |
| Mucosa Lingual |           |              |          |        |
|                | Classe I  | 19 (63,3%)   | 21 (70%) | 0,5838 |
|                | Classe II | 11 (36,67%)  | 09 (30%) |        |
| Mucosa Jugal   |           |              |          |        |
|                | Classe I  | 17 (56,67%)  | 18 (60%) | 0,7934 |
|                | Classe II | 13 (43,33%)  | 12 (40%) |        |

Teste do Qui-Quadrado e Teste Exato de Fischer

TABELA 2. Classificação das lâminas segundo a celularidade predominante de acordo com a localização e grupos ( $p>0,05$ ).

|                |                   | Grupo        |             | p      |
|----------------|-------------------|--------------|-------------|--------|
|                |                   | Experimental | Controle    |        |
| Localização    |                   |              |             |        |
| Mucosa Lingual |                   |              |             |        |
|                | Ceratinizadas     | 15 (50%)     | 16 (53,33%) | 0,6899 |
|                | Não-ceratinizadas | 4 (13,33%)   | 2 (6,67%%)  |        |
|                | Misto             | 11 (36,67%)  | 12 (40%)    |        |
| Mucosa Jugal   |                   |              |             |        |
|                | Ceratinizadas     | 11 (36,67%)  | 8 (26,67%)  | 0,2727 |
|                | Não-ceratinizadas | 6 (20%)      | 3 (10%)     |        |
|                | Misto             | 13 (43,33%)  | 19 (63,33%) |        |

Teste do Qui-Quadrado

TABELA 3. Médias das áreas citoplasmáticas e nucleares e relação entre área de núcleo e de citoplasma de acordo com a localização e grupos.

|                | Grupo               |                     | p        |
|----------------|---------------------|---------------------|----------|
|                | Experimental        | Controle            |          |
| Localização    |                     |                     |          |
| Mucosa Lingual |                     |                     |          |
| AC             | 2.249,4 ± 190,8 µm² | 2.457,5 ±182,8 µm²  | 0,00006* |
| AN             | 64,4 ± 10,5 µm²     | 55,8 ±10,7 µm²      | 0,00308* |
| AN/AC          | 0,030 ± 0,006       | 0,023 ± 0,005       | 0,00001* |
| Mucosa Jugal   |                     |                     |          |
| AC             | 2.440,0 ± 326,3 µm² | 2.673,7 ± 237,5 µm² | 0,00242* |
| AN             | 69,8 ± 11,2 µm²     | 59,8 ± 11,0 µm²     | 0,00095* |
| AN/AC          | 0,031 ± 0,006       | 0,023 ± 0,005       | 0,00000* |

Teste t de Student

\* p<0,05

## **2- ARTIGO EM INGLÊS**

## **TITLE PAGE**

### **CYTOLOGIC STUDY OF ORAL MUCOSA IN TYPE 1 HIV PATIENTS**

Adriane Bastos Pompermayer \*

Antonio Adilson Soares de Lima\*\*

\*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR Brazil

\*\*Department of Stomatology, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR Brazil

#### ***Correspondence to:***

Antonio Adilson Soares de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR

Avenida Imaculada Conceição 1155 Prado Velho

80215-901 Curitiba/PR, Brazil.

Tel. + 55 41 32711637

Fax. + 55 41 32711405

*E.mail:* [antollima@hotmail.com](mailto:antollima@hotmail.com)

## **Cytologic study of oral mucosa in type 1 HIV patients**

Adriane Bastos Pompermayer and Antonio Adilson Soares de Lima, Curitiba/PR Brazil

PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ

### **ABSTRACT:**

**Objective.** The aim of this study was to assess morphological and morphometrical alterations of oral squamous epithelial cells in type 1 HIV infected individuals.

**Study Design.** Oral smears were collected from tongue and buccal mucosa of 30 HIV infected (experimental) and 30 non-infected (control) individuals by liquid-based exfoliative cytology. The cells were morphologically analyzed and the nuclear area (NA), the cytoplasmic area (CA) and the nucleus-to-cytoplasm area ratio (NA/CA) were evaluated.

**Results.** No morphological differences were found between the groups. The mean values of CA were decreased in tongue ( $P=.00006$ ) and buccal mucosa ( $P=.00242$ ) in HIV infected individual, while mean values of NA were increased ( $P=.00308$  and  $.00095$ , respectively) in the same group. NA/CA ratio for experimental group was increased in both collected places, with  $P=.00001$  (tongue) and  $P=.00000$  (buccal mucosa)

**Conclusion.** This study revealed that HIV infection was able to induce morphometrical changes on the oral epithelial cells.

Key-words: HIV, oral mucosa, oral squamous epithelium, exfoliative cytology.

## INTRODUCTION

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) is a chronic infection caused by human immunodeficiency virus (HIV), a retrovirus with at least 8 recognized subtypes.<sup>1</sup> This virus infects specially CD4+ lymphocytes, cells that play an important role on human body's defenses, leading to their progressive reduction.<sup>1,2</sup> The effect of this immune system damage is the appearance of several opportunistic infections.<sup>3</sup>

Several studies have showed the importance and relevance of HIV oral manifestations forms, being that, more articles have been written on this syndrome and this causing virus than on any other infectious process during the past two decades. Epidemiological studies demonstrate that HIV carrying individuals show four times more possibilities to present general oral injuries than non-infected people.<sup>4</sup>

The HIV-associated oral lesions, beyond usual, may represent premature findings in the HIV infection, intervening with patients life quality and representing useful progression and immunosuppression markers.<sup>5-7</sup>

Type1-HIV infection on oral mucosa is a critical point of its pathogenesis that is being aimed in several studies. Great number of queries is still non-answered.<sup>8-10</sup> The mechanisms that lead this syndrome carrying individuals to a greater susceptibility to present oral injuries are still not well-defined.<sup>11</sup>

This search field is very important, because the oral mucosa is deeply related with horizontal and vertical transmission of this human lentivirus, and potentially involved with a variety of oral pathogenic process on HIV infected individuals, like candidiasis, hairy leucoplakia and Kaposi's sarcoma.<sup>12-15</sup> Both *in vitro* and *in vivo* studies suggest that oral keratinocytes can be infected by HIV,<sup>16-18</sup> but there is still no literature reports concerning possible shape or size alterations caused by this virus upon oral mucosa cells. This study

assessed the cytomorphologic and cytomorphometric oral squamous epithelial cells alterations on type-1 HIV infected individuals.

## **MATERIAL E METHODS**

The experimental protocol of this study was approved by Committee of Ethics in Research at Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil (protocol number 2122).

### **Subjects**

Thirty HIV infected adult individuals treated at the Oswaldo Cruz Hospital, Curitiba/PR, Brazil (experimental group) and 30 non-infected volunteers or patients of the Odontology Clinic of Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil (control group) matched by sex and age participated in this study. All the individuals that had accepted to participate of the research had been instructed about its nature and had sign an Informed Consent Term.

The alcohol, tobacco and mouth rinse regular users, as well those individuals that had oral mucosa injuries, had been excluded from the sample study. All the experimental group individuals had the HIV diagnosis confirmation by means of the Enzyme Immunoassay (EAI)- Elisa test.

### **Cell collection**

Exfoliated cells of clinically normal tongue and buccal mucosa membranes were obtained by oral liquid-based exfoliative cytology. The choice of the analyzed mucosa membranes was due the easy access to buccal mucosa and oral cancer high incidence on tongue. This way, one sample of keratinized membrane and one sample of non-keratinized mucosa membranes were obtained of each patient. Initially, the patients had been guided to rinse their mouths with water to remove debris, mucus and bacteria within the oral cavity. The

squamous cells were obtained using the Universal Collection Medium (UCM) kit of DNA-Citoliq System™ (Digene, São Paulo/SP, Brazil).

### **Cytological preparations**

Each sample was homogenized with aid of a vibratory equipment vortex type during 20 second following the kit producer's instructions. An aliquot of 200 µL of UCM was transferred by means of a single channel pipette to FiltroGene™ polycarbonate membrane filters (Digene, São Paulo/SP, Brazil), pore size 5µm, diameter 25 mm, pressed and the filtered cells had been transferred to glass slides. The slides were immediately fixed in absolute alcohol for 20 minutes and stained with modified Papanicolaou stain technique.

### **Cytomorphologic analysis**

The slides analysis was made by light microscopy means using binocular Olympus BX50A microscopy (Olympus, Japan) adapted with WH 10X-H/22 ocular and 10X/0,25 objective lenses (Olympus). The smears had been qualitatively classified according the Papanicolaou cytopathological criteria,<sup>19</sup> and quantitatively classified according the maturation cytological criteria,<sup>20</sup> it means, 50 random cells had been counted in each slide and the cellular predominance was analyzed observing the amount of keratinized and non-keratinized epithelial cells.

### **Cytomorphometric analysis**

According with the Ogden *et al.*<sup>21</sup> methodology, 50 cells in each slide had been used to the morphometric analysis. Cell images were captured by Sony CCD Iris Color (Sony Model DXC-107A, Japan) at X400 magnification and the NAs and CAs were obtained using the Image-Pro Plus image analysis system (Media Cybernetics, Silver Spring MD), version 4.5.029 for Windows 98/NR/2000, according to described methodology by Woyceichoski *et al.*<sup>22</sup>

### **Statistical analysis**

The statistical tests of results were performed with SPSS for Windows 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Chi-square and Fisher's exact tests were applied on the cytomorphologic dates. For all analyzed cytomorphometric variables, Kolmogorov-Smirnov's normality test, Levene's variance test and Student's t-test had been applied. Differences were considered statistically significant when P was less than .05.

## **RESULTS**

All this study participants were male and their mean age was 39.7 (24 to 58) years. Amongst the experimental group patients, the mean value of CD4 count was 332 cells/mm<sup>3</sup>.

In the qualitative cytological analyses, all slides had been classified as Papanicolaou Class I or Class II, what means that they had presented normal smears with or without inflammatory cells. When experimental and control groups were compared about inflammatory cells presence, there wasn't significant statistical difference between groups or collection localization ( $P > .05$ ), as illustrated in Table I.

Table II shows the quantitative cytological analysis results. There was no significant statistical difference regarding the smears cellular predominance between the groups in tongue or buccal mucosa ( $P > .05$ )

The average values for CA, NA and NA/CA ratio are illustrated in Table III. The mean CA values of the experimental group revealed a significant decrease when compared to control group in both collection sites. In opposition, the experimental group mean values of NA had showed a highly significant increase when compared with those presented by control group, independently of the collect localization. NA/CA ratio of experimental group patients was increased in comparison with control group in both analyzed anatomic regions ( $P < .05$ )

## **DISCUSSION**

Since the first reports at the early 80's until current days, the Human Immunodeficiency virus (HIV) and its induced chronical infection (AIDS) had become a worldwide epidemic and several studies have been published about both. As the HIV infection targets are the host immune system cells, many infectious or malignant opportunistic diseases can accomit the HIV-infected individuals.<sup>13</sup>

Until now, there are many described oral manifestations of HIV-infected patients.<sup>23</sup> The most common are caused by fungal (candidiasis), bacterial (*Mycobacterium*), and viral infections (Epstein Baar Virus, Herpes Virus, Human Papiloma Virus, among others), as well as tumors (Kaposi's sarcoma and Lymphoma) and unknown etiology diseases.<sup>12-15,23,24</sup> In a healthy body, there is a delicate balance between the complex oral microbiota and the immune system.<sup>4</sup> When HIV penetrates the host organism it attacks and destroys this balance, leading the host to a higher susceptibility to life-threatening opportunistic infections.

The HIV infection process of oral mucosa still remains unclear. Some studies had demonstrated that HIV can be detected in infected patient saliva, however, it is not considered an usual way of transmission since the virus is found in lower concentrations in saliva than in the common transmission fluids, as blood or semen.<sup>25</sup>

Exfoliative cytology is an auxiliary method of diagnosis that consists of collecting exfoliated cells in an interest surface and analyzing the cells characteristics, to guide diagnosis or indicate important alterations in this epithelium. As argued by Burzlaff *et al.*,<sup>26</sup> cytologic studies can be useful tools in cellular changes evaluation in apparently normal epithelium, where biopsies are not indicated.

In the present study, the experimental group composed only by individuals that not present oral injuries, the average value of CD4 count was 332 cells/mm<sup>3</sup>, similarly to Lourenço and Figueiredo<sup>27</sup> study, where the HIV carrying patients who had not presented oral

lesion had 352 cells/mm<sup>3</sup> as average CD4 count value (considerably higher value than infected patients that had presented injuries).

In this study, aiming exactly to assess potential cellular alterations in not injured tissues, the cell collection in both groups was only performed on healthy areas of the oral mucosa. This must explain the fact that all the smears, when qualitatively classified, had present normal epithelial cellular aspect, with or without inflammatory cells presence independently of the groups. No dysplastic or neoplastic suggestive cellular alteration was observed between the groups or the analyzed zones.

Some studies have demonstrated that cytoplasmic and nuclear areas can be modified in consequence of some systemic conditions (for example, diabetes and anemia) or some local aggressive agents (as tobacco, alcohol and illicit drugs).<sup>20-22,28-32</sup> However, there is not similar studies relating possible morphometric effects of HIV on oral epithelium keratinocytes.

Ramaesh *et al.*<sup>33</sup> study suggested that cytoplasmic diameter (CD) tend to decrease in dysplastic lesions when compared with healthy tissues, and decrease even more in neoplastic lesions. On the other hand, the nuclear diameter (ND) tends to increase according the higher malignant potential of the injuries. Therefore, the present study results where the cytoplasmic area values are lower and the nuclear area values are higher in experimental group can justify the higher incidence of injuries and neoplasms<sup>34</sup> in HIV infected patients oral mucosa.

A potential HIV infection induced alteration in epithelial maturation process may represent another explanation for these values changes. As basal keratinocytes pass through normal epithelial maturation, they have their cytoplasms gradually increased and their nuclei decreased, resulting in a gradual reduction of nucleus/cytoplasm ratio as well. It is still important to emphasize that the gradual cytoplasmic increase is more accented in non-keratinized epithelium and the nuclear decrease is more prominent in keratinized epithelium, in which sometimes completely non-nucleated cell were found in superficial layer.<sup>35</sup>

In the present study, the experimental group results had not show significant differences related to collect localization, but, even so, a maturation process alteration or a potential epithelial atrophy provoked by HIV infection may have resulted in a collection of cells usually deeply located in this epithelium.

The HIV presence with the basal keratinocytes was confirmed on oral mucosa biopsies of infected patients, suggesting these cells infection.<sup>17</sup> Moreover, apoptosis induction by specific HIV viral proteins can represent a potential complementary mechanism that can modify the oral mucosa barrier.<sup>16</sup> This HIV infection induced apoptosis can lead to a possible epithelial atrophy, explaining again the deeper cell collection. Anyway, only a histopathological study, where the epithelial layers can be studied on this original structure, could confirm this hypothesis since exfoliative cytology only assess isolated cells, out of their tissue conformation.

It's important to considerate that the changes induced on the keratinocytes can be related with antiretroviral (ARV) therapy in the investigated infected patients. Studies have demonstrated that general oral lesions incidence on HIV carrying patients is higher on those that don't have regular ARV therapy than those that take continuous medication<sup>11,27</sup> with the still not explained exception of the warty injuries caused by HPV, that present an increased among of cases between the patient that uses ARV continuous medication.<sup>36,37</sup> Several studies demonstrates some collateral effect induced by ARV on patient's mouths, such as: recurrent oral ulceration, lipodystrophy syndrome, xerostomy, disgeusy, cheilitis, multiform erythema, lichenoid reaction, and others.<sup>37,38</sup>

Only six (20 percent) of this study experimental group patients haven't taken ARV regularly at collection moment and although none patient had presented oral injuries, important morphometric cellular alterations were found. There is no literature reports evaluating the specific ARV effects on oral mucosa, however the changes found in this study

could indicate some association between the observed alterations and the use of this drugs and explain the higher oral injuries incidence among the HIV infected individuals in comparison to the non-infected population.

As, throughout as many years of research the life conditions of the HIV carrying patients had presented great improvements, most of them consequences to ARV use, and considering that great part of the infected individuals presents oral lesions as important markers of the disease progression; additional studies should be conducted to anticipate the oral mucosa changes in these patients and try to relate them to many AIDS associated factors and available treatments.

## REFERENCES

1. Montagnier L. Historical essay. A history of HIV discovery. Science 2002; 298(5599):1727-8.
2. World Health Organization. Current and future dimensions of the HIV/AIDS pandemic – a capsule summary. Geneva, WHO, 1991.
3. Ranganathan K, Hemalatha R. Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. Adv Dent Res. 2006;19(1):63-8.
4. Adurogbangba MI, Aderinokun GA, Odaibo GN, Olaleye OD, Lawoyin TO. Orofacial lesions and CD4 counts associated with HIV/AIDS in an adult population in Oyo State, Nigeria. Oral Dis 2004; 10: 319-326.
5. Greenspan JS. Sentinels and signposts: the epidemiology and significance of the oral manifestations of HIV disease. Oral Dis 1997; 3(Suppl 1):S13-7.
6. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4<sup>+</sup> cell count and viral load in Italian study population. J Oral Pathol Med 1999; 28:173–7.
7. Patton LL, McKaig RG, Eron JJ Jr, Lawrence HP, Strauss RP. Oral hairy leukoplakia and oral candidiasis as predictors of HIV viral load. AIDS 1999; 13:2174–6.

8. Cheingsong-Popov R, Callow D, Weber J, Holm-Hansen C, Constantine NT. Antibody to specific HIV-1 proteins in oral mucosal transudates. *Lancet* 1993; 341:1659-60.
9. Emmons WW, Paparello SF, Decker CF, Sheffield JM, Lowe-Bey FH. A modified ELISA and western blot accurately determine anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies in oral fluids obtained with a special collecting device. *J Infect Dis* 1995; 171:1406-10.
10. Langford A, Kunze R, Schmelzer S, Wolf H, Pohle HD, Reichart P. Immunocytochemical detection of herpes viruses in oral smears of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:49-57
11. Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Sierra-Madero J, Anaya-Saaverda G, González-Ramírez I, Ponce-de-León S. The changing clinical spectrum of human immunodeficiency virus (HIV)-related oral lesions in 1.000 consecutive patients. a 12-year study in a referral center in Mexico. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 39-50.
12. Baba TW, Trichel AM, An L, Liska V, Martin LN, Murphey-Corb M *et al.* Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science* 1996; 272:1486-9.
13. DePond W, Said JW, Tasaka T, de Vos S, Kahn D, Cesarman E *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and human herpesvirus 8 (KSHV/HHV8)-associated lymphoma of the bowel. Report of two cases in HIV-positive men with secondary effusion lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:719-24.

14. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T *et al.* Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 2000; 343:1369-77.
15. Shine N, Konopka K, Düzgünes N. The anti-HIV-1 activity associated with saliva. *J Dent Res* 1997; 76:634-40.
16. Acheampong EA, Parveen Z, Muthoga LW, Wasmuth-Peroud V, Kalayeh M, Bashir A *et al.* Molecular interactions of human immunodeficiency virus type 1 with primary human oral keratinocytes. *J Virol* 2005; 79: 8440-53.
17. Qureshi MN, Barr CE, Hewlitt I, Boorstein R, Kong F, Bagasra O *et al.* Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Dis* 1997; 3 Suppl 1: S73-8.
18. Liu X, Zha J, Chen H, Nishitani J, Camargo P, Cole SW *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 infection and replication in normal human oral keratinocytes. *J Virol* 2003; 77: 3470-6.
19. Armstrong BK, Muñoz N, Bosh FX. Epidemiology of cancer of the cervix. In: Coppleson M, editor. *Gynecologic oncology*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone: 1992; p.11-29.
20. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:126-30.
21. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.

22. Woyceichoski IE, de Arruda EP, Resende LG, Machado MA, Grégio AM, Azevedo LR *et al.* Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:745-9.
23. Reznik DA. Oral manifestations of HIV disease. *Top HIV Med* 2005;13(5), 143-8.
24. Nokta M. Oral manifestations associated with HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2008;5,5-12.
25. Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Valenza A, Cataldo PT *et al.* Analysis of HIV load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS* 1996;10:F51-6.
26. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD *et al.* Exposure to alcohol and tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007;18,367-75.
27. Lourenço AG, Figueiro LT. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13,E281-6.
28. Orellana-Bustos AI, Spinoza-Santander IL, Franco-Martínez ME, Lobo-James-Freire N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of oral normal mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral* 2004;9:097-203.

29. Lima AAS, Woyceichoski IEC, Batista AB, Gregio AMT, Ignacio AS, Machado MAN *et al.* Cytopathological changes in oral epithellium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline* 2007;1:31-40.
30. Macleod RI, Hamilton PJ, Soames JV. Quantitative exfoliative oral cytology in iron-deficiency and megaloblastic anemia. *Anal Quant Cytol Histol* 1988;10:176-80.
31. Shareef BT, Ang KT, Naik VR. Qualitative and quantitative exfoliative cytology of normal oral mucosa in type 2 diabetic patients. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2008;13:E-693-6.
32. Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AA, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by smoking and alcohol consumption. *Acta Cytol* 2006;50:435-40.
33. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analyses of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
34. Epstein JB, Silverman S Jr. Head and neck malignancies associated with HIV-infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:193-200.
35. Ten Cate AR. *Oral Histology: development, structure, and function*. Saint Louis: Mosby-Year Book: 1998; p298-306.

36. Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci* 2004;328,57-63.
37. Hodgson TA, Greenspan D, Greenspan JS. Oral lesions of HIV disease and HAART in industrialized countries. *Adv Dent Res* 2006; 19,57-62.
38. Moura MD, Senna MI, Madureira DF, Fonseca LM, Mesquita RA. Oral adverse effects due the use of Nevirapine. *J Contemp Dent Pract* 2008;9,84-90.

## TABLES

TABLE I. Slides inflammatory presence's classification according to the groups and collection localization (P>0.5).

|                         |          | Group        |          | P value |
|-------------------------|----------|--------------|----------|---------|
|                         |          | Experimental | Control  |         |
| Collection Localization |          |              |          |         |
| Tongue                  |          |              |          |         |
|                         | Class I  | 19 (63,3%)   | 21 (70%) | .5838   |
|                         | Class II | 11 (36,67%)  | 09 (30%) |         |
| Buccal Mucosa           |          |              |          |         |
|                         | Class I  | 17 (56,67%)  | 18 (60%) | .7934   |
|                         | Class II | 13 (43,33%)  | 12 (40%) |         |

*Chi-square test Fisher's exact test*

TABELA 2. Slides predominant cellularity's classification according to the groups and collection localization (P>.05).

|               |                 | Group        |             | P value |
|---------------|-----------------|--------------|-------------|---------|
|               |                 | Experimental | Control     |         |
| Localization  |                 |              |             |         |
| Tongue        |                 |              |             |         |
|               | Keratinized     | 15 (50%)     | 16 (53,33%) | .6899   |
|               | Non-keratinized | 4 (13,33%)   | 2 (6,67%%)  |         |
|               | Both            | 11 (36,67%)  | 12 (40%)    |         |
| Buccal Mucosa |                 |              |             |         |
|               | Keratinized     | 11 (36,67%)  | 8 (26,67%)  | .2727   |
|               | Non-keratinized | 6 (20%)      | 3 (10%)     |         |
|               | Both            | 13 (43,33%)  | 19 (63,33%) |         |

*Chi-square test.*

TABLE 3. Average of cytoplasmic and nuclear areas and NA/CA ratio according to the groups and collection localization (P<.05)

|               | Group               |                     | P value |
|---------------|---------------------|---------------------|---------|
|               | Experimental        | Control             |         |
| Localization  |                     |                     |         |
| Tongue        |                     |                     |         |
| CA            | 2.249,4 ± 190,8 µm² | 2.457,5 ±182,8 µm²  | .00006  |
| NA            | 64,4 ± 10,5 µm²     | 55,8 ±10,7 µm²      | .00308  |
| NA/CA         | 0,030 ± 0,006       | 0,023 ± 0,005       | .00001  |
| Buccal mucosa |                     |                     |         |
| CA            | 2.440,0 ± 326,3 µm² | 2.673,7 ± 237,5 µm² | .00242  |
| NA            | 69,8 ± 11,2 µm²     | 59,8 ± 11,0 µm²     | .00095  |
| NA/CA         | 0,031 ± 0,006       | 0,023 ± 0,005       | .00000  |

*Student's t test*

### **3.ANEXOS**

## ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>PUCPR</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ</b><br><b>Núcleo de Bioética</b><br><b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>                 |
| <b>PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                      |
| Parecer Nº <b>0001216/07</b><br>Título do projeto <b>Estudo citológico da mucosa bucal de indivíduos portadores do vírus HIV.</b><br>Protocolo CONEP<br>Instituição                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Protocolo CEP Nº <b>2122</b><br>Grupo <b>III</b><br>Versão <b>1</b><br><br>Pesquisador responsável <b>Adriane Bastos Pompermayer</b> |
| <b>Objetivos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                      |
| <p><b>GERAL:</b><br/>Avaliar se o vírus da imunodeficiência humana é capaz de induzir alguma modificação morfológica e morfolétrica nas células epiteliais de mucosa bucal humana.</p> <p><b>ESPECÍFICOS:</b><br/>Analisar por meio da citologia esfoliativa em base-líquida se ocorre alterações:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Morfológicas no núcleo das células da mucosa bucal em função da infecção pelo vírus HIV;</li><li>• Morfolétricas no núcleo das células da mucosa bucal em função da infecção pelo vírus HIV;</li><li>• Morfológicas no citoplasma das células da mucosa bucal em função da infecção pelo vírus HIV;</li><li>• Morfolétricas no citoplasma das células da mucosa bucal em função da infecção pelo vírus HIV;</li><li>• Na relação área do núcleo/área do citoplasma nas células epiteliais da mucosa bucal em função da infecção pelo vírus HIV;</li></ul>                                                                                                                             |                                                                                                                                      |
| <b>Comentários</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                      |
| Projeto bem delinado e sem implicações éticas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                      |
| <b>Termo de consentimento livre e esclarecido</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |
| adequado e bastante explícito, sem recomendações de alteração.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                      |
| Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: <b>14/11/2007</b> , manifesta-se por considerar o projeto <b>Aprovado</b> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                      |
| <b>Situação Aprovado</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                      |
| <p>Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.</p> <p>Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.</p> <p>Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.</p> |                                                                                                                                      |
| Curitiba, 14 de Novembro de 2007.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |
| <br><b>Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira</b><br><b>Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa</b><br><b>PUC PR</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                  |

## **ANEXO 2- MÉTODO**

### **Linha de Pesquisa**

Este estudo faz parte da linha de pesquisa denominada de Epidemiologia, Diagnóstico e Terapêutica, do curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). O projeto foi submetido à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR.

### **Delineamento**

Este trabalho constitui um estudo experimental do tipo estudo controlado randomizado do paradigma quantitativo segundo a classificação de Freire e Patussi.<sup>1</sup>

### **População**

A população investigada neste estudo constituiu-se de indivíduos adultos, brasileiros, do sexo masculino e portadores (grupo experimental) e não portadores do vírus HIV-1 (grupo controle).

### **Amostra**

A amostra empregada neste estudo foi composta de 60 (sessenta) indivíduos adultos, divididos em dois grupos: o grupo experimental foi composto por 30 (trinta) pacientes portadores do vírus HIV-1 provenientes do Hospital Oswaldo Cruz e o grupo controle foram formados por 30 (trinta) voluntários ou pacientes da clínica odontológica da PUCPR não

---

<sup>1</sup> Freire MCM, Patussi MP. Tipos de estudos. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médica, 2001: p. 307-25.

portadores do HIV. O critério do pareamento foi a idade entre os pacientes, sendo que os voluntários apresentaram idades entre 20 e 55 anos.

#### **Critérios de inclusão**

- Indivíduos do sexo masculino.
- Idade entre 20 e 55 anos.
- Diagnóstico positivo por meio de sorologia para o HIV-1 (grupo experimental).

#### **Critérios de exclusão**

- Usuários de enxaguatórios bucais
- Alcoólatras
- Tabagistas
- Portadores de lesão na mucosa bucal

#### **Procedimento de Coleta de Material**

Inicialmente, os indivíduos foram convidados a participar do estudo. Os objetivos específicos e a metodologia da pesquisa foram explicados de forma detalhada aos participantes, e os mesmos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de participação na pesquisa (anexo 3).

A coleta de células para a pesquisa foi realizada nas dependências do Hospital Oswaldo Cruz e da Clínica Odontológica da PUCPR no período de outubro de 2007 a junho de 2008, por meio da técnica da citologia em base-líquida. Para tal, inicialmente os indivíduos foram submetidos à anamnese e exame clínico, e os dados obtidos, bem como resultados de exames complementares (carga viral, contagem de CD4 e CD8 e dados do hemograma), quando disponíveis, foram registrados em ficha padronizada (anexo 4).

Na seqüência, os pacientes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água para remover possíveis restos alimentares, muco ou outras sujidades. A coleta de células foi obtida por meio do *kit* do sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup> (DIGENE, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (DIGENE, Brasil), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015. Este *kit* é composto por um frasco contendo um mililitro de líquido preservador de células e uma escova com cerdas de nylon e cabo longo de plástico (Fig. 1).

Para a execução desta manobra, o participante foi orientado a deixar a sua boca aberta e o pesquisador procedeu suavemente a aplicação da escova em movimento giratório no sentido horário (cinco voltas) sobre a mucosa jugal do paciente. Com o frasco já aberto, em seguida, a parte da escova que apresenta as cerdas foi acondicionada em seu interior para preservação das células epiteliais, sempre observando se a escova estava totalmente submersa na solução. O frasco foi tampado, identificado e agitado por aproximadamente 20 segundos para homogeneização da amostra.

Em seguida, o mesmo procedimento foi repetido na borda de língua do mesmo paciente. Dessa forma, foram obtidas duas amostras de cada participante da pesquisa. Após a obtenção das duas amostras, ambas foram acondicionadas sob refrigeração (8°C) até o momento do processamento laboratorial, realizado no Laboratório de Estomatologia da PUCPR, localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS). Deve-se ressaltar que segundo instruções do fabricante do produto, as amostras podem permanecer armazenadas por até 6 (seis) meses sob refrigeração, e neste estudo todas as amostras foram processadas antes desse prazo.

### **Procedimento de Preparo das Lâminas**

Conforme as orientações do fabricante, as amostras acondicionadas sob refrigeração foram dispostas no *UCM rack*, elemento constituinte do Sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup>, e

deixadas por cerca de trinta minutos à temperatura ambiente (Fig. 2). Enquanto isso, as lâminas constituintes do *Lamigene*, cartela fabricada em polipropileno contendo doze lâminas histológicas de vidro, foram identificadas de acordo com o número da ficha de identificação para evitar possíveis trocas de material.

A seguir, cada amostra foi homogeneizada individualmente pela colocação do mesmo sobre um aparelho agitador de tubos do tipo *vortex*, em alta velocidade e por aproximadamente vinte segundos, com o objetivo de ressuspender as soluções e desprender as células das cerdas da escova (Fig. 3).

Uma alíquota de 200 (duzentos)  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida do interior do frasco para a superfície da membrana do *FiltroGene* (filtro especial composto por uma membrana de policarbonato) com o auxílio de uma pipeta monocal, e espalhada uniformemente sobre ela (Figs. 4 e 5).

A seguir, a prensa metálica constituinte do sistema, *PrepGene*, foi fechada por meio do levantamento de suas travas laterais por aproximadamente dez segundos (Fig. 6), havendo, ao final, o chamado *imprint*, ou seja, a transferência das células retidas na superfície das membranas sobre as lâminas.

As lâminas foram fixadas por imersão em uma solução de álcool etílico absoluto por vinte minutos.

### **Coloração das Lâminas**

Após a fixação, as lâminas foram coradas pela técnica de Papanicolaou modificada por sugestão do fabricante, descrita a seguir (Fig. 7):

- |                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| • Álcool Etílico 80% | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Etílico 70% | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Etílico 50% | 10-15 mergulhadas |

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| • Água Destilada             | 10-15 mergulhadas |
| • Hematoxilina de Harris     | 1 minuto          |
| • Água Corrente              | 2 minutos         |
| • HCl 0,5% em água destilada | 2 mergulhadas     |
| • Água Corrente              | 2 minutos         |
| • Álcool Etílico 50%         | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Etílico 70%         | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Etílico 80%         | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Absoluto            | 10-15 mergulhadas |
| • Orange G 6                 | 1 mergulhada      |
| • Álcool Absoluto            | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Absoluto            | 10-15 mergulhadas |
| • Álcool Absoluto            | 10-15 mergulhadas |
| • EA-36                      | 1 minuto          |
| • Álcool Absoluto            | 10 mergulhadas    |
| • Álcool Absoluto            | 10 mergulhadas    |
| • Álcool Absoluto            | 10 mergulhadas    |
| • Álcool Absoluto            | 10 mergulhadas    |
| • 50/50 Xilol e Álcool       | 10-15 mergulhadas |
| • Xilol                      | 10-15 mergulhadas |
| • Xilol                      | 10-15 mergulhadas |
| • Xilol                      | 10-15 mergulhadas |
| • Xilol                      | 10-15 mergulhadas |
| • Montagem da Lamínula       | Entellan®         |

## **Método de Análise**

Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para a realização de um estudo duplo-cego, evitando viés. A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes, por uma câmera de vídeo *Sony CCD Íris Color* (Sony Model DXC-107A, Japão) e as avaliações das áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) e da relação AN/AC das células foram feitas por meio do sistema de análise de imagens *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring Md), versão 4.5.029 *for Windows* 98/NR/2000.

Todas as lâminas foram analisadas pela autora da pesquisa, após treinamento e período prévio de calibração sob supervisão de um patologista.

### **1) Análise Citológica**

#### **A) Avaliação Qualitativa**

As lâminas foram examinadas e classificadas segundo os critérios citopatológicos do Papanicolaou<sup>2</sup> descritos abaixo:

- Classe 0: Material insuficiente ou inadequado para análise.
- Classe I (Esfregaço normal): As células observadas apresentam padrão morfológico normal em todo esfregaço.
- Classe II (Esfregaço normal com alterações inflamatórias): Observação de células inflamatórias no esfregaço examinado em pelo menos em dois campos. Presença de alterações citológicas tais como: mudança da relação núcleo-

---

<sup>2</sup> Armstrong BK, Muñoz N, Bosh FX. Epidemiology of cancer of the cervix. In: Coppleson M, editor. Gynecologic oncology. 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone: 1992; p.11-29.

citoplasma em favor do núcleo, células multinucleadas, presença de halos perinucleares.

- Classe III (Alterações displásicas - esfregaço suspeito): Presença de alterações celulares em até dois campos por esfregaço. São consideradas displásicas as células cujos núcleos apresentam alguns critérios de malignidade, mas que mantenham o citoplasma com aspecto normal.
- Classe IV (Fortemente indicativa, mas não conclusiva de malignidade): Presença de alterações celulares em dois ou mais campos. O número de células malignas imaturas, ou seja, células da camada basal e parabasal redondas ou ovais, com o núcleo em posição central.
- Classe V (Esfregaço maligno): Presença de alterações celulares compatíveis com neoplasia maligna.

### **B) Avaliação Quantitativa (Critérios Citológicos de Maturação)**

Foram contadas 50 células, ao acaso, para a avaliação quantitativa da maturação epitelial, em cada esfregaço, considerando-se aquelas que estiveram, em cada amostra, bem distendidas e isoladas entre si. A lâmina foi observada em toda a sua extensão, no plano horizontal, da esquerda para a direita. A quantidade de células epiteliais ceratinizadas e não-ceratinizadas foi analisada observando-se o predomínio do tipo celular em cada esfregaço.

### **2) Análise Citomorfométrica**

Cinquenta células de cada lâmina foram examinadas aleatoriamente. As áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) foram obtidas pela delimitação dos limites do núcleo e do citoplasma da célula, usando-se o cursor digitador e a placa no modo de medida. A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes, por uma câmera *Sony CCD Íris* (Color Vídeo Câmera) e a avaliação das células foi feita por meio do

sistema de análise de imagens *Image-Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000 (Figs. 8 e 9).

### **3) Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados obtidos e devidamente tabulados foi realizada com o auxílio do *software* estatístico *SPSS* versão 13.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Na análise citomorfológica, foram aplicados os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Para a análise morfométrica, o teste aplicado para todas as variáveis foi o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e o teste de homogeneidade da variância de *Levene*. Uma vez que todas as variáveis apresentaram distribuição normal, à exceção de apenas uma (porém, como a amostra possui  $n \geq 30$ , pôde-se assumir então distribuição normal de todas as variáveis); o teste utilizado foi o paramétrico t de *Student*. Foram consideradas diferenças estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ .

### ANEXO 3- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
nacionalidade: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, estado  
civil: \_\_\_\_\_, profissão: \_\_\_\_\_, endereço:  
\_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar de uma pesquisa chamada:  
ESTUDO CITOLÓGICO DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DO  
VÍRUS HIV, cujos objetivos e justificativas são:

A AIDS é uma doença infecciosa grave decorrente da infecção por um vírus chamado HIV. Até o presente momento, a contaminação de pacientes por este vírus através da boca ainda não está totalmente esclarecida. Também é um fato a ser desvendado se este vírus é capaz de induzir algum tipo de modificação nas células que revestem a boca.

Sendo assim, a minha participação no referido estudo será no sentido de realizar um enxágüe bucal com água e em seguida, o pesquisador realizará a coleta de células por meio de uma escova de cerdas de nylon suavemente em movimentos giratórios (cinco voltas) em minha bochecha e na minha língua.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: As células obtidas de minha boca serão analisadas por meio de um microscópio. Caso o pesquisador encontre qualquer alteração microscópica importante nas células de sua boca, eu serei imediatamente informado do resultado do exame.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, entendi que esta raspagem bucal com a escova não oferecerá qualquer tipo de risco ou desconforto a mim.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, serpa mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são o Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, professor do curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUC-PR, e Adriane Bastos Pompermayer, mestranda em Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUC-PR, e com eles poderei manter contato pelos telefones : (41) 32712952 (Dr. Antonio Adilson Soares de Lima) e (41) 99083774 (Adriane Bastos Pompermayer).

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

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

No entanto, eu não terei nenhuma despesa decorrente da minha participação na pesquisa, pois todos os gastos referentes ao exame microscópico serão custeados pelos pesquisadores.

Curitiba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

---

*Nome e assinatura do sujeito da pesquisa*

---

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

## ANEXO 4 – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ PUCPR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE – CCBS  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
ESTOMATOLOGIA / PATOLOGIA

### FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO CITOLÓGICO DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS  
PORTADORES DO VÍRUS HIV.

NOME: \_\_\_\_\_

Ficha nº: \_\_\_\_\_

Prontuário Hospital nº \_\_\_\_\_

Prontuário da PUCPR nº \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( )

Profissão: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### DADOS COMPLEMENTARES

- 1) Quando foi realizado o diagnóstico da infecção pelo HIV? \_\_\_\_\_
- 2) Qual (is) medicamento(s) faz uso? \_\_\_\_\_
- 3) Carga viral: \_\_\_\_\_ CD4/CD8: \_\_\_\_\_
- 4) Apresenta algum outro tipo de doença sistêmica? Sim ( ) Não ( )
- 5) Em caso afirmativo, descreva: \_\_\_\_\_

## ANEXO 5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

TABELA 1- Testes de Frequência do Qui-quadrado e exato de Fisher para a Avaliação Citológica Qualitativa nos dois grupos

| <i>Mucosa</i> | <i>Teste do Qui-quadrado</i> |             |          | <i>Teste Exato de Fisher</i> |
|---------------|------------------------------|-------------|----------|------------------------------|
|               | <i>Valor</i>                 | <i>G.L.</i> | <i>p</i> | <i>p</i>                     |
| Lingual       | 0,3                          | 1           | 0,583*   | 0,784*                       |
| Jugal         | 0,068                        | 1           | 0,793*   | 1*                           |

LEGENDA: G.L. – Graus de liberdade

NOTA: \*Frequência normal para  $p > 0,05$

TABELA 2- Teste de frequência do Qui-quadrado para a Avaliação Citológica Quantitativa nos dois grupos investigados

| <i>Mucosa</i> | <i>Teste do Qui-quadrado</i> |             |          |
|---------------|------------------------------|-------------|----------|
|               | <i>Valor</i>                 | <i>G.L.</i> | <i>p</i> |
| Lingual       | 0,742                        | 2           | 0,689*   |
| Jugal         | 2,598                        | 2           | 0,272*   |

LEGENDA: G.L. – Graus de liberdade

NOTA: \*Frequência normal para  $p > 0,05$

TABELA 3- Teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliação citomorfométrica nos grupos estudados

| <i>Variável</i> | <i>Grupo</i> | <i>Valor</i> | <i>n</i> | <i>p</i> |
|-----------------|--------------|--------------|----------|----------|
| ACL             | Experimental | 0,0797       | 30       | 0,20000* |
|                 | Controle     | 0,1410       | 30       | 0,13227* |
| ANL             | Experimental | 0,1397       | 30       | 0,13995* |
|                 | Controle     | 0,1258       | 30       | 0,20000* |
| ANL/ACL         | Experimental | 0,1055       | 30       | 0,20000* |
|                 | Controle     | 0,0895       | 30       | 0,20000* |
| ACJ             | Experimental | 0,1406       | 30       | 0,13423* |
|                 | Controle     | 0,1056       | 30       | 0,20000* |
| ANJ             | Experimental | 0,1348       | 30       | 0,17318* |
|                 | Controle     | 0,2122       | 30       | 0,05503* |
| ANJ/ACL         | Experimental | 0,1321       | 30       | 0,19225* |
|                 | Controle     | 0,1758       | 30       | 0,03912  |

NOTA: \*Distribuição normal para  $p > 0,05$

TABELA 4- Teste de igualdade de variância *t de Student* controlado pelo teste de homogeneidade de variância de *Levene* para todas as variáveis da análise citomorfológica

| <i>Variável</i> | <i>Teste de Levene</i> |              |              |          | <i>Teste t de Student</i> |             |          |
|-----------------|------------------------|--------------|--------------|----------|---------------------------|-------------|----------|
|                 | <i>Estatística</i>     | <i>G.L.1</i> | <i>G.L.2</i> | <i>p</i> | <i>t</i>                  | <i>G.L.</i> | <i>p</i> |
| ACL             | 0,1641                 | 1            | 58           | 0,68690* | -4,3135                   | 58          | 0,00006  |
| ANL             | 0,8289                 | 1            | 58           | 0,36635* | 3,0885                    | 58          | 0,00308  |
| ANL/ACL         | 0,0578                 | 1            | 58           | 0,81702* | 4,9781                    | 58          | 0,00001  |
| ACJ             | 3,0263                 | 1            | 58           | 0,08772* | -3,1725                   | 58          | 0,00242  |
| ANJ             | 0,2947                 | 1            | 58           | 0,58928* | 3,4840                    | 58          | 0,00095  |
| ANJ/ACJ         | 2,2581                 | 1            | 58           | 0,13605* | 5,2457                    | 58          | 0,00000  |

LEGENDA: G.L. – Graus de liberdade

NOTA: \*Homogeneidade de variância para  $p > 0,05$

## ANEXO 6- ILUSTRAÇÕES



FIGURA 1- Kit *Universal Collection Medium* (DIGENE, Brasil) para citologia esfoliativa.



FIGURA 2 – Amostras dispostas no *UCM rack*.



FIGURA 3 – Homogeneização das amostras no agitador de tubos do tipo vortex .



FIGURA 4 – Alíquota da amostra obtida com auxílio de pipeta monocal.

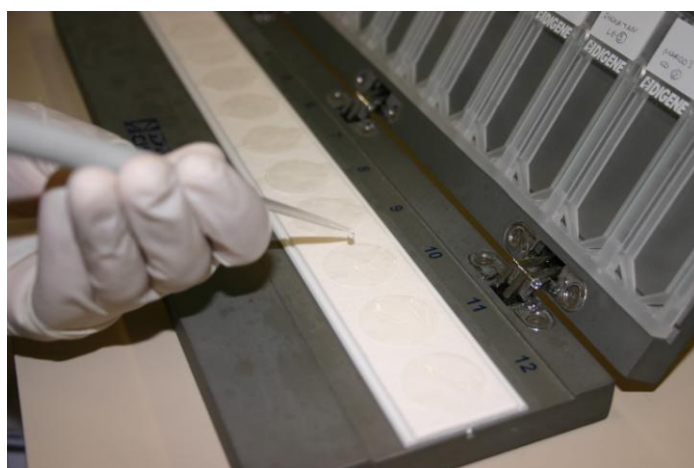


FIGURA 5 – Alíquota da amostra disposta sobre a membrana do *FiltroGene*.



FIGURA 6 – Prensa metálica fechada para transferência celular para as lâminas de vidro.



FIGURA 7 – Lâminas sendo submetidas ao processo de coloração de Papanicolaou.

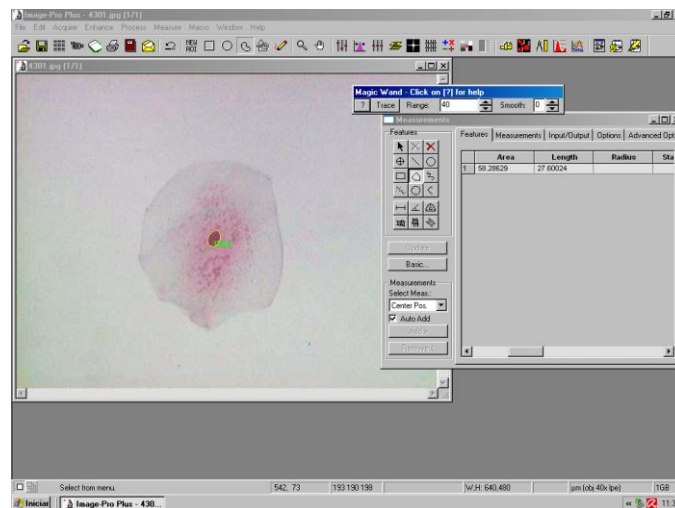


FIGURA 8- Layout do software Image-Pro Plus.

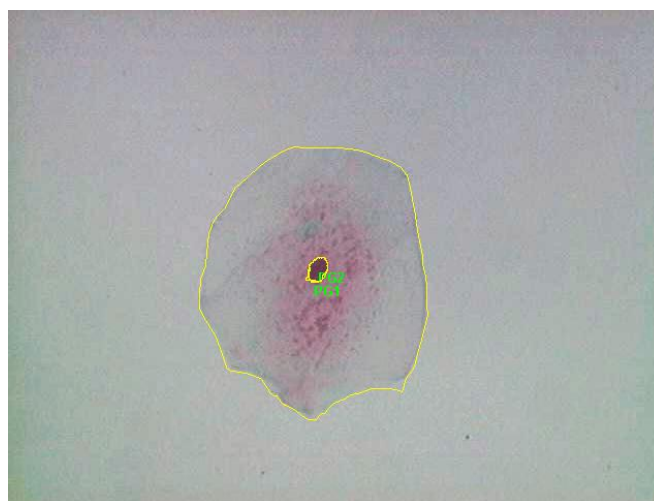


FIGURA 9 - Delimitação das áreas citoplasmática e nuclear para medição.

ANEXO 7- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ORAL SURGERY, ORAL  
MEDICINE, ORAL PATHOLOGY, ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTOLOGY

**Guide for Authors**

*Editorial Office*

Dr James R. Hupp, Editor-in-Chief, School of Dentistry, The University of Mississippi Medical Center, Rm D216- 08, 2500 North State St, Jackson, MS 39216-4504; telephone: (601)815-1952; fax: (601)984-4949; e-mail: [tripleo@sod.umsmed.edu](mailto:tripleo@sod.umsmed.edu)

*Publisher*

**ELSEVIER INC.**, 11830 Westline Industrial Dr, St Louis, MO 63146-3318

*Issue Manager*, **Jill Shepherd**. Telephone: (352)483-8112; fax: (352)483-3417; e-mail: [shepherdja@aol.com](mailto:shepherdja@aol.com)

**Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology On-Line Manuscript Submission**

**Submission of Manuscripts.** *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/tripleo> authors are stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to the Elsevier Editorial System (EES), authors must provide an electronic version of their manuscript. For this purpose original source files, not PDF files, are required. The author should specify an article type for the manuscript (full length article, review article, case report, etc.), choose a set of classifications from the prescribed list provided online, and suggest the appropriate Journal section. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or Journal procedures to the Editorial Office. Once the submission files are uploaded, the system automatically generates

an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions will be communicated by e-mail.

International authors who are not completely fluent in the English language should seek help in the preparation of their manuscripts. Such assistance will enhance the review, improve the chance of acceptance, and greatly reduce the time until publication if the article is accepted.

If your manuscript is accepted, the Editors reserve the right to determine whether it will be published in the print edition or solely in the Internet edition of the Journal. Articles accepted for publication are subject to editorial revision.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor(s) or publisher, and the Editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the Editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication. Neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of such product or service.

**Duality of Interests.** Any commercial or other associations that might create a duality of interests in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors including author(s) relationship with a corporate entity involved with the subject of the research or product being espoused in the submission. A cover letter at the time of submission should inform the Editor of pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the

manuscript is accepted, the Editor will communicate with the authors how best to disclose the relevant information.

**Publication Standards of Ethical Conduct.** Submitting manuscripts for publication that contain elements of fabrication, falsification, or plagiarism constitutes a major violation of the universally accepted standards of ethical and scientific conduct.

Articles falling into the following categories are invited for submission:

**Review manuscripts.** Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment are encouraged. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography should not necessarily be all-inclusive but rather include only seminal, pertinent, and contemporary references deemed to be most important by the author.

**Clinicopathologic Conference.** Papers submitted for the Clinicopathologic Conference (CPC) should present interesting, challenging, or unusual cases. The presentation should simulate clinical work-up, including a differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles will be organized into five parts: *Clinical presentation*-describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. *Differential diagnosis*-list and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. *Diagnosis*-histopathologic findings illustrated with photomicrographs. *Management*-describe the treatment of the patient and response to treatment. *Discussion*-concentrate on the most interesting aspect(s) of the case.

**Medical Management and Pharmacology Update.** The Medical Management and Pharmacology Update (MMPU) is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the

clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU would include: an abstract; topic introduction/overview; epidemiology/demographics; etiology and pathogenesis; clinical presentation/physical findings; diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); medical management and treatment; complications; prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12 point, double-spaced Times New Roman (Tables and Figures count toward the 12-page limit).

**Pharmacology Update** is a component section of MMPU that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry and dental specialties. Papers submitted should present clearly and concisely background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rational and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes and safety. Manuscripts should reflect the contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action, and tables to presents therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the above mentioned categories for formatting the

paper. Papers should not exceed 3000 words. The recommended font is 12 point, double spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

**Clinical Notes.** The Clinical Notes feature is intended to provide a forum for brief communications of a technical nature. They are not scientific papers; they may report a new instrument, technique, procedure, or, in rare situations, an interesting case report.

**Copyright statement.** The specified copyright statement that follows the Information for Authors in each issue of the Journal must be completed, **signed by all authors**, and faxed to the Editorial Office at (601)984-4949. If not completed in full, it will be returned to the author for completion. The copyright statement may be photocopied for submission or scanned and e-mailed.

**Copyright statement.** The copyright-transfer document must be downloaded, completed, signed by the responsible author, scanned and attached as a file in the submission process.

**Preparation of manuscripts.** Only original manuscripts that have not been published in other forms will be considered for publication. Correct preparation of the manuscript by the author will expedite the reviewing and publication procedures. Manuscripts should be word processed double-spaced. Please note the following requirements and the instructions for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo>.

The article, including all tables, should be formatted in the latest version of Microsoft Word. The use of appropriate subheadings throughout the body of the text (Methods, Results, and Discussion sections) is required. Legends for figures and tables should appear after the reference list. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source. Illustrations must also be submitted electronically as separate files (not embedded). File specifications are listed below in "Illustrations." Tables should be submitted as separate files (in Microsoft Word (\*.doc) format.)

Routine case reports add little to our knowledge, but good case reports may occasionally be published if they meet certain criteria: (1) are of rare or unusual lesions that need documentation, (2) are well documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) are cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed.

*Title Page.* The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. Listed authors should include only those individuals who have made a significant creative contribution. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number and e-mail address should be given.

*Authorship.* All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript. All three of these conditions must be met by each author. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; rather they should be acknowledged at the end of the paper.

*Abstract.* An abstract of no more than 150 words, typewritten double-spaced, should precede the introduction to the article and must accompany each manuscript.

*Structured abstract.* A structured abstract limited to 150 words must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: *Objective(s)*; *Study Design*; *Results*; and *Conclusion(s)*. The *Objective(s)* reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The *Study Design* should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention,

and the type of statistical analysis. The *Results* include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The *Conclusion(s)* states the significance of the results.

*Methods.* The methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the paper reports experiments on human subjects, the methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB) and that each subject in the project signed a detailed informed consent form.

*Animals.* Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

*References.* References should be cited selectively. Personal communications and unpublished data are not to be cited as references; instead, are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. Reference list format must conform to that set forth in "Uniform Requirement for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47). A copy of these Requirements may be viewed/printed online at [www.icmje.org](http://www.icmje.org). References to articles in press must include authors' surnames and initials, title of article, and name of journal. The reference list should be typed double-spaced on a separate page and numbered in order as the reference citations appear in the text. For journal citations, include surnames and initials of authors, complete title of article, name of journal (abbreviated according to the Cumulated Index Medicus), year of publication, volume, number, and inclusive page numbers. For book citations, surnames and initials of authors, chapter title (if applicable), editors' surnames and initials, book title,

volume number (if applicable), edition number (if applicable), city and full name of publisher, year of publication, and inclusive page numbers of citation.

**EXAMPLES** (if six or fewer authors, list all; if seven or more list first six and add *et al*):

*Format for periodical references:* Pullon PA, McGivney J. Computer utilization in an oral biopsy service. *Int J Oral Surg* 1977;6:251-5.

*Format for book references:* Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone: 1973; p. 51-6.

*Format for chapter references:* Hudson FB, Hawcroft J. Duration of treatment in phenylketonuria. In: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone; 1973. p. 51-6.

*Journal article on the Internet:* Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

*Illustrations.* Illustrations should be numbered and provided with suitable legends. A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author, but special arrangements must be made with the Editor-in-Chief for color plates, elaborate tables, or extra illustrations. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appears.

Illustrations must be submitted in electronic format. All images should be at least 5 inches wide. Images should be provided in TIF or EPS format, per the instruction for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo> . Macintosh or PC is acceptable. Graphics

software such as Photoshop and Illustrator (not presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics) should be used in the creation of the art. Color images need to be CMYK, at least 300 DPI, and be accompanied by a digital color proof, not a color laser print or color photocopy. Note: This proof will be used at press for color reproduction. Gray scale images should be at least 300 DPI accompanied by a proof. Combinations of gray scale and line art should be at least 1200 DPI accompanied by a proof. Line art (black and white or color) should be at least 1200 DPI with a proof.

For best possible reproduction, avoid using shading or dotted patterns; if unavoidable, submit this type of illustration in the form of a glossy photograph for best results. Use thick, solid lines and bold, solid type. Place lettering on a white background; avoid reverse type (white lettering on a dark background). Typewritten or freehand lettering is unacceptable. All lettering must be done professionally and should be in proportion to the drawing graph, or photograph. Do not send original art work, radiograph films, or electrocardiographic strips. Any special instructions regarding sizing should be clearly noted.

*Legends to illustrations.* Each illustration must be accompanied by a legend. These should be typed double-spaced on a separate page. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source.

*Tables.* The tables should be typewritten double-spaced, including column heads, data and footnotes, and submitted on separate pages. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations. If a table or any data therein have been

previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source.

*Video and Computer Graphics.* Authors are encouraged to submit videos and computer-generated graphics; eg, a slide presentation with or without animation and sound. An author who wishes to supply such material should notify the editors in the cover letter and note this intention in the Author Comments area of the online submission. Although the publisher will not edit any video or computer graphic, editors and reviewers may suggest changes. All patient-identifying information must be removed or masked.

The maximum length of a video or computer graphic is 8 minutes. Longer submissions may be divided into smaller clips, each of which should be identified at the beginning of the section (eg, Video Clip 1, Graphic 1). A concise legend for each video clip or computer graphic presentation must be included with the manuscript. Videos are to be submitted in MEG-1 or MPEG-2 (\*.mpg) or QuickTime (\*.mov) format. More detailed instructions can be found at <http://www.elsevier.com/artwork> . Videos and computer graphics accompanying a manuscript declined for publication will not be accepted separately. If the manuscript is accepted for publication, the presentation will be archived at [www.mosby.com/tripleo](http://www.mosby.com/tripleo).

*Permissions.* Direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted material must be accompanied by **written permission** for their use from the copyright owner and original author along with complete information with respect to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases showing informed consent. Articles appear in both the print and online versions of the journal, and wording should specify permission in all forms and media. Failure to obtain electronic permission rights may result in the images not appearing in the the print or online versions.

**NOTE: FOLLOW INSTRUCTIONS FOR ONLINE SUBMISSION AT**  
**[HTTP://EES.ELSEVIER.COM/TRIPLEO](http://ees.elsevier.com/tripleo)**

**Announcements.** Announcements must be received by the Editorial Office at least ten weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

**Reprints.** Because of the extremely high cost of preparing color articles, author reprints for articles containing color illustrations have to be prepared as overprints (overrun pages). Order forms will be sent to the **corresponding author** of articles containing color illustrations, so that overprints of those articles can be ordered the month of publication. No complimentary overprints or reprints will be provided.

#### *Checklist for authors*

\_\_\_Signed copyright transfer statement (signed by all authors) (FAXED to Editorial Office)

\_\_\_Letter of submission

\_\_\_Title page

\_\_\_Title of article

\_\_\_Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)

\_\_\_Author to whom correspondence, galley, and reprint request are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address

\_\_\_Structured abstract (double-spaced)

\_\_\_Article proper (double-spaced)

(Figures and tables should not be part of the text of the manuscript but added as separate files)

\_\_\_Statement of IRB review (stated in manuscript)

- \_\_References (double-spaced on a separate page)
- \_\_Reprint requests line (on a separate page)
- \_\_Tables (double-spaced, on separate pages)
- \_\_Legends (double-spaced, on a separate page)
- \_\_Illustrations, properly formatted (as separate files)
- \_\_Video/computer graphics, properly formatted (as separate files)
- \_\_Acknowledgments (on a separate page)
- \_\_Source of funding for research (on a separate page)
- \_\_Signed permission to reproduce previously published material, in all forms and media (scanned in as a file)
- \_\_Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual specifying permission in all forms and media (scanned in as a file)
- \_\_Financial interest disclosure, if applicable (on a separate page)
- \_\_If this paper was presented at a meeting identification of organization, city, and year (on a separate page)