

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

STEFÂNIA JERONIMO FERREIRA

**ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA E CITOMORFOMÉTRICA DO EPITÉLIO DA
MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM LÍQUEN PLANO**

CURITIBA

2011

STEFÂNIA JERONIMO FERREIRA

**ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA E CITOMORFOMÉTRICA DO EPITÉLIO DA
MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM LÍQUEN PLANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração: Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Reis Azevedo-Alanis.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ângela Naval Machado.

CURITIBA

2011



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

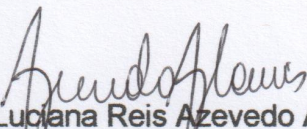
TERMO DE APROVAÇÃO

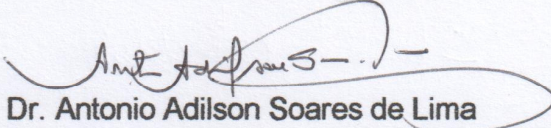
STEFÂNIA JERONIMO FERREIRA

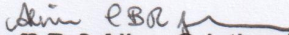
ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA E CITOMORFOMÉTRICA DO EPITÉLIO DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM LÍQUEN PLANO

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

Orientador(a):


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


Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR


Profª Drª Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 07 de fevereiro de 2011.

*Dedico esta dissertação, em especial, a **Joel de Barros Ferreira e Marta Rosi Jeronimo Ferreira**, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me incentivaram e ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei. Sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe. AMO VOCÊS!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, minha fonte de força, onde sempre encontrei respostas para minhas dúvidas. Obrigada Senhor por mais esta conquista, por me iluminar e me abençoar!

As minhas irmãs amadas, Rosielma Ferreira e Janyara Ferreira, pela amizade e companheirismo. Agradeço muito por sempre me apoiarem e suprir a minha ausência junto aos nossos pais.

Ao meu sobrinho, Alayn Kleber Jr., uma criança adorável, pelos momentos maravilhosos que ele me proporciona com a sua alegria. A tia ama muito!

Ao meu cunhado, Alayn Kleber, um exemplo de competência e dedicação à profissão. Muito obrigada pelo seu apoio!

A minha querida avó, Anita de Melo, que apesar de não estar mais entre nós, sempre estará presente em pensamento. E ao meu avô Josué do Vale, pelas suas palavras sábias.

Aos meus tios(as) e primos(as) por acreditarem na minha capacidade, algumas vezes, mais que eu. Vocês são muito importantes para mim!

À Dulce e à Ivonete, pelo cuidado e atenção que têm comigo, por me receberem tão bem e pelas boas risadas que damos juntas.

Ao tio Jaime, Denise, Péricles e Janice, por terem me acolhido em Curitiba. A recepção de vocês foi essencial para minha adaptação. Muito obrigada por tudo!

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Reis Azevedo Alanis, pela disponibilidade em ajudar, paciência, preocupação, amizade... Enfim, sou muito

grata por TUDO que fez por mim. Espero ter correspondido a sua confiança neste tempo em que trabalhamos juntas.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Ângela Naval Machado, que mesmo com muitas ocupações, sempre se mostrou disposta em ajudar e participar ativamente do desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann pelo conhecimento transmitido, incentivo e por ter sido essencial para a conquista do meu próximo passo. Muito Obrigada!

A minha querida tia Sonia, por seu exemplo como professora, por me encorajar a seguir a carreira acadêmica e, principalmente pelo seu carinho e atenção.

À amiga de todas as horas, Rafaela Rozza, por compartilhar comigo os melhores e piores momentos durante esses dois anos. Sem ela, tudo seria mais difícil.

À amiga Vanessa, pela presença constante, apesar da distância, e pelas suas alegres visitas!

Às amigas, Day, Ezi, Ju, Patty, Ilana, Maitê, Ari e Aninha, pela companhia maravilhosa e por tornarem os meus finais de semana mais alegres. Valeu!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Sérgio Roberto Vieira pelo trabalho que realiza como diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Couto e Souza pela dedicação e competência como coordenador da área de concentração – Estomatologia.

À secretaria da Pós-Graduação e à querida Neide Borges pela disponibilidade em ajudar.

Aos professores que se destacaram pela sua postura e capacidade de transmitir conhecimentos e tornaram algumas disciplinas em excelentes momentos de aprendizagem.

Ao professor Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela colaboração na análise estatística.

Ao professor Dr. Antônio Adilson Soares de Lima pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Cassius Torres-Pereira por permitir o atendimento aos pacientes da clínica de Estomatologia da UFPR.

À aluna da graduação Naiara Niesciur pela colaboração na fase de leitura das lâminas.

Aos alunos do mestrado da UFPR pelo auxílio no processamento das lâminas.

Aos funcionários da clínica de odontologia pela disponibilidade em ajudar sempre que precisamos.

Às funcionárias do laboratório de patologia experimental Ana Paula e Marina pelo auxílio durante a avaliação das lâminas.

Aos colegas de mestrado e doutorado pelo conhecimento compartilhado e pela alegria do convívio.

Aos pacientes que participaram e foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS	9
RESUMO/PALAVRAS-CHAVE.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	17
AGRADECIMENTOS.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
2. ARTIGO EM INGLÊS	25
ABSTRACT/KEY WORDS.....	26
INTRODUCTION.....	27
MATERIALS AND METHODS.....	28
RESULTS.....	32
DISCUSSION.....	33
ACKNOWLEDGEMENTS.....	36
REFERENCES.....	37
3. ANEXOS	41
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	42
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
FIGURAS.....	52
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY, ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTOLOGY.....	57

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

**ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA E CITOMORFOMÉTRICA DO EPITÉLIO DA
MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM LÍQUEN PLANO**

RESUMO

Objetivo. Avaliar a morfologia e o tamanho das células do epitélio da mucosa bucal de pacientes com líquen plano bucal (LPB).

Materiais e métodos. Os esfregaços foram coletados da mucosa bucal de 20 pacientes com LPB (grupo caso) e 20 pacientes sem LPB (grupo controle), por meio da citologia esfoliativa em base líquida. Após a coloração de Papanicolaou, os esfregaços foram analisados de acordo com o grau de celularidade e a classificação de Papanicolaou. As células epiteliais tiveram as áreas do citoplasma (AC), do núcleo (AN) e a relação AN/AC calculadas.

Resultados. Em ambos os grupos, houve predominância de células nucleadas da camada superficial, pertencentes à classe I de Papanicolaou. Os valores médios da AN ($p > 0,05$) e da AC ($p = 0,000$) foram maiores no grupo caso (AN=521,6; AC=22750,3) comparados ao controle (AN=518,9; AC=18348,0). A relação AN/AC foi de 0,025 para o grupo caso e de 0,031 para o grupo controle ($p = 0,004$).

Conclusão. A mucosa bucal de pacientes com LPB exibiu alterações citomorfométricas significantes. No entanto, não foram encontradas evidências de malignidade.

Palavras chaves: *Mucosa bucal, Líquen plano bucal, Citologia*

INTRODUÇÃO

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica, que está inserida no grupo de doenças auto-imunes mediadas pelas células T.^{1,2} Acomete cerca de 0,5-2,0% da população em geral, no entanto, a real prevalência do líquen plano bucal (LPB) é desconhecida.³ É uma doença da meia-idade, que atinge mais o sexo feminino em uma proporção de 3:1.⁴⁻⁶

Clinicamente, são descritas duas formas de LP que acometem a mucosa bucal com maior frequência: reticular e erosiva, que podem estar isoladas ou associadas.^{6,7} As formas papular, em placa, bolhosa e atrófica são menos frequentes.⁸ Embora as características clínicas possam ser suficientes para o diagnóstico do LPB, torna-se necessária a realização da biopsia para confirmação e, principalmente, exclusão da possibilidade de atipia celular e sinais de malignidade.^{5,9}

Apesar da Organização Mundial da Saúde (OMS) considerar o LPB uma condição com potencial de malignização, essa afirmação é alvo de muita controvérsia.^{10,11} Isso pode ser justificado pelo estudo de Gonzalez-Moles et al. (2008),¹² que, por meio de uma revisão sistemática, encontraram ampla variação nas taxas de transformação maligna (0 a 12,5%) em pacientes com LPB. Alguns autores acreditam que não existem dados suficientes para provar esta associação e que a interferência de fatores externos de risco pode comprometer os resultados dos estudos.^{6,13} No entanto, outros autores afirmam que pacientes com LPB possuem risco aumentado de desenvolver câncer bucal.^{14,15}

Para lesões bucais de natureza epitelial, principalmente as que possuem potencial de malignização, a citologia esfoliativa é um excelente método de estudo.^{16,17} Corresponde à obtenção de células descamadas da mucosa, principalmente suprabasais, que, após passarem pelo processo de coloração, são analisadas seguindo critérios morfológicos e morfométricos.¹⁸⁻²¹

A citologia esfoliativa é considerada um método indolor, inócuo, barato e de simples execução.²² Recentemente, surgiu a citologia em base líquida que apresenta uma série de vantagens em relação a citologia convencional, destacando-se: melhor evidenciação das células epiteliais, lâminas com menor

quantidade de restos celulares e artefatos indesejáveis, menor sobreposição celular e amostra mais representativa para leitura.²³

A coloração de Papanicolaou permite observar diferenças nas células epiteliais devido à afinidade dos corantes pelos constituintes citoplasmáticos.^{19,24} Por meio desta coloração podem ser observadas alterações indicativas de malignidade, tais como: aumento da ceratinização; alteração na área nuclear, na área citoplasmática e na relação área núcleo/citoplasma; presença de hiper cromatismo nuclear; pleomorfismo; agrupamento de cromatina; distribuição irregular da cromatina.^{16,17,25-27}

Diante da suspeita sobre o potencial de transformação maligna do LPB, sugere-se uma monitoração periódica dessas lesões, que em geral não são estáticas e possuem períodos de exacerbação e remissão.^{5,7} Além disso, torna-se necessária a realização de mais estudos que busquem evidências que o LPB pode tornar-se uma lesão maligna. Para tal, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar os esfregaços coletados da mucosa bucal de pacientes com LPB, por meio da citologia esfoliativa em base líquida, de acordo com o grau de celularidade, a classificação de Papanicolaou e as medidas da área nuclear, da área citoplasmática e da relação área do núcleo/citoplasma das células epiteliais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os pacientes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e, após concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Amostra

Um total de 40 mulheres adultas atendidas na clínica de Odontologia da PUCPR e da Universidade Federal do Paraná – UFPR, na cidade de Curitiba,

Paraná, Brasil, participaram da pesquisa. As pacientes foram divididas em dois grupos (caso e controle), pareados por idade.

O grupo caso constituiu de 20 mulheres que possuíam LPB, com confirmação histológica, e ausência de qualquer outro tipo de lesão na mucosa bucal. Os seguintes critérios de diagnóstico foram estabelecidos para o LPB: 1) clínico – lesões esbranquiçadas, em forma de estrias (reticular) ou placa, associadas ou não a áreas de erosão; localizadas em mais de uma região da mucosa bucal; com períodos de remissão e exacerbação; sem histórico de medicamentos que provocassem a exacerbação; e ausência de restaurações de amálgama na área da lesão, para excluir a possibilidade de reação liquenóide e 2) histológico – cristas epiteliais pontiagudas, em forma de “dente de serra”; degeneração da camada basal do epitélio; presença de corpos de Civatte (ceratinócitos em degeneração) e de um intenso infiltrado inflamatório subepitelial em banda, predominante de linfócitos T.^{3,7}

O grupo controle foi constituído por 20 pacientes com ausência de qualquer alteração na mucosa bucal. Critérios de exclusão de ambos os grupos envolveram: pacientes tabagistas, etilistas, usuárias de enxaguatórios bucais com álcool, aparelhos ortodônticos e de drogas ilícitas.

Coleta das células

Inicialmente, as pacientes foram orientadas a realizar um enxágue bucal com água para remover possíveis restos celulares e bactérias aderentes à mucosa. A coleta das células foi realizada por meio da técnica de citologia em base líquida, com a escova do *kit* do sistema DNA-CITOLIQ[®] (Digene, São Paulo/SP, Brasil), aplicada de forma suave e em movimentos giratórios na mucosa bucal da paciente. Nas pacientes do grupo caso, as áreas de escolha da coleta foram as reticulares ou em placa, sendo evitadas as áreas erosivas. Após a coleta das células, a escova foi mergulhada no interior do frasco contendo o UCM (*Universal Collection Medium*), permanecendo imersa neste líquido com o frasco tampado sob refrigeração (2 a 8° C) até o momento do processamento laboratorial.^{21,23,28}

Processamento Laboratorial

Inicialmente os conteúdos dos frascos foram homogeneizados por 30 segundos com o auxílio do vortex (modelo AP 56, Phoenix, EUA). Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi depositada sob os filtros – *Filtrogene* (Digene). Para que houvesse a transferência do material dos filtros para as lâminas de vidro – *Lamigene* (Digene), a prensa metálica – *Prepgene* (Digene) foi fechada por 10 segundos. O esfregaço foi fixado em solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos e, em seguida, procedeu-se a coloração de Papanicolaou para análise citomorfológica e citomorfométrica.^{20,21,28}

Análise dos esfregaços

As lâminas foram analisadas por meio da microscopia de luz, utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX40 adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65 (Olympus, Japão), com aumento original de 400X.

Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. O examinador foi previamente calibrado quanto ao reconhecimento da presença ou ausência das alterações celulares, bem como em relação ao critério de maturação e quantificação das células epiteliais.

Análise Citomorfológica

Os esfregaços foram classificados de acordo com Papanicolaou em cinco classes que incluíam desde esfregaços normais sem alterações inflamatórias (classe I), com alterações inflamatórias em dois ou mais campos histológicos (classe II), esfregaços com alterações displásicas em até dois campos (classe III), esfregaços fortemente indicativos de malignidade com alterações displásicas em mais de dois campos (classe IV) ou esfregaços com alterações compatíveis com neoplasia maligna (classe V).^{20,28}

Em relação ao grau de maturação, os esfregaços foram analisados de acordo com o predomínio do tipo celular: superficial anucleada, superficial nucleada, intermediária e basal.¹⁹ As células basais do epitélio apresentam-se

esféricas ou ovóides, com citoplasma corado azul, enquanto que o núcleo mostra-se arredondado, centralizado e basófilo (azul). As células epiteliais intermediárias são ligeiramente alongadas ou quadriláteras, podendo exibir algum grau de contração nuclear, apresentando-se numa coloração vermelho-azulada. Nas células pertencentes à camada superficial, nucleadas ou anucleadas, o citoplasma mostra-se acidófilo, corado em vermelho, amarelo, laranja ou marrom.^{19,25}

Análise Citomorfométrica

As imagens de cinquenta células nucleadas de cada lâmina foram capturadas, sem discriminação em relação ao grau de maturação, por meio do *Software Dino capture* pertencente à câmera *Dino-Eye Eyepiece* (modelo AM-423X, Taiwan). A captura foi realizada sequencialmente, a fim de evitar a captura de uma mesma célula mais de uma vez. Somente as células que se encontravam estiradas e bem delimitadas foram analisadas.

As áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) foram obtidas pela delimitação do núcleo e do citoplasma da célula, respectivamente. Foi utilizado o cursor digitador na ferramenta polígono, no modo medida, do sistema de análise de imagens *Image-Pro Plus*, versão 4.5.029 for *Windows 98/NR/2000*.^{19,21} Após a obtenção dessas medidas foi calculada a relação área do núcleo/citoplasma (AN/AC) das células epiteliais de cada amostra.^{19,21} A partir das medidas das cinquenta células capturadas foi calculada uma média.

Análise estatística

Os valores obtidos para cada variável foram registrados e tabulados em planilhas no *software* estatístico SPSS versão 15,0 para *Windows* (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para a variável classificação de Papanicolaou, aplicou-se o teste não-paramétrico U de *Mann-Whitney*, a fim de verificar se houve diferença estatisticamente significativa no escore médio entre os dois grupos. Os testes do *Qui-quadrado* e exato de *Fisher* foram aplicados para a variável critérios de maturação. Para a comparação das variáveis citomorfométricas (AN, AC e AN/AC) entre os dois grupos, testou-se a distribuição normal dos

dados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a homogeneidade de variâncias pelo teste de *Levene*, seguido do teste *t* para amostras independentes. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi 5%.

RESULTADOS

A média de idade das mulheres de ambos os grupos foi 52,6 anos, variando de 31 a 79 anos. No grupo caso, 17 (85%) lesões de LPB eram do tipo reticular-erosivo, 2 (10%) do tipo reticular e 1 (5%) do tipo placa-erosivo. O tempo médio de diagnóstico do LPB foi de 5 anos, variando de 1 a 10 anos. No grupo caso, 95% das coletas foram realizadas em mucosa jugal e apenas uma (5%) em margem de língua. Já no grupo controle, 100% das coletas foram feitas em mucosa jugal.

Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para análise citomorfológica entre os grupos (tabelas 1 e 2). As tabelas 1 e 2 mostram a caracterização do esfregaço segundo a classificação de Papanicolaou e o grau de celularidade nos grupos estudados, respectivamente.

Tabela 1 – Caracterização do esfregaço segundo a classificação de Papanicolaou.

Classificação	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)
Classe I	12 (60)	13 (65)
Classe II	8 (40)	7 (35)
Total	20 (100)	20 (100)

Valor de $p=0,747$ (teste U de *Mann-Whitney*)

Tabela 2 – Caracterização dos esfregaços segundo a celularidade predominante de acordo com os grupos.

Grupo	Células superficiais anucleadas	Células superficiais nucleadas	Células da camada intermediária	Células da camada basal	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Caso	0 (0)	20 (100)	0 (0)	0 (0)	20
Controle	0 (0)	18 (90)	2 (10)	0 (0)	20

Valor de $p=0,468$ (*Pearson Qui-Quadrado*); Valor de $p=0,487$ (teste exato de *Fisher*)

Os valores médios de AN, AC e relação AN/AC estão dispostos na tabela 3. Houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos, para as variáveis AC e relação AN/AC.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das variáveis AN, AC e AN/AC em função do grupo.

	Caso	Controle	Valor de p
Variáveis	Média \pm DP	Média \pm DP	
AN (μm^2)	521,6 \pm 63,1	518,9 \pm 59,1	0,892
AC (μm^2)	22750,3 \pm 3369,6	18348,0 \pm 2388,4	0,000*
AN/AC	0,025 \pm 0,006	0,031 \pm 0,006	0,004*

DP – Desvio Padrão

*Valor de $p<0,05$ indica diferença estatística significativa

DISCUSSÃO

O LPB é uma condição imunologicamente mediada, na qual os linfócitos T CD8+ são os responsáveis pela apoptose que ocorre nas células do epitélio, evento este, de fundamental importância na sua apresentação clínica.²⁹

A forma reticular, associada ou não a forma erosiva, é a manifestação clínica mais comum, apresentando-se como estrias esbranquiçadas, simétricas e bilaterais, normalmente associadas a áreas de erosão ou ulceração.^{3,30} No presente estudo, 85% dos casos estudados eram do tipo reticular-erosivo.

Em geral, as lesões bucais aparecem antes das lesões cutâneas e muitas vezes o sítio bucal é o único acometido.^{7,31} O presente estudo mostrou que, assim como os resultados de Fernández-González et al. (2010),³⁰ a região intrabucal mais afetada foi a mucosa jugal, embora língua, gengiva, e palato também possam ser envolvidos.³

A doença afeta principalmente mulheres, numa proporção de 3:1, e manifesta-se mais frequentemente na 5ª década de vida. No presente estudo, a média de idade coincidiu com trabalhos anteriores.^{6,30} Apenas mulheres foram incluídas neste estudo, pois, após um levantamento epidemiológico do número de pacientes com diagnóstico de LPB nas duas clínicas participantes, observou-se maior prevalência de mulheres. Além disso, alguns critérios de exclusão foram aplicados, tais como: ser tabagista, etilista e usuária de drogas ilícitas, pois comprovadamente promovem alterações na morfologia das células epiteliais.^{21,27,32} A não exclusão desses hábitos poderia interferir nos resultados da pesquisa. Os indivíduos dos grupos caso e controle foram pareados por idade, na tentativa de eliminar eventuais alterações epiteliais relacionadas ao envelhecimento.³³

No presente estudo, não foram encontradas evidências de malignização em esfregaços de lesões de LPB, o que concorda com os resultados de Sugerman et al. (1996).³⁴ Houve predomínio de esfregaços pertencentes à classe I de Papanicolaou. A classe II foi a segunda mais representativa, entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$, tabela 1). Isso já era esperado, visto que as células inflamatórias presentes no LPB estão dispostas em banda subepitelial,^{7,9,35} e a citologia esfoliativa consiste numa técnica de obtenção de células da camada mais superficial do epitélio.^{16,17}

Quanto aos critérios de maturação, 100% dos esfregaços do grupo caso tiveram predominância de células nucleadas da camada mais superficial, enquanto no grupo controle houve predominância de células intermediárias em 10% dos casos (tabela 2). Isso pode ser justificado pelo fato do LPB reticular,

que correspondeu a 95% da amostra, apresentar a hiperqueratinização como característica histopatológica.³⁰ Por outro lado, os esfregaços do grupo controle foram coletados da mucosa jugal, que é não-queratinizada. Isto levaria a uma maior possibilidade de coleta de células superficiais em tecidos queratinizados.

No presente estudo, a análise citomorfométrica mostrou aumento na AC e diminuição na relação AN/AC para o grupo caso comparado ao controle (tabela 3). No estudo realizado por Sugerman et al. (1996),³⁴ foram encontradas médias significativamente maiores de AC e AN em pacientes com LP reticular e papular, entretanto não se estabeleceu diferença estatística significativa na relação entre as variáveis AN/AC. Esses resultados podem ser reflexo da estratificação epitelial, que tende a aumentar o tamanho das células à medida que elas ficam mais superficiais.^{19,26,34}

Outra justificativa para o aumento na AC é o fato do tecido alterado pela lesão de LP reticular sofrer hiperplasia, um evento que é precedido pela hipertrofia celular.³⁶ O aumento do número de células nas lesões de LP foi demonstrado por meio de estudos histológicos corados pela hematoxilina-eosina e imuno-histoquímicos, que analisaram a marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).^{30,37}

Uma das potenciais complicações do LPB é a possibilidade de transformação maligna desta lesão. Desde 1910, quando o primeiro caso de carcinoma de células escamosas em um paciente com LPB foi reportado, vários estudos têm procurado estabelecer uma relação entre o LPB e o seu potencial de transformação maligna, sendo que esta taxa varia de 0-12,5%.^{6,12}

As formas erosiva e em placa têm sido consideradas as mais prováveis de transformação maligna, embora a evidência para tal hipótese seja fraca.⁶ Em relação a localização, a língua aparece como o sítio preferencial de transformação maligna,^{6,38} embora Rajentheran et al. (1999)³⁹ tenham encontrado a mucosa jugal como principal localização afetada. No presente estudo a forma mais prevalente foi a reticular-erosiva, localizada em mucosa jugal. O risco de potencial de malignização é aumentado entre mulheres na sexta e sétima décadas de vida.⁴⁰ O tempo de transformação maligna varia entre 20,8 meses e 10,1 anos.^{38,41} Entretanto, Silverman (2000)⁴² considera que o tempo de duração do LPB não é um fator de risco para transformação maligna. Na amostra estudada, a média de idade foi 52,6 anos e o tempo

médio de diagnóstico foi 5 anos. Diante destas variáveis, autores recomendam exaustivo acompanhamento clínico desta lesão para estabelecer um diagnóstico precoce de transformação maligna.^{43,44}

Avaliações quantitativas, por meio da mensuração da AN, AC e relação AN/AC, podem aumentar a sensibilidade da citologia esfoliativa para o diagnóstico precoce de câncer bucal.³² Cowpe et al. (1985³³ e 1988¹⁶) observaram que os tecidos caracterizados com potencial de transformação maligna normalmente mostram redução na AC e aumento na AN. Ramaesh et al. (1998),¹⁷ ao avaliarem a mucosa bucal em condições normais, em lesões displásicas e em carcinoma de células escamosas, por meio da avaliação citomorfométrica do diâmetro do núcleo (DN) e do diâmetro do citoplasma (DC), encontraram DC menores e DN maiores no epitélio bucal com displasia e carcinoma. Esses estudos sugerem que o tamanho do núcleo aumentado e do citoplasma diminuído são indicadores precoces de transformação maligna.

Embora nosso estudo seja preliminar e a amostra seja pequena, os resultados não revelaram alterações compatíveis com malignização nos esfregaços de lesões bucais de líquen plano. No entanto, houve aumento da área do citoplasma e diminuição na relação núcleo/citoplasma, o que provavelmente seja decorrente da própria estratificação epitelial e hiperplasia que ocorrem nos líquen planos reticulares. Outros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações da mucosa bucal de pacientes com LPB.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, em especial à Ana Paula Camargo Martins e Marina Viola Azevedo, e aos professores do Departamento de Estomatologia da UFPR.

REFERÊNCIAS

1. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46:15-21.
2. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. *J Oral Pathol Med* 2010;39:729-34.
3. Schlosser BJ. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther* 2010;23:251-67.
4. Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:287-306.
5. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:207-14.
6. Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez N. Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol* 2009;45:54-6.
7. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, editors. *Oral and maxillofacial pathology*. St Louis: Saunders publisher: 2009; 972p.
8. Markopoulos AK, Antoniadis D, Papanayotou P, Trigonidis G. Malignant potential of oral lichen planus; a follow-up study of 326 patients. *Oral Oncol* 1997;33:263-9.
9. Sousa FACG, Rosa LEB. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008;74:284-92.
10. Cortés-Ramírez DA, Gainza-Cirauqui ML, Echebarria-Goikouria MA, Aguirre-Urizar JM. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: The controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:E118-22.
11. Ben Slama L. Potentially malignant disorders of the oral mucosa: terminology and classification. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2010;111:208-12.

12. Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis* 2008;14:229-43.
13. Laeijendecker R, Joost TV, Kuizinga MC, Tank B, Neumann HAM. Premalignant Nature of Oral Lichen Planus. *Acta Derm Venereol* 2005;85:516-20.
14. Ingafou M, Leao JC, Porter SR, Scully C. Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis* 2006;12:463-8.
15. Liu Y, Messad DV, Wuc H, Hua S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer. *Med Hypoth* 2010;75:492-4.
16. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81:509-13.
17. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
18. Macluskey M, Ogden GR. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 2. Markers of value in tumour diagnosis. *Dent Update, Guildford* 2000;27:148-52.
19. Alberti S, Spadella CT, Francischone TRCG, Assis GF, Cestari TM, Taveira LAA. Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 2003;32:538-43.
20. Lima AAS, Woyceichoski IEC, Batista AB, Grégio AMT, Ignácio SA, Machado MAN, et al. Cytopathological changes in oral epithelium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline* 2007;1:31-40.
21. Woyceichoski IE, Arruda EP, Resende LG, Machado MA, Grégio AM, Azevedo LR, Lima AA. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:745-9.
22. Birman EG, Sugaya NN. Citologia no diagnóstico do câncer bucal. In: Kowalski LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. *Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal*. Hospital do Câncer e Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas. São Paulo: Frôntis Editorial; 1999. p.107-11.

23. Digene do Brasil. Sistema DNA-CITOLIQ[®], a citologia em nova era. Manual Técnico de Treinamento. São Paulo: Digene: 2002; 37p.
24. Williams DW, Walker R, Lewis MAO, Allison RT, Potts AJC. Adherence of *Candida albicans* to oral epithelial cells differentiated by Papanicolaou staining. *J Clin Pathol* 1999;52:529-31.
25. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aus Dent J* 1996;41:71-4.
26. McKee GT, editors. *Cytopathology*. Barcelona: Printed by Grafos: 1997; 374p.
27. Hande AH, Chaudhary MS. Cytomorphometric analysis of buccal mucosa of tobacco chewers. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:527-32.
28. Wandeur T, de Moura SA, de Medeiros AM, Machado MA, de Azevedo Alanis LR, Grégio AM, et al. Exfoliative cytology of the oral mucosa in burning mouth syndrome: a cytomorphological and cytomorphometric analysis. *Gerodontol* 2009; doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00319.x.
29. Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:358-66.
30. Fernández-González F, Vázquez-Álvarez R, Reboiras-López D, Gándara-Vila P, García-García A, Gándara-Rey JM. Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010 Aug 15 [Epub ahead of print].
31. Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968;25:31-42.
32. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.
33. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J Roy Soc Med* 1985;78:995-1004.
34. Sugerman PB, Savage NW, Williams SL, Joynson OB, Daley TJ, Cowpe JG. A quantitative cytological study of lesional and non-lesional mucosa in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 1996;41:117-20.
35. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, editors. *Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations*. St Louis: Saunders publisher: 2008; 417p.

36. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS, editors. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Saunders Company: 2004; 1552p.
37. Fonseca LMS, do Carmo MAV. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis* 2001;7:344-8.
38. Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral* 2003;8:2-9.
39. Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:520-3.
40. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* 2004;40:77-83.
41. Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol* 1998;17:219-25.
42. Silverman Jr S. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:1286-8.
43. Mignogna MD, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Califano L, Lo Muzio L. Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:838-43.
44. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol* 2007;43:742-8.

2. ARTIGO EM INGLÊS

**CYTOMORPHOLOGIC AND CYTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE
ORAL MUCOSA IN PATIENTS WITH ORAL LICHEN PLANUS**

ABSTRACT

Objective. To evaluate the morphology and the size of oral epithelial cells in patients with oral lichen planus (OLP).

Study design. Oral smears were collected from mucosa by liquid-based exfoliative cytology of 20 subjects with OLP (case group) and 20 without OLP (control group). After Papanicolaou staining, smears were analysed according to the cellularity degree and Papanicolaou classification. Cytoplasmic area (CA), nuclear area (NA) and nucleus-to-cytoplasm area ratio (NA/CA) of epithelial cells were calculated.

Results. In both case and control groups there was a predominance of nucleated cells of superficial layer, Papanicolaou's class I. Mean values of NA ($p>0.05$) and CA ($p=0.000$) were higher in case group (NA=521.6; CA=22750.3) compared with control group (NA=518.9; CA=18348.0). The NA/CA for the case group was 0.025 and for control group it was 0.031 ($p=0.004$).

Conclusion. Oral mucosa of OLP patients exhibited significant cytomorphometric changes in the oral epithelial cells. Therefore, there was no evidence of malignancy.

Key Words: *Oral mucosa, Oral lichen planus, Cytology*

INTRODUCTION

Lichen planus (LP) is an inflammatory chronic mucocutaneous disease, which is inserted in the group of auto-immune diseases, mediated by T cells.^{1,2} It affects about 0.5-2.0% of the population, however, the real prevalence of oral lichen planus (OLP) is unknown.³ It is a middle-age disease that mainly affects the female sex, in a ratio of 3:1.⁴⁻⁶

Clinically, two forms of LP are described that affect the oral mucosa more frequently: reticular and erosive, which can be isolated or related.^{6,7} Papules, plaques, bullous and atrophic forms are less frequent.⁸ Although the clinical characteristics can be enough for the OLP diagnosis, the biopsy is necessary for confirmation and, mainly, to exclude the possibility of cellular atypia and signs of malignancy.^{5,9}

Despite the fact that the World Health Organization (WHO) considers the OLP a condition with malignant potential, this affirmation is controversial.^{10,11} This can be justified by the study by Gonzalez-Moles et al. (2008),¹² that, through a systematic revision, found broad variation in the malignant transformation rates (0-12.5%) in patients with OLP. Many authors believe that do not exist enough data to prove this association and that the interference of external risk factors may compromise the results of the studies.^{6,13} However, other authors state that OLP patients possess an increased risk to develop oral cancer.^{14,15}

For oral injuries of epithelial nature, mainly the ones that possess malignant potential, the exfoliative cytology is excellent as a mean of study.^{16,17} It corresponds to the attainment of scaled off cells of the mucosa, mainly suprabasal, which, after passing through the coloration process, are analyzed according to morphologic and morphometric criteria.¹⁸⁻²¹

The exfoliative cytology is considered a painless method, innocuous, cheap and of simple execution.²² The liquid-based cytology presents a series of advantages compared with the conventional cytology, such as: better evidence of the epithelial cells, slide with fewer amounts of cellular debris and undesirable artifacts, lesser cellular overlapping and a more representative smears for reading.²³

The Papanicolaou staining allows observing differences in the epithelial cells due to the affinity of the pigments for the cytoplasmic constituent.^{19,24} Through this coloration, indicative alterations of malignancy can be observed, such as: increase of the keratinization; alteration in the nuclear area, cytoplasmic area and nucleus-to-cytoplasm area ratio; presence of nuclear hyperchromatism; pleomorfism; chromatin grouping; irregular distribution of the chromatin.^{16,17,25-27}

Facing the suspicion on the malignant transformation potential of the OLP, periodic monitoring of these injuries is suggested, which generally are not static and present periods of exacerbation and remission.^{5,7} Moreover, it is necessary to carry out more studies that seek evidence that OLP could become a malignant lesion. For such, the present study aimed to evaluate the smears collected from oral mucosa in patients with OLP, by liquid-based exfoliative cytology, according to the cellularity degree, Papanicolaou classification and measures of nuclear area, cytoplasmic area and the nucleus-to-cytoplasm area ratio of epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol of the present study was approved by the Committee of Ethics in Research at Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil. The patients were informed about the objective and the other aspects of the study and signed a Term of Independent Informed Consent.

Subjects

Forty adult women, patients at the Dental Clinic at Pontifical Catholic University of Paraná and Federal University of Paraná (Curitiba/PR, Brazil), participated in this study. The patients were divided in two groups (case and control), paired by age.

The case group consisted of 20 women who had OLP, with histological confirmation, and absence of any other type of injury in the oral mucosa.

Diagnostic criteria for OLP were established: 1) Clinical – white lesions with lacy (reticular) or plaque forms with or without erosions associated, with periods of remission and exacerbation, with no history of medications that could cause exacerbation, and the absence of amalgam restorations in the area of the lesion, to exclude the possibility of lichenoid reactions, and 2) Histological – the presence of serrated ridges at the epithelial level, hydropic degeneration of the basal layer, degeneration of the keratinocytes (Civatte bodies) and a severe band-like subepithelial inflammatory infiltrate, with predominance of T lymphocytes.^{3,7}

The control group consisted of 20 patients with absence of any alteration in the oral mucosa. Criteria of exclusion of both groups involved: smokers, ethilists, and users of mouth washers with alcohol, orthodontic retainers and illicit drugs.

Cells collection

Initially, the patients were told to perform a mouth washing with water to remove possible debris and bacteria adherent to the mucosa. The collection of the cells was done through the liquid-based cytology, with the brush of the kit of the DNA-Citoliq[®] System (Digene, São Paulo/SP, Brazil), applied softly and in spinning movements in the patient's oral mucosa. In the case group, the areas of choice were the reticular or plaque ones, and erosive areas were avoided. After this collection, the brush was dipped inside bottle containing the UCM (Universal Collection Medium), being kept immersed in this liquid with the bottle covered under refrigeration (2 to 8°C) until the moment of the laboratory processing.^{21,23,28}

Laboratory Processing

Initially the contents of the bottle were homogenized for 30 seconds with the aid of a vortex (model AP 56, Phoenix, U.S.A.). An aliquot of 200 µL of each sample was deposited under the filters - Filtrogene (Digene). The metal press - Prepgene (Digene) was closed for 10 seconds for the transference of the material from the filters to glass slides - Lamigene (Digene). The smears were

fixed in an absolute ethilical alcohol solution for 20 minutes and later the Papanicolaou staining was done for cytomorphologic and cytomorphometric analysis.^{20,21,28}

Smears Analysis

Each slide was assessed using light microscopy by binocular Olympus BX40 microscopy adapted with ocular WH 10x-H/22 and PLAN 40X/0.65 objective (Olympus, Japan), with original magnification at X400.

Previously to the reading, the slides had their identification numbers covered to prevent bias. The examiner was previously calibrated to the recognition of the presence or absence of cellular alterations, as well as in relation to the criterion of maturation and quantification of the epithelial cells.

Cytomorphologic analysis

The smears were classified according to Papanicolaou in five classes which included normal smears without inflammatory alterations (class I), with inflammatory alterations in two histological fields or more (class II), smears with displasic alterations in two histological fields (class III), strong indicative smears of malignancy with displasic alterations in more than two histological fields (class IV) or smears with compatible alterations with malignant neoplasia (class V).^{20,28}

The smears were analyzed according to the maturation, observing the predominance of the cellular type: superficial anucleated, superficial nucleated, intermediate and basal.¹⁹ The basal cells of the epithelium are presented spherical or ovoid, with blue colored cytoplasm, while the nucleus is showed round-shaped, centered and basophile (blue). The intermediate epithelial cells are slightly prolonged or quadrilateral, being able to show some degree of nuclear contraction, presenting themselves in a red-bluish coloration. In the cells belonging to the superficial layer, nucleated or anucleated, the cytoplasm reveals acidophile, colored in red, yellow, orange or brown.^{19,25}

Cytomorphometric analysis

Fifty nucleated cells images of each slide were captured, without discrimination regarding the maturation criterion, through the Dino capture Software that belongs to the Dino-Eye Eyepiece camera (Am-423x model, Taiwan). The capture was sequentially carried through, in order to avoid the capture of the same cell more than once. Only the cells found well stretched and delimited were analyzed.

The nuclear areas (NA) and cytoplasmic areas (CA) were gotten by the delimitation of the nucleus and the cytoplasm of the cell, respectively. The digitizer cursor in the tool polygon was used, in the measure mode, from the analysis image system Image-Pro Plus, version 4.5.029 for Windows 98/NR/2000.^{19,21} After the attainment of these measures, the nucleus-to-cytoplasm area ratio (NA/CA) of the epithelial cells of each sample was calculated.^{19,21} From the measures of the fifty captured cells, an average was calculated.

Statistical Analysis

The values of each variable were registered and tabulated in charts in the statistical software SPSS version 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.). For the Papanicolaou classification variable, it was applied the non-parametric test U Mann-Whitney, in order to verify if there was a statistically significant difference in the average score between the two groups. The Chi-squared and Fisher Exact tests were applied for the maturation criteria variable. For the comparison of the cytomorphometric variables (NA, CA and NA/CA), between the two groups, it was tested the normal data distribution by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances by the Levene test, followed by the t-test for independent samples. The level of significance for all the statistical tests was set at 5%.

RESULTS

The average age of both groups was 52.6 years, varying from 31 to 79 years. In the case group, 17 (85%) lesions of OLP were of the reticular-erosive type, 2 (10%) of reticular type and 1 (5%) of the plate-erosive type. The average time of diagnosis of the OLP was 5 years, varying from 1 to 10 years. For the case group, 95% of the collections were carried through in buccal mucosa and only one (5%) in the border of the tongue. For the control group, 100% of the collection was in the buccal mucosa.

There was no significant difference ($p>0.05$) for the cytomorphologic analysis between the groups (Tables 1 and 2). Tables 1 and 2 show the characterization of smears according to the Papanicolaou classification, and the cellularity degree in the studied groups, respectively.

Table 1 – Characterization of smears according to the Papanicolaou classification.

Classification	Case group n (%)	Control group n (%)
Class I	12 (60)	13 (65)
Class II	8 (40)	7 (35)
Total	20 (100)	20 (100)

$p=0.747$ (U Mann-Whitney test)

Table 2 – Characterization of smears according to the type of predominant cell.

Group	Enucleated superficial cells	Nucleated superficial cells	Intermediated cells	Basal cells	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Case	0 (0)	20 (100)	0 (0)	0 (0)	20
Control	0 (0)	18 (90)	2 (10)	0 (0)	20

$p=0.468$ (Chi-square test); $p= 0.487$ (Fisher Exact test)

The average values of NA, CA and relation NA/CA are shown in Table 3. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the groups, for the variable CA and relation NA/CA.

Table 3 – Average of NA, CA and NA/CA values for OLP and healthy patients.

	Case group	Control group	P value
Variable	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
NA (μm^2)	521.6 \pm 63.1	518.9 \pm 59.1	0.892
CA (μm^2)	22750.3 \pm 3369.6	18348.0 \pm 2388.4	0.000*
NA/CA	0.025 \pm 0.006	0.031 \pm 0.006	0.004*

SD – standard deviation

*Statistical difference ($p < 0.05$).

DISCUSSION

OLP is an immunologically mediated condition, in which T CD8+ lymphocytes are the responsible for the apoptosis that occurs in epithelial cells. This apoptosis is of fundamental importance in the clinical presentation of OLP.²⁹

The reticular form, associate or not to the erosive form, is the most common clinical manifestation, presenting itself as whitened stretch marks, symmetrical and bilateral, generally associated with the erosion areas or ulceration.^{3,30} In this study, 85% of cases were of the reticular-erosive type.

In general, the oral lesions appear before the cutaneous lesions and in many cases the oral site is the only one affected.^{7,31} The present study showed that, as well as the results of Fernández-González et al. (2010),³⁰ the most affected intraoral area was the buccal mucosa, although tongue, gum, and palate can also be affected.³

The disease affects mainly women, in a ratio of 3:1 and is more frequent in the fifth decade of life. In the present study, the average age of the sample was similar to previous investigations.^{6,30} Only women were included in this

study, as after an epidemiologist survey of the number of patients with OLP diagnosis in the two participant clinics, it was noticed a higher prevalence of women. Moreover, some criteria of exclusion were applied, such as: being a smoker, ethilist and user of illicit drugs, because they undisputedly promote alterations in the morphology of the epithelial cells.^{21,27,32} The non exclusion of these habits could intervene in the results of the research. The subjects of the case and control groups were paired by age, in the attempt to eliminate eventual age-related epithelial alterations.³³

In the present study, malignant evidences in smears of OLP lesions were not found, which corroborates the findings of Sugerman et al. (1996).³⁴ There was a predominance of smears of Papanicolaou class I. Class II was the second most representative one, however, there was not a significant difference between the groups ($p>0.05$, Table 1). This was already expected, because the inflammatory cells present in the OLP are disposed in band-like subepithelial,^{7,9,35} and exfoliative cytology is a technique for obtaining cells from the most superficial layer of the epithelium.^{16,17}

Referring to the maturation criteria, 100% of the smears of the case group had predominance of nucleated cells of the most superficial layer, while in the control group intermediate cells were predominant in 10% of the cases (Table 2). This can be justified by the fact that reticular OLP, which corresponded to 95% of the sample, presents the hyperkeratinization as a histopathological characteristic.³⁰ Conversely, the smears of the control group were collected from the buccal mucosa, which is a non-keratinized epithelium. This would lead to a larger possibility of collection of superficial cells in keratinized tissues compared with non-keratinized ones.

In the present study, the cytomorphometric analysis showed an increase in the CA and a reduction in the NA/CA ratio for the case group compared with the control group (table 3). Sugerman et al. (1996)³⁴ found significantly higher averages of the CA and NA values of patients with reticular and papular LP, however it was not established significant difference in the NA/CA ratio. These results can be a reflex of the epithelial stratification, which tends to increase the size of the cells as they become more superficial.^{19,26,34}

Another justification for the increase in the CA is the fact that the tissue modified by the reticular LP injury suffers hyperplasia, an event that is preceded

by the cellular hypertrophy.³⁶ The increase of the cell number in LP injuries was demonstrated through histological studies stained by the hematoxylin-eosine and immuno-histochemical studies, that analyzed the behavior of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).^{30,37}

One of the potential complications of the OLP is the possibility of malignant transformation of this injury. Since 1910, when the first case of squamous cells carcinoma in a patient with OLP was reported, several studies have been trying to establish this relation between the OLP and its potential of malignant transformation, and this rate varies from 0-12.5%.^{6,12}

The erosive and plaque forms have been considered the most probable of malignant transformation, even so the evidences for such hypothesis are weak.⁶ Referring to the localization, the tongue seems to be the preferential site of malignant transformation,^{6,38} although Rajentheran et al. (1999)³⁹ found the buccal mucosa as the main affected localization. In the present study the most prevalent form was the reticular-erosive one, located in the buccal mucosa. The risk of malignant potential is increased among women in the sixth and seventh decades of life.⁴⁰ The time of malignant transformation varies from 20.8 months to 10.1 years.^{38,41} However Silverman (2000)⁴² considers the time of OLP duration is not a risk factor for malignant transformation. In the studied sample, the average age was 52.6 years and the average time for diagnosis was 5 years. Due to these variations, authors recommend exhausting clinical accompaniment of this injury to establish an early diagnosis of malignant transformation.^{43,44}

The evaluation of parameters such as NA, CA and NA/CA ratio may increase the sensitivity of exfoliative cytology for early diagnosis of oral cancers.³² Cowpe et al. (1985³³ e 1988¹⁶) found that tissues undergoing malignant transformation typically show a reduction in CA and an increase in NA. Ramaesh et al. (1998)¹⁷ used cytomorphometric techniques to assess nuclear diameter (ND) and cytoplasmic diameter (CD) in normal oral mucosa, in dysplastic lesions, and in squamous cell carcinomas. They found lower values of CD and higher values of ND in the oral epithelium of dysplastic lesions and squamous cells carcinomas compared with normal mucosa. These studies suggest that increased nucleus size and reduced cytoplasm size are useful early indicators of malignant transformation.

Although our study is preliminary and the sample is small, the results did not disclose compatible alterations with malignancy in the smears of OLP. However, there was an increase in the CA and a reduction in the NA/CA ratio, which is probably due to the epithelial and hyperplasia stratification that occur in the reticular LP. Other studies are necessary to clarify the involved mechanisms in the alterations of the oral mucosa of patients with OLP.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors are thankful to the employees of the Experimental Pathology Laboratory of PUCPR, in special to Ana Paula Camargo Martins and Marina Viola Azevedo, and to the professors of the UFPR Department of Stomatology.

REFERENCES

1. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46:15-21.
2. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. *J Oral Pathol Med* 2010;39:729-34.
3. Schlosser BJ. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther* 2010;23:251-67.
4. Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:287-306.
5. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:207-14.
6. Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez N. Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol* 2009;45:54-6.
7. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, editors. *Oral and maxillofacial pathology*. St Louis: Saunders publisher: 2009; 972p.
8. Markopoulos AK, Antoniadis D, Papanayotou P, Trigoniadis G. Malignant potential of oral lichen planus; a follow-up study of 326 patients. *Oral Oncol* 1997;33:263-9.
9. Sousa FACG, Rosa LEB. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008;74:284-92.
10. Cortés-Ramírez DA, Gainza-Cirauqui ML, Echebarria-Goikouria MA, Aguirre-Urizar JM. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: The controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:E118-22.
11. Ben Slama L. Potentially malignant disorders of the oral mucosa: terminology and classification. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2010;111:208-12.

12. Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis* 2008;14:229-43.
13. Laeijendecker R, Joost TV, Kuizinga MC, Tank B, Neumann HAM. Premalignant Nature of Oral Lichen Planus. *Acta Derm Venereol* 2005;85:516-20.
14. Ingafou M, Leao JC, Porter SR, Scully C. Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis* 2006;12:463-8.
15. Liu Y, Messad DV, Wuc H, Hua S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer. *Med Hypoth* 2010;75:492-4.
16. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81:509-13.
17. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
18. Macluskey M, Ogden GR. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 2. Markers of value in tumour diagnosis. *Dent Update, Guildford* 2000;27:148-52.
19. Alberti S, Spadella CT, Francischone TRCG, Assis GF, Cestari TM, Taveira LAA. Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 2003;32:538-43.
20. Lima AAS, Woyceichoski IEC, Batista AB, Grégio AMT, Ignácio SA, Machado MAN, et al. Cytopathological changes in oral epithelium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline* 2007;1:31-40.
21. Woyceichoski IE, Arruda EP, Resende LG, Machado MA, Grégio AM, Azevedo LR, Lima AA. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:745-9.
22. Birman EG, Sugaya NN. Citologia no diagnóstico do câncer bucal. In: Kowalski LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. *Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal*. Hospital do Câncer e Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas. São Paulo: Frôntis Editorial; 1999. p.107-11.

23. Digene do Brasil. Sistema DNA-CITOLIQ[®], a citologia em nova era. Manual Técnico de Treinamento. São Paulo: Digene: 2002; 37p.
24. Williams DW, Walker R, Lewis MAO, Allison RT, Potts AJC. Adherence of *Candida albicans* to oral epithelial cells differentiated by Papanicolaou staining. *J Clin Pathol* 1999;52:529-31.
25. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aus Dent J* 1996;41:71-4.
26. McKee GT, editors. *Cytopathology*. Barcelona: Printed by Grafos: 1997; 374p.
27. Hande AH, Chaudhary MS. Cytomorphometric analysis of buccal mucosa of tobacco chewers. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:527-32.
28. Wandeur T, de Moura SA, de Medeiros AM, Machado MA, de Azevedo Alanis LR, Grégio AM, et al. Exfoliative cytology of the oral mucosa in burning mouth syndrome: a cytomorphological and cytomorphometric analysis. *Gerodontol* 2009; doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00319.x.
29. Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:358-66.
30. Fernández-González F, Vázquez-Álvarez R, Reboiras-López D, Gándara-Vila P, García-García A, Gándara-Rey JM. Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010 Aug 15 [Epub ahead of print].
31. Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968;25:31-42.
32. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.
33. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J Roy Soc Med* 1985;78:995-1004.
34. Sugerman PB, Savage NW, Williams SL, Joynson OB, Daley TJ, Cowpe JG. A quantitative cytological study of lesional and non-lesional mucosa in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 1996;41:117-20.
35. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, editors. *Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations*. St Louis: Saunders publisher: 2008; 417p.

36. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS, editors. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Saunders Company: 2004; 1552p.
37. Fonseca LMS, do Carmo MAV. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis* 2001;7:344-8.
38. Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral* 2003;8:2-9.
39. Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:520-3.
40. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* 2004;40:77-83.
41. Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol* 1998;17:219-25.
42. Silverman Jr S. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:1286-8.
43. Mignogna MD, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Califano L, Lo Muzio L. Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:838-43.
44. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol* 2007;43:742-8.

3. ANEXOS

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003824/10**

Protocolo CEP Nº **5516**

Título do projeto **Análise morfológica, morfométrica e de quantificação de AgNORs das células da mucosa bucal de pacientes com líquen plano**

Grupo **III**

Versão **1**

Protocolo CONEP **0049.0.084.000-10**

Pesquisador responsável **Stefânia Jeronimo Ferreira**

Instituição **PUCPR**

Objetivos

- . Analisar por meio da citologia esfoliativa em base líquida se ocorrem variações morfológicas e morfométricas na área do núcleo e do citoplasma das células da mucosa bucal de pacientes com líquen plano.
- . Analisar se ocorre variação na relação núcleo-citoplasma entre as células epiteliais da mucosa bucal de pacientes com líquen plano.
- . Analisar se há diferenças quantitativas e qualitativas das AgNORs em função da presença de líquen plano.

Comentários e considerações

Projeto apresentado em primeira versão. Está em formato diferente do sugerido pelo CEP. Apresenta cronograma, orçamento (em materiais de consumo e permanentes), referências bibliográficas. Riscos e benefícios aparecem apenas no TCLE (... "benefício da pesquisa para o paciente estará relacionado ao resultado do exame, que mostrará se as lesões de líquen plano tem ou não alterações nas células epiteliais da mucosa bucal após a avaliação em microscópio de luz". Riscos: "Entendo também, que não há risco de sentir dor ou sangramento na realização desta coleta. Algum desconforto poderá ocorrer ao abrir a boca e tracionar a bochecha para manter as cerdas da escova em contato com a mucosa").

A autora afirma que o "trabalho será um estudo experimental do tipo ensaio clínico randomizado e quantitativo segundo a classificação de Freire e Patussi (2001)."

Devem participar da pesquisa 40 mulheres adultas "que serão divididas em dois grupos (caso e controle), pareados por idade".

Critérios de inclusão e exclusão estão apresentados de forma adequada: "O critério de inclusão para o grupo caso será a presença de lesões de líquen plano bucal e a ausência de qualquer outro tipo de lesão. Para o grupo controle, serão incluídos indivíduos com ausência de suspeita de alteração na mucosa e ausência de lesão.

Para ambos os grupos da amostra, não serão incluídos pacientes tabagistas, etilistas, usuários de enxagatatórios bucais, aparelhos ortodônticos e de drogas ilícitas, com a finalidade de eliminar os possíveis efeitos dessas condições sobre a morfologia da célula epitelial".

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

Consta TCLE em linguagem adequada e com os contatos recomendados. No entanto, os dados de identificação do participante estão objetivos demais. Aconselha-se pedir endereço e o CPF.

Recomendações

Incluir no TCLE dados mais completos do participante da pesquisa.

Conclusões

Aprovado.

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: **07/04/2010**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

SUBMISSÃO ONLINE

Você já pode submeter o seu projeto em qualquer versão, via internet.

Acesse: www.pucpr.br/cep



APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer Nº **0003824/10**

Protocolo CEP Nº **5516**

Título do projeto **Análise morfológica, morfométrica e de quantificação de AgNORs das células da mucosa bucal de pacientes com líquen plano**

Grupo **III**

Protocolo CONEP **0049.0.084.000-10**

Pesquisador responsável **Stefânia Jeronimo Ferreira**

Versão **1**

Instituição **PUCPR**

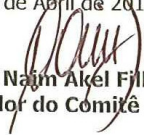
Situação **Aprovado**

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.

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.

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.

Curitiba, 07 de Abril de 2010.


Prof. MSc. Najm Akel Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ R.G. n. _____, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado: “Análise morfológica, morfométrica e de quantificação de AgNORs das células da mucosa bucal de pacientes com líquen plano”, cujo objetivo é analisar por meio da técnica de citologia esfoliativa em base líquida, se existem alterações nas células epiteliais desta lesão.

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso aceite participar desta pesquisa, devo entender que a coleta das células da mucosa bucal que será realizada, será obtida por meio de uma escova pequena com cerdas de nylon, que será aplicada de forma suave e em movimentos giratórios na bochecha. Entendo também, que não há risco de sentir dor ou sangramento na realização desta coleta. Algum desconforto poderá ocorrer ao abrir a boca e tracionar a bochecha para manter as cerdas da escova em contato com a mucosa. O benefício da pesquisa para o paciente estará relacionado ao resultado do exame, que mostrará se as lesões de líquen plano tem ou não alterações nas células epiteliais da mucosa bucal após a avaliação em microscópio de luz.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, nem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são a Profa. Dra. Luciana Reis Azevedo Alanis (041-32712592) e a mestranda Stefânia Jeronimo Ferreira (041-98042680) com quem poderei manter contato se assim o desejar.

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

Estão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Assinatura do Responsável

Assinatura dos pesquisadores

Curitiba, _____ de _____ de 2010.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná CEP/PUCPR. Os pacientes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e, após concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Amostra

Um total de 40 mulheres adultas atendidas na clínica de Odontologia da PUCPR e da Universidade Federal do Paraná – UFPR, na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil, participaram da pesquisa. As pacientes foram divididas em dois grupos (caso e controle), pareados por idade.

O grupo caso constituiu de 20 mulheres que possuíam LPB, com confirmação histológica, e ausência de qualquer outro tipo de lesão na mucosa bucal. Os seguintes critérios de diagnóstico foram estabelecidos para o LPB: 1) clínico – lesões esbranquiçadas, em forma de estrias (reticular) ou placa, associadas ou não a áreas de erosão; localizadas em mais de uma região da mucosa bucal; com períodos de remissão e exacerbação; sem histórico de medicamentos que provocassem a exacerbação; e ausência de restaurações de amálgama na área da lesão, para excluir a possibilidade de reação liquenóide e 2) histológico – cristas epiteliais pontiagudas, em forma de “dente de serra”; degeneração da camada basal do epitélio; presença de corpos de Civatte (ceratinócitos em degeneração) e de um intenso infiltrado inflamatório subepitelial em banda, predominante de linfócitos T.^{3,7}

O grupo controle foi constituído por 20 pacientes com ausência de qualquer alteração na mucosa bucal. Critérios de exclusão de ambos os grupos envolveram: pacientes tabagistas, etilistas, usuárias de enxaguatórios bucais com álcool, aparelhos ortodônticos e de drogas ilícitas.

Coleta das células

Uma vez aceita a participação na pesquisa, foi realizada a coleta de material pela técnica da citologia em base líquida. Para tal, inicialmente os indivíduos foram orientados a realizar um enxágue bucal com água para remover possíveis restos alimentares.

A coleta de células foi realizada com um *kit* do sistema DNA-CITOLIQ[®] (Digene, São Paulo/SP, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (UCM), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015. Este *kit* é composto por um frasco, contendo 1 mL de UCM e uma escova com cabo longo (figura 3).

A coleta das células da mucosa bucal foi obtida por meio da aplicação da escova de forma suave e em movimentos giratórios (figura 4) no sentido horário (cinco voltas). Em seguida, a parte da escova que apresentava as cerdas foi mergulhada no interior do frasco contendo o UCM, permanecendo imersa neste líquido com o frasco tampado até o momento em que as células foram transferidas para a superfície de uma lâmina de vidro, evitando com isso a secagem ao ar e comprometimento da morfologia celular. O frasco tampado foi agitado por um período mínimo de 30 segundos para permitir a mistura do material colhido (células) no meio líquido seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente, a amostra foi armazenada sob refrigeração (2 a 8° C) até o momento do processamento laboratorial.

Processamento laboratorial

Uma cartela contendo 12 lâminas histológicas (*Lamigene*, Digene – figura 5) foi adaptada numa prensa metálica (*Prepgene*, Digene – figura 5) juntamente com um filtro especial contendo uma membrana de policarbonato (*Filtrogene*, Digene – figura 5). As lâminas previamente foram identificadas para evitar possíveis trocas de material. Para a transferência das células contidas no líquido, inicialmente foram colocados os frascos no UCM *rack*. A seguir, os frascos foram homogeneizados por meio da colocação do mesmo sobre um vortex (modelo AP 56, Phoenix, EUA) em alta velocidade e por tempo

mínimo de 20 segundos (figura 6). Foi depositada, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 200 μ L sob os filtros (figura 7), por onde, através dos poros passam os restos celulares e muco, permanecendo retidas sobre a superfície as células usadas no diagnóstico. Em seguida, esses filtros foram tocados sobre uma lâmina de vidro por meio do fechamento de uma prensa metálica por aproximadamente dez segundos para que ocorresse a transferência do material sobre a lâmina, o que é chamado de *imprint* (figura 8).

O material disposto sobre as lâminas foi fixado pela imersão das lâminas em solução de álcool etílico absoluto por um tempo mínimo de 20 minutos, para proceder-se a coloração de Papanicolaou modificada (tabela 1) para análise morfológica e morfométrica.

Tabela 1. Sequência do processamento laboratorial para coloração de Papanicolaou modificada.

Álcool Etílico 80%	10-15 mergulhos
Álcool Etílico 70%	10-15 mergulhos
Álcool Etílico 50%	10-15 mergulhos
Água destilada	10-15 mergulhos
Hematoxilina de Harris	1 minuto
Água corrente	2 minutos
HCl 0,5% em água destilada	2 mergulhos
Água corrente	2 minutos
Álcool Etílico 50%	10-15 mergulhos
Álcool Etílico 70%	10-15 mergulhos
Álcool Etílico 80%	10-15 mergulhos
Álcool absoluto	10-15 mergulhos
Orange G6	1 mergulho
Álcool absoluto	10-15 mergulhos
Álcool absoluto	10-15 mergulhos
Álcool absoluto	10-15 mergulhos
EA-36	1 minuto
Álcool absoluto	10 mergulhos
Álcool absoluto	10 mergulhos
Álcool absoluto	10 mergulhos
Álcool absoluto	10 mergulhos
50/50 Xilol e Álcool	10-15 mergulhos
Xilol	10-15 mergulhos
Xilol	10-15 mergulhos
Xilol	10-15 mergulhos
Xilol	10-15 mergulhos
Montagem da lamínula	Entellan

Análise dos esfregaços

Os esfregaços foram analisados por meio da microscopia de luz, utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX40 adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65 (Olympus, Japão), com aumento original de 400X.

Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. O examinador foi previamente calibrado quanto ao reconhecimento da presença ou ausência das alterações celulares, bem como em relação ao critério de maturação e quantificação das células epiteliais.

Análise Citomorfológica

Os esfregaços foram analisados de acordo com a Classificação de Papanicolaou e critérios de maturação.

De acordo com a classificação de Papanicolaou,^{20,28} os esfregaços foram classificados em:

- Classe 0: material insuficiente ou inadequado para análise;
- Classe I: as células observadas apresentam padrão morfológico normal;
- Classe II: o esfregaço apresenta características de benignidade, porém, com alterações inflamatórias;
- Classe III: presença de alterações displásicas, apresentando alguns critérios de malignidade, porém com alterações discretas;
- Classe IV: esfregaços fortemente suspeitos de malignidade, com o número de células anormais maior que na classe anterior. Células da camada basal e parabasal redondas ou ovais, com núcleos em posição central, além de aparecer células com núcleos volumosos e citoplasma reduzido;
- Classe V: presença de alterações compatíveis com neoplasias malignas, exibindo células com núcleo hipercromático, com acentuado pleomorfismo nuclear, espaços vazios e grânulos grosseiros de

cromatina. As células podem apresentar mitoses atípicas, pleomorfismo celular e evidente alteração na proporção núcleo-citoplasma em favor do núcleo.

Em relação ao grau de maturação, os esfregaços foram analisados de acordo com o predomínio do tipo celular: superficial anucleada, superficial nucleada, intermediária e basal.¹⁹ As células basais do epitélio apresentam-se esféricas ou ovóides, com citoplasma corado azul, enquanto que o núcleo mostra-se arredondado, centralizado e basófilo (azul). As células epiteliais intermediárias são ligeiramente alongadas ou quadriláteras, podendo exibir algum grau de contração nuclear, apresentando-se numa coloração vermelho-azulada. Nas células pertencentes à camada superficial, nucleadas ou anucleadas, o citoplasma mostra-se acidófilo, corado em vermelho, amarelo, laranja ou marrom.^{19,25}

Análise Citomorfométrica

Cinquenta células de cada lâmina foram capturadas (figura 9), sem discriminação em relação ao critério de maturação, por meio do *Software Dino capture* pertencente à câmera *Dino-Eye Eyepiece* (modelo AM-423X, Taiwan). A captura foi realizada sequencialmente, a fim de evitar a captura de uma mesma célula mais de uma vez. Somente as células que se encontravam estiradas e bem delimitadas foram capturadas.

As áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) foram obtidas pela delimitação do núcleo e do citoplasma da célula, respectivamente. Foi utilizado o cursor digitador na ferramenta polígono, no modo medida, do sistema de análise de imagens *Image - Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000 (figura 10).^{19,21} Após a obtenção dessas medidas foi calculada a relação AN/AC das células epiteliais de cada amostra.^{19,21} A partir das medidas das cinquenta células capturadas, foi calculada uma média.

Análise estatística

Os valores obtidos para cada variável foram registrados e tabulados em planilhas no software estatístico SPSS versão 15,0 para *Windows* (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para a variável classificação de Papanicolaou, aplicou-se o teste não-paramétrico U de *Mann-Whitney*, a fim de verificar se houve diferença estatisticamente significativa no escore médio entre os dois grupos. Os testes do Qui-quadrado e exato de *Fisher* foram aplicados à variável critérios de maturação. Para a comparação das variáveis citomorfométricas (AN, AC e AN/AC) entre os dois grupos, testou-se a distribuição normal dos dados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a homogeneidade de variâncias pelo teste de *Levene*, seguido do teste t para amostras independentes. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi 5%.

FIGURAS

Figura 1. Aspecto clínico do líquen plano tipo reticular-erosivo.



Figura 2. Aspecto clínico do líquen plano tipo placa-erosivo



Figura 3. Kit do Sistema DNA CITOLIQ[®] denominado *Universal Collection Medium* (UCM).

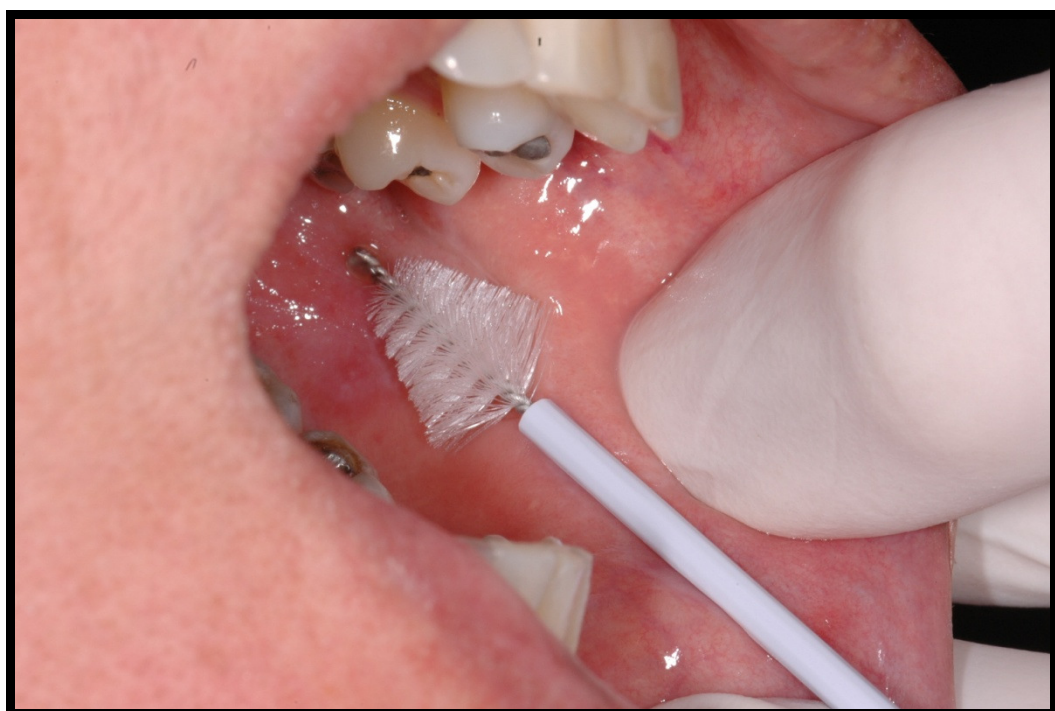


Figura 4. Coleta das células da mucosa bucal por meio da aplicação da escova de forma suave e em movimentos giratórios.

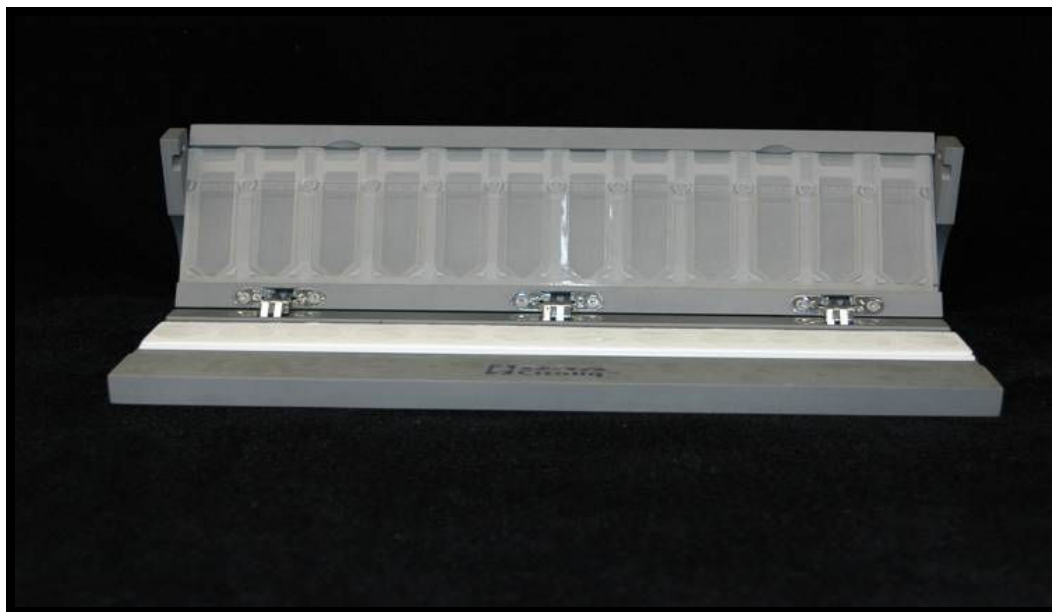


Figura 5. Prensa metálica (Prepgene[®]) aberta, exibindo a cartela de lâminas (Lamigene[®]) e o filtro (Filtrogene[®]).

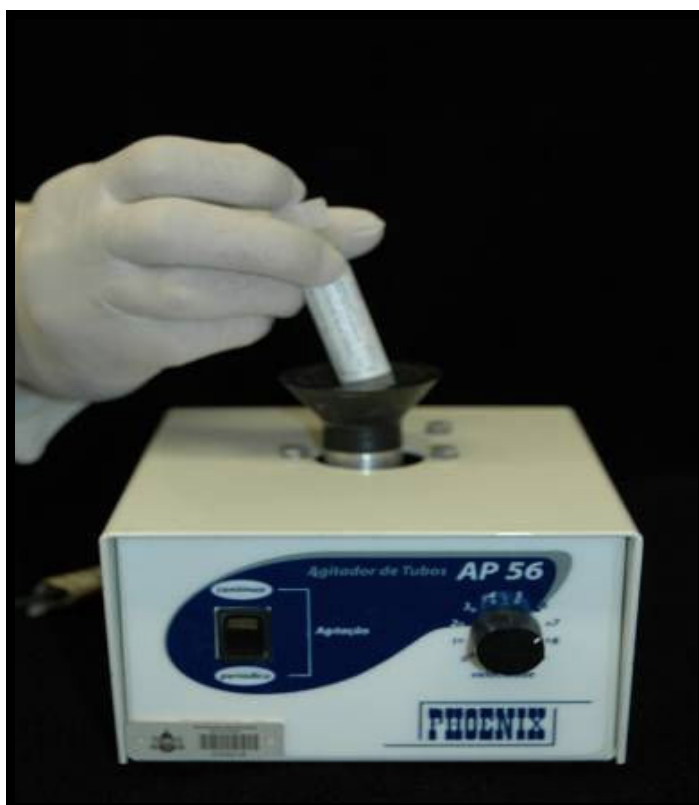


Figura 6. Homogeneização das amostras no *vortex*.



Figura 7. Alíquota sendo dispensada, com a pipeta, na superfície do filtro (Filtrogene®).



Figura 8. Prensa metálica fechada (Prepgene®), para a transferência do material sobre a lâmina (*imprint*).

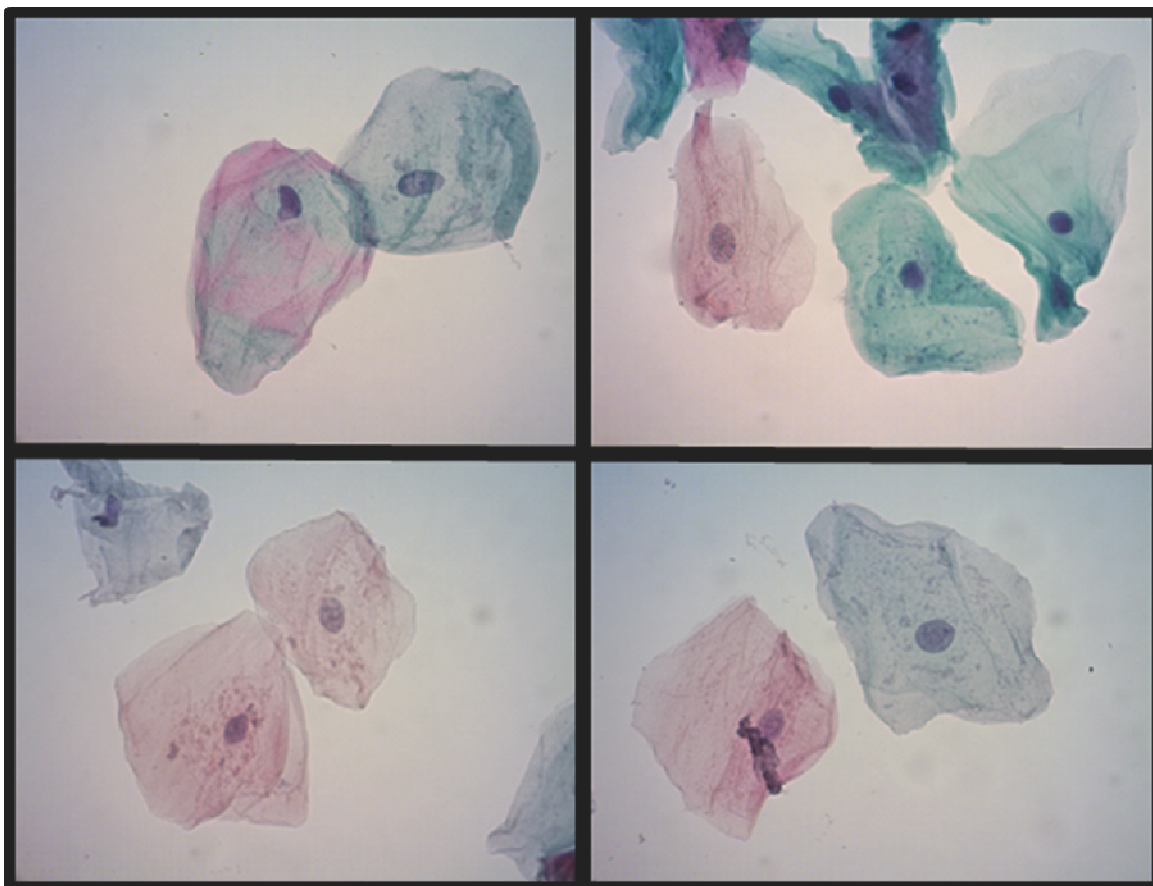


Figura 9. Imagem das células epiteliais capturadas (coloração de Papanicolaou, aumento original de 400X).

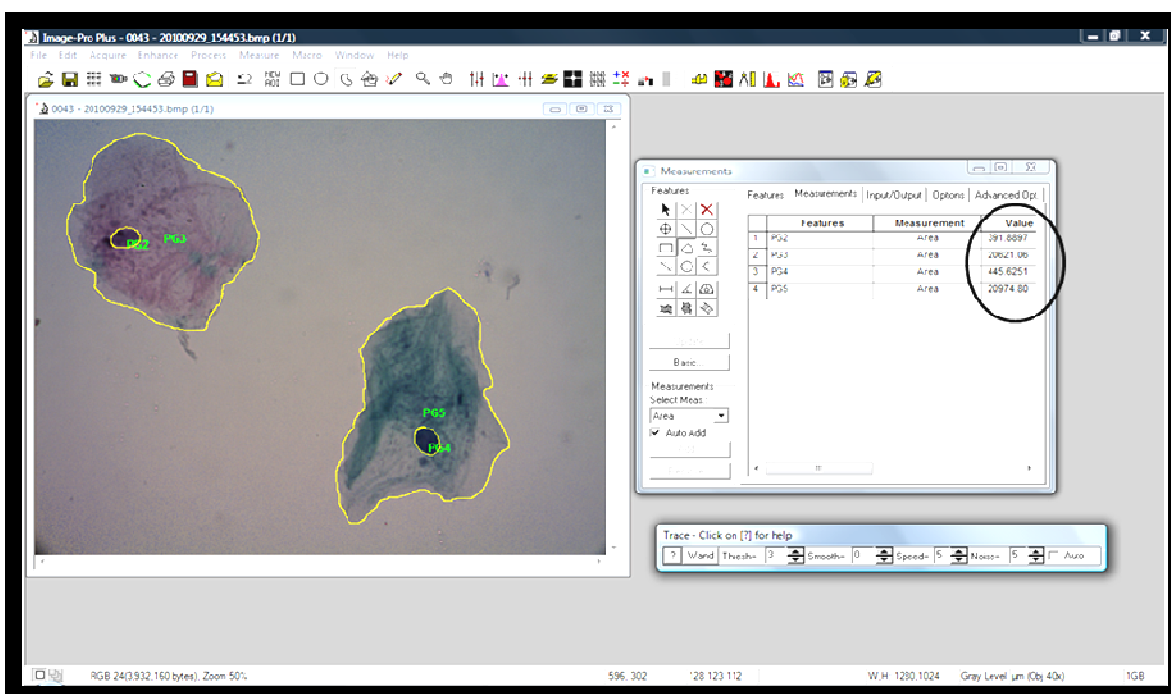


Figura 10. *Layout* da imagem do software *Image-Pro Plus* mostrando a delimitação da área do núcleo, do citoplasma e os valores respectivos.

Normas para publicação na Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology

Guide for Authors

The Official Publication for the American College of Oral and Maxillofacial Surgery, American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology, American Academy of Oral Medicine, American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology, and the Organization of Teachers of Oral Diagnosis

Editorial Office

James R. Hupp, DMD, MD, JD, Dean and Professor of Oral-Maxillofacial Surgery, East Carolina University School of Dental Medicine, Lakeside Annex #7 Mail Stop 701, Greenville, NC 27834; telephone: (252) 737-7900; e-mail: tripleo@ecu.edu

Publisher

ELSEVIER INC., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043

Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352)483-8113; fax: (352)483-3417; e-mail: 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.

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. 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 MEGG-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.

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, galleys, 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)