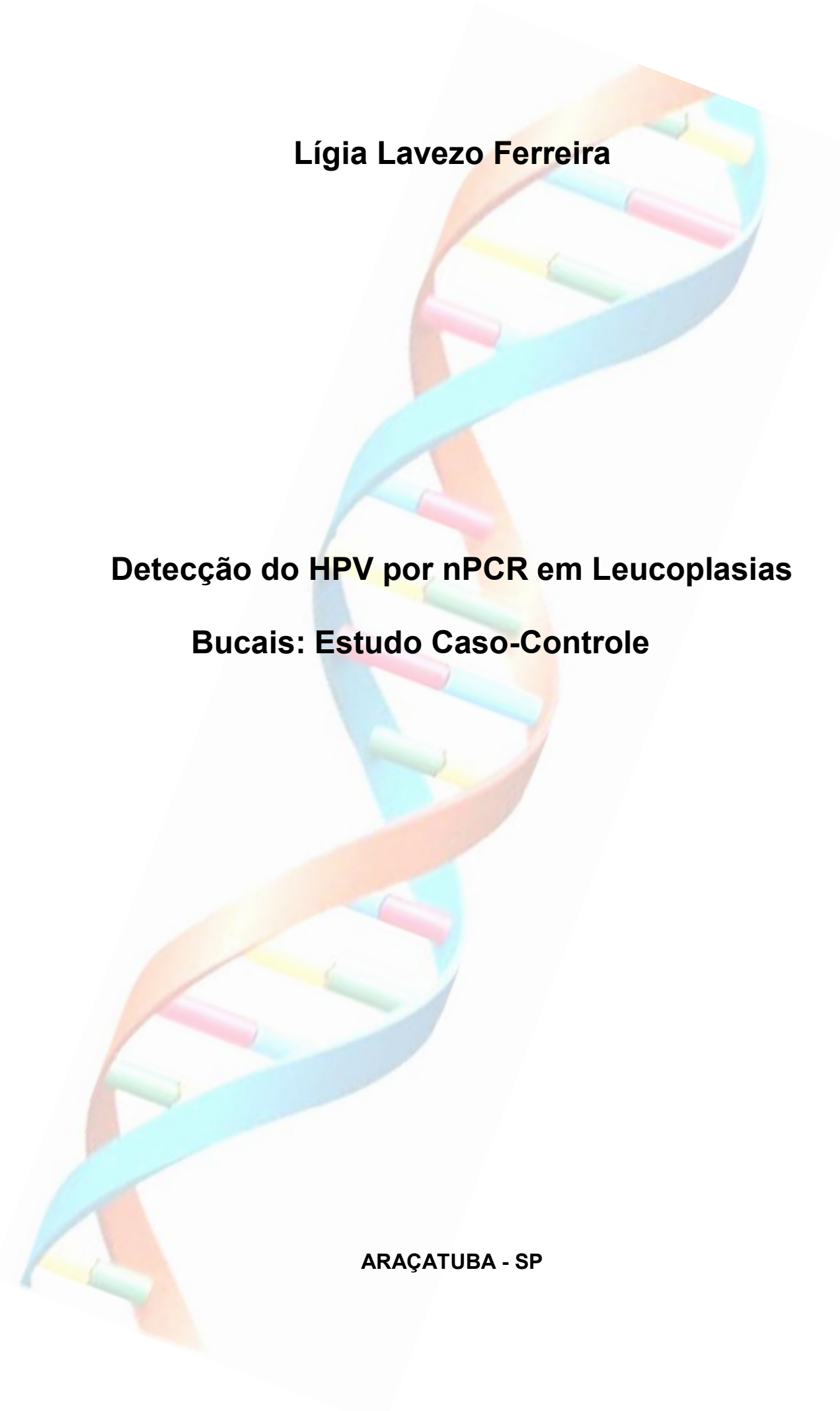




Lígia Lavezo Ferreira

Detecção do HPV por nPCR em Leucoplasias

Bucais: Estudo Caso-Controle

ARAÇATUBA - SP

Lígia Lavezo Ferreira

**Detecção do HPV por nPCR em Leucoplasias
Bucais: Estudo Caso-Controle**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do
Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de
Concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Cárís Maroni Nunes

ARAÇATUBA - SP

2013



DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Á **Deus**, que é meu tudo, de quem tiro forças nos momentos de angústias, e esperança para prosseguir. Muito obrigada paizinho, tudo é por Ti e para Ti.

Á minha família: minha irmã **Taís**, meus pais **Osi** e **Selma**, e meu namorado **Bruno**, que são os meus maiores incentivadores, me apoiando e estando sempre ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por torcerem e acreditarem em mim, amo vocês. Minhas vitórias e conquistas também são de vocês.



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade concedida, por me apresentar um mundo novo, antes desconhecido por mim, o da pesquisa científica e biologia molecular. Obrigada por acreditar em mim, pela paciência, incentivo e ensinamentos.

À minha co-orientadora **Prof.^a Dr.^a Cárís Maroni Nunes**, pelos ensinamentos transmitidos, e por manter as portas de seu laboratório abertas para a realização dessa pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr Éder Ricardo Biasoli**, pela contribuição na minha formação clínica e científica,

Ao querido amigo **Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé**, pela amizade, incentivo, inúmeras ajudas prestadas, e pelos questionamentos, que aguçam meu espírito investigativo.



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, no nome da atual Diretora **Prof.^a Adj. Ana Maria Pires Soubhia** e do Vice-Diretor **Prof. Adj. Wilson Roberto Poi**.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da coordenadora **Prof.^a Ass. Dr.^a Maria José Hitomi Nagata**.

Aos **docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro, Prof.^a Dr.^a Ana Maria Pires Soubhia, Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli, Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé, Prof.^a Dr.^a Cristiane Furuse, Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Okamoto, Prof. Dr. Gilberto Aparecido Coclete, Prof.^a Dr.^a Leda Maria Pescinini Salzedas, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini e Prof.^a Dr.^a Renata Callestini Felipini, pelos ensinamentos.

À toda equipe e quadro de **funcionários do Centro de Oncologia Bucal** (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva, Jefferson Gardenal Teixeira, Janaína Zavitoski da Silva, Suzy Elaine Nobre de Freitas, Anne Cristina de Faria Cocato, Daniene Tesoni Cassavara Ribeiro, Regiane Mazzariolli Pereira Nogueira, Gabrielle Dias Duarte, Bruna Amélia Serafim, Gislene Maria Gonçalves, Gisele Nunes, pelas conversas distraídas, amizade, e auxílio oferecido e prestado em vários momentos, o meu muito obrigada.

Aos **funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial a Marli Barbosa dos Santos, pelo carinho e dedicação.

À minha grande amiga **Gláucia Resende Soares**, pela parceria, amizade, e colaboração para o desenvolvimento desse projeto. Sua amizade foi fundamental nos momentos de dificuldades

Aos amigos e parceiros de pesquisa **Rúbia da Rocha Vieira, Maryelisa Vicente Gonçalves, Caroline Vitor Alves Franco, João Pedro Paulino Mazzon, Murilo César Bento Laurindo Júnior**, muito obrigada pelo convívio, amizade, e as inúmeras vezes que prontamente me ajudaram. Os considero grandes amigos.

À amiga **Dr.^a Cristiane Fumiko Furuse**, pela amizade, incentivo, conselhos e inúmeros ensinamentos transmitidos, que com certeza foram essenciais para a minha formação científica e acadêmica.

A **Prof.^a Dr.^a Sandra Helena Penha de Oliveira** pelos ensinamentos, e a ajuda prontamente prestada nos momentos de necessidade.

A **Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld** muito obrigada pela atenção e cuidado com que realizou a análise estatística desse trabalho.

Aos **amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)** da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Fernanda Müller de Oliveira, Silvana de Cássia Paulan, Diego Pacheco dos Santos, Dandara Pereira, Samuel Aragão de Carvalho, Carolina Beloti, Pedro Luis Florindo, Luis Henrique da Costa, pelo

carinho com que fui recebida, pelos momentos de convivência e pelas inúmeras vezes que me ajudaram. A ajuda de vocês foi fundamental.

Ao **Veronese Patologia e Citologia**, na pessoa do Dr. Luiz Alberto Veronese, pelos laudos histopatológicos das amostras.

Aos **funcionários da Seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Lilian, pela presteza com que sempre me atenderam.

Aos **colegas pós-graduandos em Odontologia**, obrigada pelo convívio e troca de experiências.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela bolsa concedida (processo nº 2011/17791-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP) e auxílio financeiro concedido (processo nº 2011/05499-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP).

Epígrafe

“Sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento. Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará.”

Provérbios 4:7-8

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre algo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

Ferreira LL. Detecção do HPV por nPCR em Leucoplasias Bucais: Estudo Caso-Controle [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

A leucoplasia bucal é considerada uma lesão cancerizável para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC), e vários fatores de risco podem estar relacionados a essa carcinogênese, incluindo o papiloma vírus humano (HPV). Na mucosa bucal tem sido feita a associação da leucoplasia bucal com o HPV. O objetivo desse estudo foi detectar a presença do DNA do HPV em amostras de tecidos fresco, saliva, plasma e células exfoliadas orais, extraídas de pacientes com e sem leucoplasia bucal, analisadas através da técnica de nested PCR (nPCR). Para este estudo foram avaliados 32 pacientes portadores de leucoplasia bucal e 24 pacientes selecionados de forma caso-controle. Foi realizada a extração de DNA das amostras, e em seguida a sua amplificação através da PCR. A nPCR para detecção do HPV revelou a presença do vírus em 68,75% das amostras de tecido fresco, 50% no plasma, 28,1% no citobrush, 62,5% na saliva no grupo de pacientes com leucoplasia em comparação com 45,8%, 54,2%, 45,8%, 50% nas amostras de tecido fresco, plasma, citobrush e saliva do grupo controle respectivamente. Baseado no presente estudo o HPV poderia ser um co-fator etiológico na patogênese da leucoplasia oral.

Palavras-chave: Leucoplasia Bucal, *Papillomaviridae*, Reação em cadeia da Polimerase

Ferreira LL. Detection of HPV by nPCR in Oral Leukoplakia: Case-Control Study [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2013.

ABSTRACT

The oral leukoplakia is considered as a pre-malignant lesion for the development of the oral squamous cell carcinoma, and several risk factors can be related to this carcinogenesis, including the human papillomavirus (HPV). HPV is the main cause of cervix cancer, and your role in the oral carcinogenesis is still controversial. The aims of this study was to detect the presence of HPV DNA in fresh tissue samples, plasma and oral exfoliated cells extracted from patients 32 with oral leukoplakia, and 24 controls analyzed through the technique of nPCR and make a comparison among these biological materials sources. It was performed the extraction of DNA from 37 patients with oral leukoplakia, and amplification of the human β -globin gene was carried out in all samples to confirm the presence and integrity of DNA. Nested PCR assays revealed the presence of HPV DNA in 68.75% of fresh tissue, 50.0% of plasma, 62.5% of saliva, and in 28.1% of oral exfoliated cells extracted from patients. Based on the current experiment, HPV could potentially be an etiologic co-factor in the pathogenesis of oral leukoplakia.

Keywords: Oral Leukoplakia. *Papillomaviridae*. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Gráfico evidenciando o número de pacientes com mais e menos de 45 anos nos grupos com e sem leucoplasia bucal.	33
FIGURA 2	Gráfico evidenciando o número de pacientes do sexo feminino e masculino nos grupos com e sem leucoplasia bucal.	34
FIGURA 3	Gráfico evidenciando as regiões afetadas pelas lesões de leucoplasia bucal.	34
FIGURA 4	Gráfico evidenciando as regiões afetadas pelas lesões reacionais.	35
FIGURA 5	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da β -globina (110pb) evidenciando amostras positivas no grupo de pacientes com leucoplasia bucal (grupo A).	40
FIGURA 6	Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (140 pb) por nPCR das amostras, evidenciando amostras positivas e negativas.	41

Lista de Tabelas

TABELA 1	Análise da presença e ausência do HPV entre os grupos com e sem leucoplasia bucal	36
TABELA 2	Comparação 2 a 2 entre as amostras do grupo com leucoplasia bucal.	37
TABELA 3	Correlação entre a presença do HPV nos diferentes tecidos com as variáveis clinica e os fatores de risco dos pacientes com leucoplasia bucal	38
TABELA 4	Correlação entre a presença do HPV nos diferentes tecidos com as variáveis clinico patológicas e os fatores de risco dos pacientes sem leucoplasia bucal.	39
TABELA 5	Análise das amostras positivas no tecido que coincidiram nas demais fontes.	40

Lista de Abreviaturas

HPV- do inglês Human Papillomavirus

DNA- do inglês Deoxyribonucleic Acid

PCR- do inglês Polymerase Chain Reaction

nPCR- do inglês Nested Polymerase Chain Reaction

HeLa- linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula

CP- controle positivo

NO- amostra contendo mistura dos componentes da amplificação e ausência de DNA

PM- Peso molecular

TE- Tris(hidroximetil)aminometano e EDTA

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

INCA- Instituto Nacional do Câncer

COB- Centro de Oncologia Bucal

FOA-UNESP- Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

dNTP- do inglês Deoxyribonucleotide Triphosphate

pb- Pares de base

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. PROPOSIÇÃO	23
3. MATERIAL E MÉTODO	25
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	59



Introdução

1. INTRODUÇÃO *

O câncer é um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, e se configura como uma das principais causas de morte. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer)¹, o câncer de boca é o sexto tipo de câncer com maior taxa de mortalidade, atingindo oficialmente cerca de 3.000 pessoas por ano no Brasil. O número de mortes por câncer bucal, no ano de 2010, foi de 4.891, sendo 3.882 homens e 1.009 mulheres. A estimativa de novos casos de câncer bucal com referência para 2013 é 14.170 novos casos, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres.

O carcinoma espinocelular (CEC) é amplamente reconhecido como o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço, representando mais de 90% dos casos² com uma taxa de sobrevida de cerca de 50% em cinco anos³. Os seus principais fatores de risco são o tabaco e o álcool, além do consumo de noz de betel, radiação e a interação com alguns vírus; como o Epstein-Barr (EBV) e o papilomavírus (HPV)⁴.

A leucoplasia é a lesão cancerizável mais comum na cavidade oral e é descrita pela Organização Mundial de Saúde (OMS)⁵ como uma placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença. A leucoplasia bucal não é uma entidade de doença específica, mas é um diagnóstico dado por exclusão⁶. Ocorre frequentemente após a quarta década de vida e os locais mais afetados da mucosa bucal são a mucosa jugal, mucosa alveolar e língua⁷. Um estudo

* Normas do Periódico International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery - IJOMS

anterior mostrou que pacientes com leucoplasia bucal podem ter 36 vezes mais probabilidade de desenvolver CEC do que aqueles na população geral. Além disso, a taxa de transformação maligna varia de acordo com a localização, as características clínicas, grau de displasia e fatores etiológicos⁸.

A etiologia da leucoplasia é multifatorial, mas ela está associada principalmente a hábitos bucais, como o fumo e o hábito de mascar tabaco, do mesmo modo que o CEC. O HPV é a principal causa do câncer de colo de útero e também tem sido associado às lesões malignas e potencialmente malignas orais⁹. Existem mais de 150 genótipos conhecidos de HPV e acredita-se que pelo menos 15 tem potencial oncogênico. Entretanto, a maioria dos cânceres de cabeça e pescoço está associada a um único genótipo de HPV, o HPV 16, também associado aos cânceres anogenitais¹⁰. Os genótipos de HPV são classificados como de baixo risco (por exemplo, HPV 06-11-13-32), médio risco (HPV 31-33-35-51), alto risco (HPV 16-18) de acordo com o grau de correlação com certas neoplasias malignas, sendo os de médio e alto risco frequentemente encontrados em lesões potencialmente malignas e malignas do trato anogenital, pele e trato aerodigestivo superior¹¹.

Atualmente, o HPV é reconhecido como uma das principais causas do câncer de orofaringe. Nos Estados Unidos, cerca de 40 a 80% dos cânceres de orofaringe são causados pelo HPV, enquanto na Europa a proporção varia em torno de 90% e na Suécia menos de 20% em comunidades com maiores índices de consumo de tabaco¹². Estudos recentes sugerem que o HPV pode ser um dos fatores de prognóstico importante, com melhor taxa de sobrevida global e específica da doença encontrada em pacientes com tumores de orofaringe¹³.

Tem sido feita a associação entre o desenvolvimento da leucoplasia bucal com o HPV^{11, 14-15}. Resultados de estudos anteriores demonstraram evidências epidemiológicas e moleculares da presença do genoma de HPV em lesões pré-malignas orais e em tecidos de CEC, especialmente dos subtipos de HPV-16 e -18^{2, 4, 11, 16, 17}. Yang et al.⁴ observaram uma porcentagem de 22,8% de infecção pelo HPV em pacientes com leucoplasia bucal, sendo das amostras positivas o HPV-18 o mais prevalente (78,9%).

Na literatura, há uma discrepância notável nos resultados de estudos realizados em lesões bucais em busca de infecção pelo HPV. Isso se deve à dificuldade de comparar resultados, devido às diferentes técnicas empregadas; como a reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica, sequenciamento, *western blot*, *southern blot*, hibridização *in situ*, captura híbrida, entre outros. Além da técnica, em muitos casos os pacientes diferem em idade, patologia e fatores de risco específicos de um estudo para outro. A presença do HPV também depende da fonte do material e sua qualidade na coleta do mesmo. A disponibilidade de amostras citológicas frescas, cuidadosamente recolhidas e da especificidade e sensibilidade da técnica de laboratório empregada¹¹.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método bastante sensível e específico para a detecção dos ácidos nucleicos do HPV¹⁸. Os oligonucleotídeos iniciadores são direcionados à região longa do HPV e os mais utilizados em pesquisas de DNA do HPV são MY09/MY11¹⁹ e GP5+/GP6+ (que detectam um espectro mais amplo de tipos virais que os da “primeira geração” GP5/GP6)²⁰.

Novos estudos são necessários para esclarecer a relação do papel do HPV com as lesões cancerizáveis, especialmente as leucoplasias bucais.



Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi detectar a presença do HPV em amostras de tecido fresco, saliva, células *exfoliadas* e plasma obtidos de pacientes com e sem leucoplasia bucal, por meio do nPCR e verificar se existe correlação na positividade do HPV entre as diferentes fontes de materiais



Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba (FOA)- UNESP, com o número de Processo FOA-01034/2011.

O grupo de estudo foi constituído por 32 pacientes portadores de leucoplasia bucal. Vinte e quatro indivíduos sem leucoplasia pareados por sexo e idade com diferença de até 5 anos, que se enquadraram nos critérios de seleção do estudo, constituíram o grupo controle.

Crítérios de seleção

Foram adotados os seguintes critérios para a inclusão dos pacientes no grupo de estudo:

- Pacientes com leucoplasia bucal, cuja biópsia foi realizada para confirmação diagnóstica por meio de exame histológico;

Para a inclusão dos pacientes no grupo controle, foram adotados os seguintes critérios:

- Pacientes que necessitavam de procedimento cirúrgico oral (cunha distal ou cirurgia pré-protética);

Coleta de dados e materiais

Por meio de formulário próprio foram colhidas informações existentes nos prontuários dos pacientes. Depois de selecionados os casos que preencheram os critérios de elegibilidade, realizaram-se os procedimentos clínicos e laboratoriais.

Foram considerados tabagistas os indivíduos que fumaram regularmente durante alguma época da vida, mesmo aqueles que atualmente tinham abandonado o vício. Os não tabagistas foram aqueles que em nenhum momento da vida fizeram uso regular do fumo. Para a classificação de etilistas e abstêmios foram usados os mesmos critérios.

Pacientes do grupo de estudo

Todos os pacientes foram submetidos à coleta de materiais para a pesquisa. Antes da coleta de saliva e citobrush os pacientes foram orientados a não consumir bebida ou comida até 30 minutos antes da realização da coleta.

Para a obtenção das amostras de saliva, foi solicitado ao paciente que o mesmo cuspiasse a saliva em um tubo falcon de 15 mililitros (ml) durante 10 minutos, a fim de obter no mínimo de 5 ml de saliva.

Foram realizadas as coletas de células *exfoliadas* por meio do *citobrush*. Para a coleta da amostra, cada *citobrush* foi friccionado firmemente de 5 a 10 vezes na região da lesão²¹ e colocados em um tubo eppendorf de 2 ml contendo 300 microlitros de água Mili-Q ou TE.

Coletaram-se 10 ml de sangue de cada paciente. Essa amostra foi coletada em tubos contendo EDTA, sendo imediatamente centrifugada para obtenção do plasma.

Foram realizadas biópsias com finalidade de diagnóstico e cura, sendo que as amostras obtidas foram divididas em duas partes: uma parte foi conservada em formol para realização do exame histopatológico de rotina e outra parte foi conservada em nitrogênio líquido para posteriores exames biomoleculares de detecção do DNA do HPV.

Todas as amostras foram identificadas e armazenadas imediatamente após a coleta em freezer a -80°C para posterior procedimento laboratorial.

Pacientes do grupo controle

Foram selecionados pacientes sem suspeita de leucoplasia bucal e que necessitavam de cunha distal ou cirurgia pré-protética como modalidade de tratamento.

Realizou-se a coleta de saliva de forma semelhante à técnica já descrita para os pacientes do grupo de estudo.

Foi realizada a coleta de células *exfoliadas* por meio do *citobrush* da região de mucosa jugal, utilizando-se a mesma técnica descrita anteriormente.

Coletaram-se 10 ml de sangue de cada paciente controle, centrifugados para a obtenção do plasma da mesma forma que foi realizado no grupo de leucoplasia.

Deve-se frisar que os procedimentos cirúrgicos (cunha distal ou cirurgia pré-protética) foram realizados independentemente da pesquisa, pois se configuraram como tratamento.

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada segundo as instruções do fabricante do *kit* de extração de DNA QIAamp® DNA mini *kit* (QIAGEN Ltd, Crawley, UK).

O DNA obtido de todas as amostras foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) onde todas as amostras confirmaram a presença e um DNA de boa qualidade. Posteriormente, foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene controle da β -globina humana e para o gene do HPV.

PCR para gene humano controle

Na realização da PCR para o gene controle da β -globina foram utilizados os oligonucleotídeos PCO3 e PCO4 (110 pares de base - pb)^{22, 23}. A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, USA), adicionando-se ao DNA um *mix* com os seguintes componentes: 10,8 μ l de água ultrapura; 1,5 μ l de cada oligonucleotídeo iniciador (PCO3 e PCO4 [5 μ M]); 1,5 U de Taq DNA polimerase (5U/ μ l); 2,5 μ l de tampão de PCR 10X (200 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl); 0,75 μ l de MgCl₂ 50 mM ; 1,5 μ l de mistura dNTPs 10mM (deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), com exceção da água ultrapura e dos dNTPs, os demais componentes são da Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

Após a mistura dos componentes em capela de fluxo-laminar (Heto-Holter Tivo HV PCR, Dinamarca), foram adicionados 5 μ l do DNA de cada amostra; totalizando um volume final de 25 μ l. Como controle positivo para o

gene da β -globina, utilizou-se uma amostra de sangue previamente testada e como controle negativo uma amostra contendo somente o *mix*.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador (Peltier Effect Cycling modelo PTC – 100, MJ Research, EUA) de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 8 minutos. Para o tecido e para o plasma, a temperatura de anelamento foi alterada para 53°C e 50°C, respectivamente.

Para verificação da presença do DNA humano foi feita a análise por meio da eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão 1x TBE (Fonte Eletroforética - Amersham Pharmacia Biotech modelo EP3501, Suécia), durante 75 minutos a 100 volts. A visualização após coloração com brometo de etídeo foi feita com o auxílio de luz ultravioleta e a documentação fotográfica com o sistema Kodak Digital Science 1D.

Todas as amostras confirmaram a presença e integridade do DNA genômico, e em seguida foram submetidas à pesquisa do gene do HPV por meio da PCR em duas etapas (nPCR) com oligonucleotídeos iniciadores para o DNA do HPV. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

nPCR para amplificação do HPV

Para detecção do HPV, foram utilizados os pares de *primers* MY09/11 em combinação com os pares GP5/6+ da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, resultando em um fragmento de 140 pares de bases^{16-17, 20}, e permitem a

detecção de uma série de tipos de HPV, entre eles o HPV-6, -11, -16, -18, -31 e -33²⁰.

Os componentes do *mix* para a primeira etapa da PCR foram: 10,7 µl de água ultrapura; 2,5 µl de tampão de PCR 10X (200 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl); 2 µl de MgCl₂ 50 mM; 1,5 µl de mistura 10mM dNTPs (deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA); 1,5U de Taq polimerase (5U/µl) e 1,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (5 µM). Em capela de fluxo-laminar, foram adicionados 5 µl de DNA genômico de cada amostra. Como controle positivo para infecção por HPV, foi utilizada uma amostra de HeLa, uma linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Os componentes e as condições de ciclagem utilizados na segunda etapa foram semelhantes aos da primeira etapa, com diferença na quantidade de água e de MgCl₂ 50mM, onde foram utilizados 11,2 µl e 1,5 µl, respectivamente, com temperatura de anelamento de 43°C.

Os produtos da nPCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% durante 2,5 horas com voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata e a documentação fotográfica com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Esse processo foi repetido para cada amostra (plasma, saliva, células *exfoliadas*, tecido). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Análise dos dados

Foram aplicados os testes de Qui-Quadrado e Exato de Fisher para comparação entre os grupos de estudo e controle para cada tipo de material. O teste 2 a 2 foi utilizado para a comparação dos resultados entre as diferentes fontes de materiais.

Realizou-se a regressão logística para análise das variáveis: sexo, idade, localização da lesão, tabaco, álcool, presença e ausência do HPV.

O teste de proporção foi aplicado para avaliação da coincidência de amostras positivas no tecido epitelial com as demais fontes (plasma, *citobrush* e saliva) no grupo de estudo e controle.



Resultados

4. RESULTADOS

Um total de 32 pacientes com leucoplasia (grupo de estudo) e 24 pacientes controle (grupo controle) foram incluídos no estudo, pareados por sexo e por idade, com diferença de até 5 anos.

A idade média dos pacientes que constituíram o grupo caso (ou experimental) foi de 56,5 anos (25-74; desvio padrão de 10,8) e a relação masculino-feminino foi de 2,1:1. No grupo controle, a idade média foi de 55,21 anos (26-69; desvio padrão de 11,6), a relação masculino-feminino foi de 1,4:1. (figuras 1 e 2)

Figura 1: Gráfico evidenciando o número de pacientes com mais e menos de 45 anos nos grupos com e sem leucoplasia.

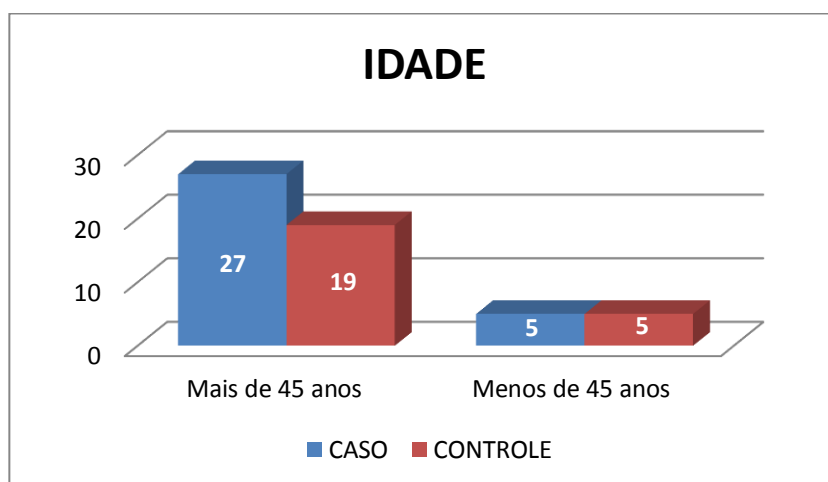
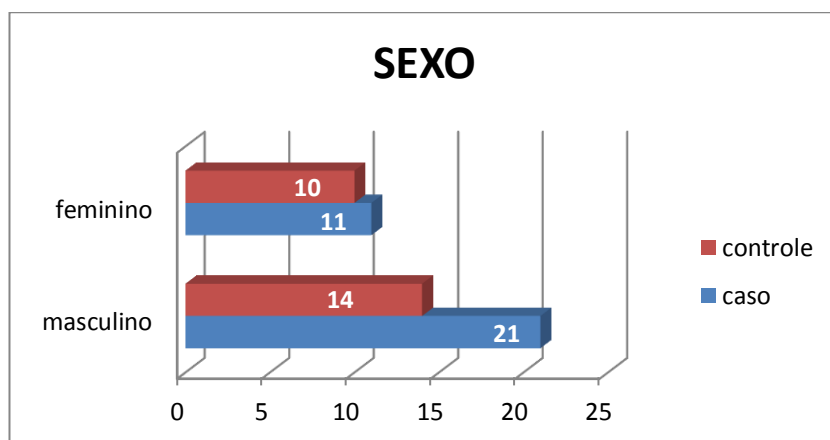
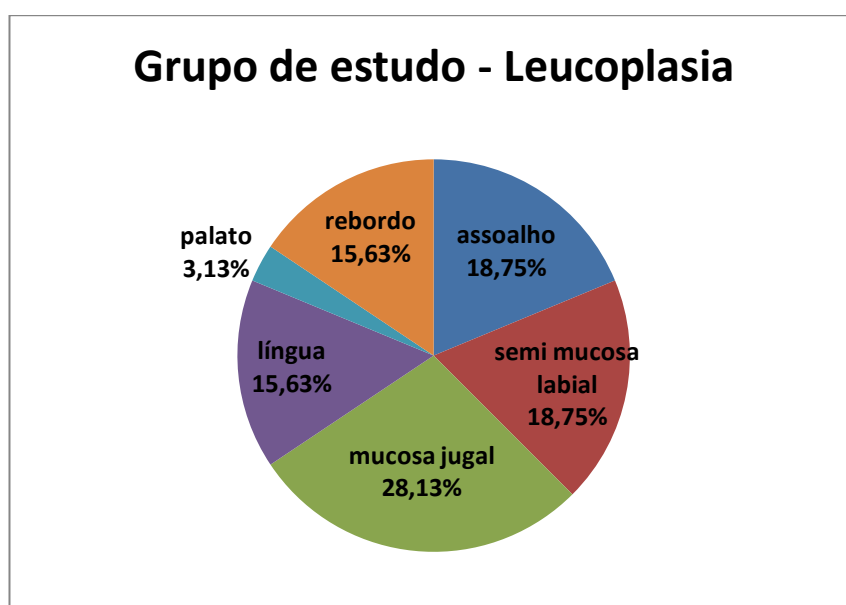


Figura 2: Gráfico evidenciando o número de pacientes do sexo feminino e masculino nos grupos com e sem leucoplasia.



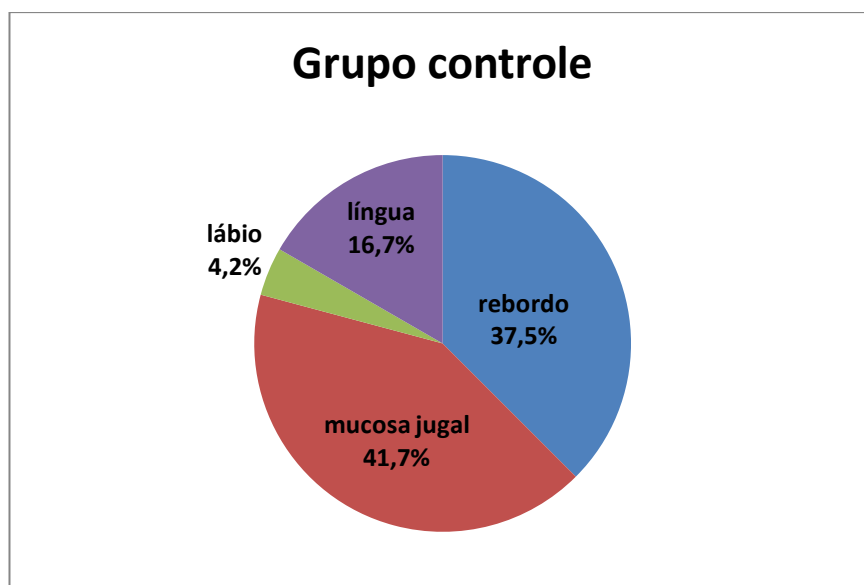
A área mais afetada pelas lesões de leucoplasia foi a região de mucosa jugal (28,13%) seguida pelo assoalho bucal (18,75%), semimucosa labial (18,75%), língua (15,63%), rebordo gengival (15,63%) e região de palato duro (3,13%). (**figura 3**)

Figura 3: Gráfico evidenciando as regiões afetadas pelas lesões de leucoplasia bucal.



Nos pacientes do grupo controle as áreas onde foram removidos os fragmentos de tecido foram: mucosa jugal (41,7%), rebordo alveolar (37,5%), língua (16,7%) e mucosa labial (4,2%). **(figura 4)**

Figura 4: Gráfico evidenciando as regiões afetadas pelas lesões reacionais.



Quanto aos hábitos, 90,63% dos pacientes com leucoplasia usavam tabaco e 50% eram etilistas. No grupo controle, 54,2% dos pacientes eram fumantes e 29,2% bebiam.

A presença do HPV foi detectada em 68,75% (22/32) e em 45,8% (11/24) das amostras de tecido fresco no grupo de estudo e controle, respectivamente ($p=0,334$). Nas amostras de plasma, 50% (16/32) do grupo de estudo e 54,2% (13/24) do controle foram positivas para o HPV ($p=0,723$). Nas amostras de *citobrush*, o HPV foi encontrado em 28,1% (9/32) e 45,8% (11/24) das amostras do grupo de estudo e controle ($p=0,411$). Quanto à saliva, 62,5%

(20/32) e 50% (12/24) das amostras do grupo de estudo e controle foram positivas para o HPV ($p=0,925$). (**tabela 1**)

Tabela 1: Análise da presença e ausência do HPV entre os grupos com e sem leucoplasia bucal

ANÁLISE CASO-CONTROLE				
		HPV + (%)	HPV - (%)	p*
CITOBRUSH	CASO (n=32)	9 (28,1)	23 (71,9)	0,4114
	CONTROLE (n=24)	11 (45,8)	13 (54,2)	
TECIDO	CASO (n=32)	22 (68,8)	10 (31,3)	0,3348
	CONTROLE (n=24)	11 (45,8)	13 (54,2)	
PLASMA	CASO (n=32)	16 (50,0)	16 (50,0)	0,7231
	CONTROLE (n=24)	13 (54,2)	11 (45,8)	
SALIVA	CASO (n=32)	20 (62,5)	12 (37,5)	0,9259
	CONTROLE (n=24)	12 (50,0)	12 (50,0)	

Na análise da positividade do HPV entre os diferentes tipos de materiais encontrou-se um valor significativo para as variáveis tecido *versus* plasma ($p=0,0269$) e plasma *versus* citobrush ($0,0493$). **(tabela 2)**

Tabela 2: Comparação 2 a 2 entre as amostras do grupo com leucoplasia bucal.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MATERIAIS	
VARIÁVEIS	P* VALOR
TECIDO X SALIVA	0.5726
TECIDO X PLASMA	0.0269**
TECIDO X CITOBURUSH	0.1317
CITOBURUSH X PLASMA	0.0493**
CITOBURUSH X SALIVA	0.0598
PLASMA X SALIVA	0.4652

** estatisticamente significativo

Os cruzamentos entre a presença e ausência do HPV, tanto entre os pacientes com leucoplasia bucal como entre os do grupo controle, não foram estatisticamente significativos segundo as variáveis: sexo, idade, tabagismo, etilismo e grau de displasia. **(tabelas 3 e 4)**

Tabela 3: Correlação entre a presença do HPV nos diferentes tecidos com as variáveis clínica e os fatores de risco dos pacientes com leucoplasia bucal.

Variáveis clínico- patológicas - Pacientes com Leucoplasia													
VARIÁVEIS	PACIENTES (n=32)	TECIDO			PLASMA			CITOBURSH			SALIVA		
	n (%)	HPV			HPV			HPV			HPV		
		+	-	p*	+	-	p*	+	-	p*	+	-	p*
SEXO													
Masculino	21 (65,6)	13	8	0,248	10	11	0,709	6	15	0,637	14	7	0,501
Feminino	11 (34,4)	9	2		6	5		3	8		6	5	
IDADE													
> 45	27 (84,4)	19	8	0,645	14	13	0,626	8	19	0,660	17	10	0,899
<45	5 (15,6)	3	2		2	3		1	4		3	2	
TABACO													
Tabagista	29 (91,6)	19	10	0,219	14	15	0,544	8	21	0,642	18	11	0,689
Não tabagista	3 (9,4)	3	0		2	1		1	2		2	1	
ÁLCOOL													
Etilista	16 (50)	5	11	0,647	8	8	0,637	3	13	0,216	8	8	0,136
Abstêmio	16 (50)	11	5		8	8		6	10		12	4	
DISPLASIA													
com displasia	6 (18,75)	3	3	0,271	2	4	0,365	3	3	0,186	4	2	0,815
sem displasia	26 (81,3)	19	7		14	12		6	20		16	10	

Tabela 4: Correlação entre a presença do HPV nos diferentes tecidos com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes sem leucoplasia bucal.

Variáveis clínico-patológicas - Pacientes controle													
VARIÁVEIS	PACIENTES (n=24)	TECIDO			PLASMA			CITOBRUSH			SALIVA		
	n (%)	HPV			HPV			HPV			HPV		
		+	-	p*	+	-	p*	+	-	p*	+	-	p*
SEXO													
Masculino	14 (58,3)	6	8	0,729	7	7	0,627	5	9	0,239	7	7	0,659
Feminino	10 (41,7)	5	5		6	4		6	4		5	5	
IDADE													
> 45	19 (79,2)	9	10	0,768	11	8	0,474	9	10	0,768	9	10	0,615
<45	5 (20,8)	2	3		2	3		2	3		3	2	
TABACO													
Tabagista	13 (54,2)	7	6	0,391	6	7	0,391	6	7	0,972	5	8	0,219
Não tabagista	11 (45,8)	4	7		7	4		5	6		7	4	
ÁLCOOL													
Etilista	7 (29,2)	3	4	0,851	4	3	0,851	3	4	0,851	3	4	0,653
Abstêmico	17 (70,8)	8	9		9	8		8	9		9	8	

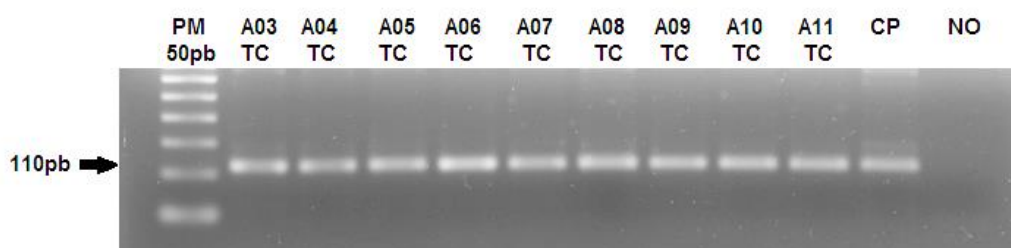
A análise das amostras positivas no tecido que coincidia com as amostras positivas das demais fontes mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de estudo e controle nas amostras de plasma ($p=0,006$). As demais fontes não apresentaram diferença estatisticamente significativa. **(tabela 5)**

Tabela 5: Análise das amostras positivas no tecido que coincidiram nas demais fontes.

Teste de Proporção					
		N DE AMOSTRAS +	N AMOSTRAS + COINCIDENTES NO TECIDO	PROPORÇÃO	p*
PLASMA	Caso	16	14	87,5	0,006 **
	Controle	13	4	30,8	
SALIVA	Caso	20	14	70	0,227
	Controle	12	5	41,7	
CITOBRUSH	Caso	9	8	88,9	0,239
	Controle	11	6	54,5	

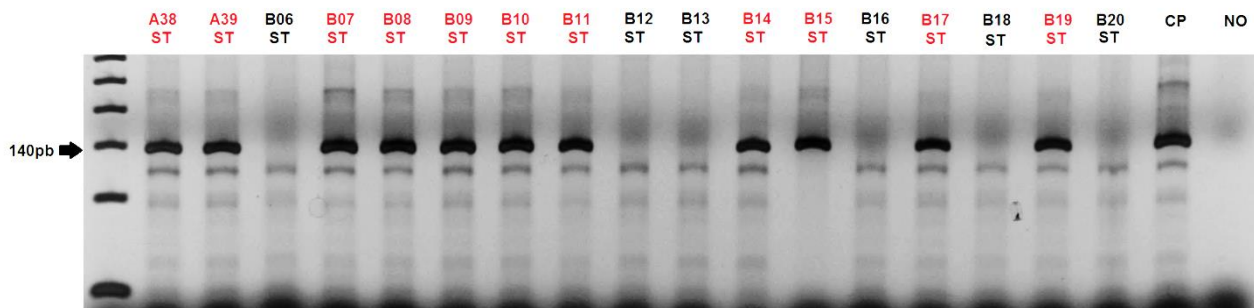
** estatisticamente significativo

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da β -globina (110pb) evidenciando amostras positivas em parte das amostras de pacientes com leucoplasia bucal (grupo A).



*PM = peso molecular de 50pb; CP = controle positivo (DNA extraído de sangue humano); NO = controle (sem DNA); TC= tecido.

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (140 pb) por nPCR em parte das amostras dos pacientes com e sem leucoplasia bucal.



*PM = peso molecular de 50pb; CP = controle positivo (DNA extraído de HeLa); NO = controle negativo (sem DNA). ST = saliva; A38= grupo estudado seguido pelo numero da amostra; grupo A= pacientes com leucoplasia bucal; grupo B= pacientes controle. Amostras positivas em vermelho.



Discussão

5. DISCUSSÃO

Com relação à taxa de detecção do HPV nos tecidos de leucoplasia bucal, 68,75% das amostras desse estudo foram positivas, dados superiores aos de Yang et. al.⁴ e de Ostwald et. al.²⁴, que apresentaram 22,8% e 22,2% de amostras positivas para o HPV, respectivamente. Essas diferenças na taxa de detecção podem ser atribuídas ao tipo de tecido utilizado, uma vez que o tecido parafinado apresenta uma maior taxa de degradação de DNA, devido a sua fixação em formalina, o que pode dificultar a detecção do vírus. No entanto, Kristoffersen et al.²⁵ apresentaram dados semelhantes aos dessa pesquisa, com 64% de amostras positivas utilizando o material parafinado, o que se leva a crer que outros fatores estão envolvidos. Outro fator que pode justificar a diferença nas taxas de detecção do vírus é o tamanho do fragmento e a região amplificada. No presente estudo, foram utilizados *primers* específicos para a região L1 do vírus, que amplificam um fragmento de 140pb e apresenta uma alta sensibilidade para a detecção do vírus, o mesmo utilizado em outros estudos^{4, 25, 26}.

Com relação à presença do HPV no plasma, essa pesquisa obteve 50% de amostras positivas, dados superiores aos de Capone et al.²⁷, com 17% de amostras positivas para o HPV no plasma de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. Gnanamony et al.²⁸ e Cao et al.²⁹ analisando pacientes HPV positivos nos tecidos, obtiveram 56,4% e 65% de sucesso na detecção do vírus no plasma, dados inferiores aos desse estudo. Comparando-se as amostras positivas no plasma com as positivas no tecido epitelial, foram observados resultados significativamente maiores no grupo com leucoplasia

bucal com 87,5% de amostras coincidentes, quando comparados com 30,8% de amostras coincidentes no grupo controle. Acredita-se que o DNA do vírus presente no plasma e tecido concomitantemente, indica a presença do vírus ativo, oriundo de células infectadas que se desprenderam e atingiram a corrente sanguínea; enquanto a presença apenas no plasma, com ausência do DNA do vírus no tecido da lesão, pode significar apenas uma contaminação e não uma infecção propriamente instalada²⁷. Outra hipótese seria que a presença de infecção bacteriana ou inflamação facilita a permanência do vírus na circulação sanguínea³⁰, uma vez que o estudo de Ma et al.³¹ mostrou que bactérias podem formar uma fonte de permanência do HPV, o que poderia explicar a presença do HPV no plasma na ausência de lesões ativas.

Adamopoulou et al.³² analisando amostras de DNA de cérvix e saliva encontraram a presença do HPV em 58,6% das amostras de saliva. Kulkarni et al.³³ avaliaram dois grupos: a saliva de pacientes com CEC e o controle. Logo, encontraram 70,6% e 60,4% das amostras positivas para o grupo de CEC e controle, respectivamente. Esses dados são semelhantes aos do presente estudo, onde 62,5% das amostras de saliva dos pacientes com leucoplasia bucal e 50% dos controles foram positivas para o DNA do HPV. A presença do HPV na saliva não significa necessariamente a integração do vírus nas células no hospedeiro, uma vez que o vírus pode se encontrar na forma episomal, não se integrando ao DNA da célula³⁴, fato observado na presente pesquisa em que 75% de todas as amostras positivas na saliva também foram positivas no tecido do grupo com leucoplasia bucal. Por outro lado, no grupo controle 40,7% das amostras positivas na saliva também estavam presentes no tecido. Considerando esses resultados, uma possibilidade é que o vírus detectado

apenas na saliva se trata da forma circulante do mesmo e não necessariamente uma infecção estabelecida. A saliva pode ser um meio eficiente para a detecção do vírus, logo se crê que para um adequado diagnóstico seria necessária a comparação da presença do vírus também em outros meios, como a inclusão viral no tecido epitelial, analisada por meio de fragmentos de biópsias.

Quanto à coleta de células esfoliadas, Campisi et al.¹⁷ obtiveram uma menor taxa de detecção do vírus em leucoplasias bucais (17,6%) comparada a esse estudo, por outro lado Mathew et al.¹⁵ e Szarka et al.¹⁶ obtiveram uma alta taxa de detecção do vírus, entre 40 e 50% das amostras. No entanto, em todos esses estudos a prevalência do HPV no grupo de pacientes com lesão foi significativamente maior do que nos grupos controle. Esses dados diferem dos da presente pesquisa, onde a prevalência do vírus no grupo controle foi maior do que no grupo com lesão (28,1% e 45,8% no grupo de estudo e controle, respectivamente), apesar de não ser estatisticamente significativa. A comparação da inclusão viral presente simultaneamente nos tecidos e células esfoliadas mostrou que 88,9% e 54,5% do grupo de estudo e controle, respectivamente, estavam presentes em ambos os materiais biológicos.

A presença do vírus no grupo controle pode se tratar de uma infecção transitória do vírus no organismo, podendo ser eliminado posteriormente; uma vez que na maioria dos casos a inclusão viral no tecido epitelial não foi coincidente com a encontrada nas demais fontes.

Nesse estudo não se encontrou diferença estatística entre a presença do HPV e as variáveis (sexo, idade, localização anatômica da lesão, consumo de tabaco e álcool, presença/ ausência de displasia), dado semelhante a outros

estudos; onde não houve diferença estatística para essas variáveis e a presença do HPV em leucoplasias bucais^{4, 25-26, 35}. Acredita-se que no grupo de pacientes com leucoplasia bucal a idade não interfere no status do HPV, diferentemente do grupo de pacientes com CEC de cabeça e pescoço, onde tem sido relatada uma maior incidência da infecção pelo HPV em pacientes jovens, principalmente devido aos hábitos sexuais³⁵⁻³⁷.

O papel do tabaco na evolução da infecção pelo HPV na cavidade oral permanece controverso, no entanto a maioria dos estudos não apresenta diferença estatisticamente significativa entre a presença do HPV e o tabaco^{11,38}. Os resultados da presente pesquisa mostram que a maioria dos pacientes fumou cronicamente em algum momento de sua vida, fato esperado nos pacientes com leucoplasia. Apesar de Esquenazi et al.³⁹ citarem que o tabaco exerce um efeito preventivo na infecção oral e de orofaringe pelo HPV, uma vez que devido ao aumento da queratinização a mucosa se tornaria menos suscetível ao trauma e infecção pelo HPV, concorda-se com Mathew et al.¹⁵ que afirmam que para o desenvolvimento de lesões clínicas, como o CEC oral ou a leucoplasia bucal, muitos outros fatores, além do HPV, contribuem para a formação das lesões, como o tabaco e o álcool.

Um acompanhamento das lesões HPV- positivas é recomendado, pois houve uma correlação da presença do vírus no plasma e no tecido nos pacientes com leucoplasia bucal, e o número absoluto de infecção pelo HPV foi encontrado em maior número no grupo de estudo.

Apesar de não haver diferença estatística o número de infecções pelo HPV no grupo de estudo foi maior, em números absolutos, do que a infecção encontrada no grupo controle, o que sugere o envolvimento do HPV nas lesões

de leucoplasia bucal. A realização de novos estudos com um maior número de pacientes incluídos, tanto no grupo de estudo como grupo controle, e com o pareamento dos pacientes por hábitos, sexo e idade, pode ajudar a esclarecer de melhor forma o envolvimento do HPV na etiologia das leucoplasias bucais.



Conclusão

6. CONCLUSÃO

Baseado em nossos resultados concluímos que o HPV pode ser um importante co-fator etiológico na patogênese da leucoplasia oral, sendo detectado em maior frequência nos tecidos frescos em comparação com plasma, saliva e células *exfoliadas*. O plasma também constitui uma importante fonte de detecção do vírus uma vez que foi o material que obteve maior número de infecções coincidentes com o tecido.



Referências

REFERÊNCIAS*

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2012. Rio de Janeiro. INCA, 2012.
2. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36(2): 153-8.
3. Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer*. 2010; 10: 685. doi: 10.1186/1471-2407-10-685.
4. Yang SW, Lee YS, Chen TA, WU CJ, Tsai CN. Human papillomavirus in oral leukoplakia is no prognostic indicator of malignant transformation. *Cancer Epidemiol*. 2009; 33(2): 118-22. doi: 10.1016/j.canep.2009.05.003
5. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;46(4):518-39.
6. Mete O, Keskin Y, Hafiz G, Kayhan KB, Unur M. Oral proliferative verrucous leukoplakia: Underdiagnosed oral precursor lesion that requires retrospective clinicopathological correlation. *Dermatol Online J*. 2010; 16(5):6.

*Normas do Periódico International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

7. Lapthanasupkul P, Poomsawat S, Punyasingh J. A clinicopathologic study of oral leukoplakia and erythroplakia in a Thai population. *Quintessence Int.* 2007; 38(8): e448-55.
8. Yang SW, Wu CJ, Lee YS, Chen TA, Tsai CN. Postoperative recurrence as an associated factor of malignant transformation of oral dysplastic leukoplakia. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2010; 72(5):280-90. doi: 10.1159/000318874.
9. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(6): 338-44.
10. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010; 11(8): 781-9. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.
11. Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Cianfriglia C, Marandino F, Perrone Donnorso R, Vocaturo A. Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006; 25(1): 21-8.
12. Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, Betka J, Tachezy R. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265 Suppl 1:S75-82.

13. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010; 76(1): 78-84.
14. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011;17 Suppl 1:58-72. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x.
15. Mathew A, Mody RN, Patait MR, Razooki AA, Varghese NT, Saraf K. Prevalence and relationship of human papilloma virus type 16 and type 18 with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia in fresh scrappings: a PCR study. *Indian J Med Sci.* 2011; 65(5): 212-21. doi: 10.4103/0019-5359.106612.
16. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth ED, Boda R, Márton I, Gergely L. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(4): 314-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x..
17. Campisi G, Giovannelli L, Aricò P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, D'Angelo M. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(6): 705-11.
18. Barzon L, Giorgi C, Buonaguro FM, Palù G; Italian Society for Virology. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and

- vaccination for cervical cancer prevention. *Infect Agent Cancer*. 2008;3:14. doi: 10.1186/1750-9378-3-14.
19. Uobe K, Masuno K, Fang YR, Li LJ, Wen YM, Ueda Y, Tanaka A. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol*. 2001;37(2):146-52.
 20. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 4):1057-62.
 21. Reboiras-López MD, Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Antúnez-López JR, Gándara-Vila P, Gayoso-Diz P, et al. Comparison of three sampling instruments, Cytobrush, Curette and OralCDx, for liquid-based cytology of the oral mucosa. *Biotech Histochem*. 2012; 87(1): 51-8. doi: 10.3109/10520295.2011.560895.
 22. Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL, Roteli-Martins C, di Loreto C, Maeda MY, Utagawa ML, Pereira SM, Polli S, Alves VA, Syrjänen K. Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis*. 2005;9(4):219-24.
 23. Antoneli CB, Ribeiro KB, Sredni ST, Arias VE, Andreoli MA, de Camargo B, Sobrinho JS, Prado JC, Soares FA, Villa LL. Low prevalence of HPV in Brazilian children with retinoblastoma. *J Med Virol*. 2011; 83(1): 115-8. doi: 10.1002/jmv.21925.

24. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K, Barten M.
Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol*. 2003; 192(3): 145-8.
25. Kristoffersen AK, Enersen M, Kverndokk E, Sunde PT, Landin M, Solheim T, Olsen I, Grinde B. Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. *J Clin Virol*. 2012; 53(4): 364-6. doi: 10.1016/j.jcv.2011.12.023.
26. Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C, Gandolfo S, Pentenero M, Carrozzo M, Serpico R, D'Angelo M. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol*. 2004; 40(8): 835-40.
27. Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, Daniel R, Shah KV, Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Nov;6(11):4171-5.
28. Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Rajasekar A, Gravitt P, Abraham P. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2010; 116(3): 447-51. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.10.081.
29. Cao H, Banh A, Kwok S, Shi X, Wu S, Krakow T, Khong B, Bavan B, Bala R, Pinsky BA, Colevas D, Pourmand N, Koong AC, Kong CS, Le QT. Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 82(3): e351-8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.05.061.

30. Jaberipour M, Samsami A, Sahraian F, Kazerooni T, Hashemi M, Ghaderi A, Habibagahi M. Elevation of HPV-18 and HPV-16 DNA in the plasma of patients with advanced cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(1):163-7
31. Ma Z, Liu L, Zhang F, Yu M, Wang K, Luo J, Liu K, Chen B, Xu L. Human papillomavirus type 16 exists in bacteria isolated from cervical cancer biopsies. *J Int Med Res.* 2009;37(4):1065-74.
32. Adamopoulou M, Vairaktaris E, Nkenke E, Avgoustidis D, Karakitsos P, Sioulas V, Nisyrios T, Yapijakis C. Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. *Gynecol Oncol.* 2013; 129(2): 395-400. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.02.015.
33. Kulkarni SS, Kulkarni SS, Vastrad PP, Kulkarni BB, Markande AR, Kadakol GS, Hiremath SV, Kaliwal S, Patil BR, Gai PB. Prevalence and distribution of high risk human papillomavirus (HPV) Types 16 and 18 in Carcinoma of cervix, saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and in the general population in Karnataka, India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12(3): 645-8.
34. Lingen MW. Can saliva-based HPV tests establish cancer risk and guide patient management? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(3): 273-4. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.06.002.
35. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol.* 2012; 6 Suppl 1: S16-24. doi: 10.1007/s12105-012-0377-0.
36. Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Lo Muzio L, De Rosa G, Bufo P. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck

- squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer*. 2011; 6: 4.
doi: 10.1186/1750-9378-6-4..
37. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004; 108(5): 766-72.
38. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS, Kittas C. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*. 2000;13(6):644-53.
39. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010; 76(1): 78-84.



Anexos

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Detecção do HPV por nPCR em leucoplasias bucais: Estudo caso-controle*", sob a responsabilidade do Pesquisador GLAUCO ISSAMU MIYAHARA, está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 27/05/2011, de acordo com o Processo FOA-01034/2011.

Araçatuba, 06 de junho de 2011¹.

ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA
Vice-Coordenadora do CEP

ANA/vdm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3234 E-mail: cep@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas da International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms>. A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Patient permission: Not required

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

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

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (pdf version or word version) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above

should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted

for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

Work on human beings that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki (Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or

services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. *Please take careful note of the maximum length where applicable.* Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be:

- focused
- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analyzing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
- Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within **3 months**; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round.

Format

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information:

- title of the article
- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references

- Should be written in the past tense
- Include exact technical specifications, quantities and generic names
- Limit the number of subheadings, and use the same in the results section
- Mention statistical method
- Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results • Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK). The minus sign should be if a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov.uk). When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476. When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220. Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, 1965: 135. Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each

figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. **The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.**

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Color images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in color in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in color will appear in color in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published

quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html>. There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor