



Rúbia da Rocha Vieira

***Detecção do HPV e EBV por nPCR
em líquen plano bucal e tecido
normal de cavidade bucal***

**ARAÇATUBA – SP
2014**

Rúbia da Rocha Vieira

***Detecção do HPV e EBV por nPCR em
líquen plano bucal e tecido normal de
cavidade bucal***

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

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara
Coorientadora: Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes

**ARAÇATUBA – SP
2014**

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V658d Vieira, Rúbia da Rocha.
Detecção do HPV e EBV por nPCR em Líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal / Rúbia da Rocha Vieira. - Araçatuba, 2014
116 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara
Coorientadora: Profa. Cárís Maroni Nunes

1. Papillomaviridae 2. Herpesvirus humano 4
3. Reação em Cadeia da Polimerase 4. Líquen plano bucal

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

NASCIMENTO: 16.10.1989 - Júlio de Castilhos/RS

FILIAÇÃO: Nilson Édi Rivarola Vieira

Vera Regina da Rocha

2007/2011 : Graduação em Odontologia – Universidade de Passo Fundo – UPF

2012/2014 : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Estomatologia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.



Dedicatória

Dedicatória

Ao meu querido pai **Domingos**, meu herói e meu exemplo de vida, que com seus sábios conselhos, amor incondicional e crença permanente em minha capacidade sempre me guiaram na busca dos meus ideais.

À minha amada mãe **Lair**, minha fortaleza, meu exemplo de superação e bondade, que mesmo quando a distância se fazia presente, conseguia me transmitir força e equilíbrio com suas palavras de carinho, amor e incentivo que sempre confortavam meu coração.

A vocês dois, anjos que Deus colocou na minha vida, que muitas vezes abdicaram dos seus sonhos em prol dos meus, que enxugaram minhas lágrimas diante de cada derrota, mas, que também vibraram comigo a cada vitória a minha eterna gratidão! Quero que saibam que se cheguei onde cheguei é porque tive em vocês o exemplo, a inspiração e a força. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu noivo **Mariano**, por todo amor, carinho, amizade e apoio transmitido a mim. Agradeço pela compreensão das minhas muitas ausências, nestes anos em que trilhava meu caminho e também por me mostrar que a confiança é a base de tudo! Obrigada por ter você ao meu lado!



***Agradecimentos
Especiais***

Agradecimentos Especiais

A Deus, por ter me agraciado com o dom da vida, que ilumina o meu caminho mesmo quando este parece incerto, que me guia e me dá força para superar com sabedoria os obstáculos da vida.

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara**, por ser um exímio profissional e um admirável ser humano. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada e por despertar ainda mais em mim o gosto pela Estomatologia, pela pesquisa e pela docência. Agradeço pela amizade construída, pela confiança depositada, pela paciência e compreensão, por todo o conhecimento transmitido e também pelas lições de vida. Foi uma honra ser sua orientada, tem para sempre a minha eterna gratidão!

A minha estimada coorientadora, **Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes**, por todo suporte oferecido, pela confiança em mim depositada e por ter me recebido afetuosamente em seu laboratório. Minha sincera gratidão!

Aos meus queridos professores e amigos, **Dr. João Paulo De Carli** e **Dra. Soluete Oliveira da Silva**, meus primeiros orientadores, que mesmo sem me conhecerem, confiaram-me meu primeiro trabalho de iniciação científica, que afloraram em mim o amor pela Estomatologia e que sempre me

incentivaram a seguir a carreira da docência. Para sempre a minha eterna admiração e gratidão!

Aos estimados professores, **Dr. Daniel Galera Bernabé e Dr. Éder Ricardo Biasoli**, por serem exemplos de seres humanos e pelo brilhantismo e dedicação como profissionais. Agradeço pela maneira acolhedora em que sempre me receberam, pelas palavras de incentivo e pelos valiosos ensinamentos.

A minhas queridas amigas, **Fernanda Alves de Carvalho, Tamires Prearo, Fernanda Martin e Natália Pompolo**, que compartilharam comigo as alegrias e tristezas do cotidiano, que se tornaram a minha “família” durante estes dois anos e tornaram o meu caminho mais fácil de ser trilhado. Obrigada pelo carinho, amizade e pela compreensão!

A minha amada amiga, **Maryelisa Vicente Gonçalves**, quem eu considero mais que uma amiga, uma irmã. Agradeço pela força, pelo incentivo que sempre me deu, pela amizade construída e por me amparar nos momentos em que mais precisei. Tenho certeza que você será uma excelente profissional e alcançará sucesso em qualquer lugar que for. Conte sempre comigo!



Agradecimientos

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da diretora **Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Wilson Roberto Poi**, pelo belíssimo trabalho que conduzem e pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Estomatologia. Agradeço pela recepção calorosa e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

À **Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata**, pela competência e por buscar constantemente a melhoria do nosso programa de pós-graduação.

Aos docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela receptividade e pelos valiosos ensinamentos.

Ao estimado, **Dr. Luiz Alberto Veronese**, que com sua vasta experiência na área da patologia, realizou a análise histopatológica das amostras presentes neste estudo.

A querida professora, ***Dra. Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld***, que com muito zelo cuidou da parte estatística deste trabalho. Obrigada pela atenção e disponibilidade dispensada a mim, fica aqui a minha eterna gratidão!

Aos discentes da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com os quais eu tive a honra de conviver durante estes dois anos e os responsáveis por eu acreditar na docência. Obrigada pelo convívio e pela experiência adquirida.

As minhas colegas de pós-graduação da área de Estomatologia, ***Lígia Lavezo Ferreira e Gláucia Resende Soares***, pela maneira afetuosa como me receberam, pelo convívio, pela amizade construída, pela constante aprendizagem e também por me introduzirem no universo da biologia molecular, que até então era desconhecido por mim. Obrigada de coração!

A todos os funcionários do Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo acolhimento, pela convivência e pelo respeito que sempre tiveram comigo. Fica aqui o meu profundo agradecimento a todos, pois, cada um de vocês foram peças indispensáveis para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, mas, especialmente à ***Marli Barbosa dos***

Santos, pelo carinho, pelas palavras amigas e por seu empenho em sempre me ajudar.

Aos **funcionários da Seção de pós-graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela presteza com que sempre me atenderam.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, pela atenção e presteza que sempre atenderam minhas solicitações.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Medicina Veterinária do Câmpus de Araçatuba - UNESP, pelos bons momentos de convívio e pelos conhecimentos e experiências partilhados, o meu muito obrigado!

A **todos os estagiários** do Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, mas em especial a **Lidiane Mendes Louzada, Maryelisa Vicente Gonçalves, João Pedro Paulino Mazzon, Bruna Mantovan, Murilo César Laurindo Bento Júnior e Jadison Junio**, pelo apoio e amizade, pela troca de experiências e por me ajudarem sempre que precisei. Agradeço de coração a cada um de vocês!

Aos pacientes envolvidos nesta pesquisa, pela participação, colaboração e principalmente pela confiança depositada em mim. A vocês, a minha lembrança, o meu eterno respeito e gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (Processo n° 2011/05499-8) o qual viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

Epígrafe

“No porto de antes, apreensivo, eu tentava imaginar as dificuldades e lutas futuras. No de agora, dono do tempo que eu conquistara, simplesmente admirava o que estava ao meu redor e desfrutava do que estava feito. Não era a sensação de uma batalha ganha, de uma luta em que os obstáculos estavam vencidos. Muito mais do que isso; era o prazer interior de ter realizado algo que tanto desejei, de ter feito e visto o que eu fiz e vi”.

(Amyr Klink)

Vieira RR. Detecção do HPV e EBV por nPCR em líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2014.

Resumo

O líquen plano caracteriza-se como uma doença inflamatória crônica mucocutânea relativamente comum na população. Possui etiologia incerta, sendo possivelmente associado a fatores genéticos, psicológicos e infecciosos, dentre os quais o último vem ocupando um maior destaque devido a uma possível correlação com o vírus do papiloma humano (HPV) e com o Epstein-Barr vírus (EBV). O HPV possui alguns tipos considerados oncogênicos associados ao câncer de colo de útero e fortemente associado ao carcinoma espinocelular (CEC) de orofaringe. O EBV pertence à família herpesvirus humano e está relacionado com o carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt e linfoma não-Hodgkin e sua possível relação com o CEC vem sendo estudada. O objetivo deste estudo foi detectar a presença do DNA do HPV e do EBV em amostras de tecido fresco, plasma sanguíneo, saliva e células esfoliadas orais, extraídas de um grupo pareado por sexo e idade de pacientes portadores de líquen plano bucal (LPB) e de um grupo de pacientes sem lesões de LPB, além de correlacionar as variáveis epidemiológicas dos grupos estudados com a presença viral e verificar se as fontes materiais testadas por este estudo são fontes viáveis para detecção do HPV e do EBV. Foram avaliados 24 pacientes portadores de LPB (Grupo caso) e 17 pacientes sem lesões de LPB (Grupo controle). A extração de DNA das amostras foi realizada após confirmar a

presença e integridade do DNA. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística (Teste exato de Fisher e Teste do Qui-Quadrado Mantel-Haenszel, ambos, com nível de significância de 5%). A nPCR foi utilizada para detecção do HPV e do EBV. Obteve-se a positividade viral para o HPV em 41,7% das amostras teciduais, em 12,5% das amostras de células esfoliadas e em nenhuma amostra de plasma sanguíneo e saliva dos pacientes do Grupo caso e em 52,9% das amostras teciduais e de saliva, 47,1% e 58,8% amostras de células esfoliadas e plasma sanguíneo, respectivamente, no Grupo controle. Encontrou-se a positividade para o EBV em 62,5% das amostras teciduais, em 70,8% das amostras de células esfoliadas e em 33,3% das amostras de plasma sanguíneo e 75% em amostras de saliva do Grupo caso e em 35,3% das amostras teciduais, 64,7% em amostras de saliva e em 82,4% e 47,1% das amostras de células esfoliadas e plasma sanguíneo, respectivamente, no Grupo controle. Houve prevalência pelo sexo feminino 83,3% no Grupo caso e 76,5% no Grupo controle. As variáveis não atróficas-erosivas foram as mais acometidas pelo EBV, ao contrário das variáveis atróficas-erosivas que foram as mais acometidas pelo HPV. Apesar da alta prevalência dos vírus estudados em algumas amostras do Grupo caso e do Grupo controle, não foi encontrada correlação entre o LPB, o HPV e o EBV, entretanto todas as fontes testadas neste estudo foram consideradas viáveis para a detecção do EBV e para o HPV (em indivíduos sem lesões de LPB).

Palavras-chave: Papillomaviridae; Herpesvirus humano 4; Reação em Cadeia da Polimerase; Líquen plano bucal.

Vieira RR. Detection of HPV and EBV by nPCR in oral lichen planus and normal tissue of oral cavity [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2014.

Abstract

Lichen planus is characterized as a chronic inflammatory mucocutaneous disease relatively common in the population. It has uncertain etiology, possibly associated with genetic, psychological and infectious factors. The infectious factor has excelled due the possible correlation of lichen planus with human papilloma virus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV). HPV has some types considered oncogenic, associated with cervical cancer and strongly associated with squamous cell carcinoma (SCC) of oropharynx. EBV belongs to human herpesvirus family and is associated with nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma and non-Hodgkin lymphoma. Its possible relation to SCC has been studied. The aim of this study was to detect the presence of the DNA of the HPV and EBV in fresh tissue samples, blood plasma, saliva and oral exfoliated cells extracted from a group of patients with oral lichen planus (OLP) paired by age and gender and from a group of patients without OLP lesions, and also correlate the epidemiological variables of the studied groups with the viral presence and verify that the source materials tested in this study are viable for HPV and EBV detection. It was evaluated 24 patients with OLP (Case group) and 17 patients without OLP lesions (Control group). DNA extraction of samples was performed after confirming the presence and integrity of DNA. The results were subjected to statistical analysis (Fisher's exact test and Mantel-Haenszel

chi-square test, both with a significance level of 5%). The nPCR was used to detect the presence of HPV and EBV. Was obtained the viral positivity for HPV in 41.7% of tissue samples and in 12.5% of exfoliated cells samples. No samples of blood plasma and saliva were positive in the Case group. On the other hand, the Control group showed a viral positivity of 52.9% in fresh tissue and saliva samples, 47.1% and 58.8% in samples of exfoliated cells and blood plasma, respectively. Was found positivity for EBV in 62.5% of tissue samples, in 70.8% of exfoliated cells samples and in 33.3% of blood plasma samples and in 75% of saliva samples from the Case group. In the Control group, this positivity was of 35,3% in tissue samples, 64.7% in saliva samples and in 82.4% and 47,1% of exfoliated cells and blood plasma samples, respectively. There was a prevalence of 83.3% for females in the Case group and of 76.5% in the Control group. Not atrophic-erosive variables were most affected by EBV, unlike the atrophic-erosive variables that were most affected by HPV. Despite the high prevalence of these viruses in some samples of the Case group and of the Control group, was not found correlation between OLP, HPV and EBV. However all sources tested in this study were considered viable for EBV and HPV detection (in individuals without OLP lesions).

Keywords: Papillomaviridae; Herpesvirus 4, Human; Polymerase Chain Reaction; Lichen planus, Oral.

Lista de Figuras

- Figura 1** – Média de idade dos pacientes do Grupo caso e do Grupo controle. **42**
- Figura 2** – Prevalência de pacientes do sexo feminino e masculino nos Grupos caso e controle. **43**
- Figura 3** – Prevalência das regiões afetadas nos grupos estudados. **43**
- Figura 4** – Resultado da amplificação da β -globina (110 pb) em amostras teciduais do Grupo caso (Foto A) e do Grupo controle (Foto B). **44**
- Figura 5** – Resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 15 amostras teciduais do Grupo caso. **45**
- Figura 6** – Resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 15 amostras teciduais do Grupo controle. **45**
- Figura 7** – Variações clínicas das lesões de LPB nos pacientes do Grupo caso. **50**
- Figura 8** – Média de idade dos pacientes do Grupo caso e do Grupo controle. **77**
- Figura 9** – Prevalência de pacientes do sexo feminino e masculino nos Grupos caso e controle. **78**

Lista de Figuras

- Figura 10** – Prevalência das regiões afetadas nos grupos estudados. **78**
- Figura 11** – Resultado da amplificação da β -globina (110 pb) em amostras teciduais do Grupo caso (Foto A) e do Grupo controle (Foto B). **79**
- Figura 12** – Resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de 12 amostras de saliva do Grupo caso. **80**
- Figura 13** – Resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de 16 amostras de saliva do Grupo controle. **80**
- Figura 14** – Variações clínicas das lesões de LPB nos pacientes do Grupo caso. **85**

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Comparação das proporções de positividade para o HPV **47**
nos Grupos caso e controle, em cada uma das fontes estudadas.
- Tabela 2** – Análise caso-controle da presença e ausência do vírus do **48**
HPV em cada fonte material.
- Tabela 3** – Relação entre o sexo dos pacientes do Grupo caso quanto **49**
à presença e ausência do vírus do HPV em amostras de tecido e
células esfoliadas.
- Tabela 4** – Relação entre as variáveis clínicas das lesões de LPB **50**
quanto à presença e ausência do vírus do HPV em amostras de tecido
e células esfoliadas.
- Tabela 5** – Análise caso-controle da presença e ausência do vírus do **81**
EBV em cada fonte material.
- Tabela 6** – Comparação das proporções de positividade para o EBV **82**
nos Grupos caso e controle, em cada uma das fontes estudadas.
- Tabela 7** – Comparação 2 a 2 quanto à presença do EBV entre as **83**
fontes materiais dos pacientes do Grupo caso.
- Tabela 8** – Relação entre o sexo dos pacientes do Grupo caso quanto **84**
à presença e ausência do vírus do EBV em cada fonte material.
- Tabela 9** – Relação entre as variáveis clínicas das lesões de LPB **85**
quanto à presença e ausência do vírus do EBV em cada fonte material.

Lista de Abreviaturas

LPB- Líquen plano bucal

HPV- do inglês Human Papillomavirus

EBV - do inglês Epstein-Barr virus

CEC - carcinoma espinocelular

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

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 Geral	26
2 Capítulo 1 Detecção do HPV por nPCR em Líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal..	29
2.1 Resumo	29
2.2 Abstract	31
2.3 Introdução.....	32
2.4 Proposição.....	34
2.5 Materiais e Métodos.....	35
2.6 Resultados.....	42
2.7 Discussão	51
2.8 Conclusão.....	55
2.9 Referências.....	56
3 Capítulo 2 Detecção do EBV por nPCR em Líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal ..	63
3.1 Resumo	63
3.2 Abstract	65
3.3 Introdução.....	66
3.4 Proposição.....	69
3.5 Material e Métodos	70
3.6 Resultados.....	77
3.7 Discussão	86
3.8 Conclusão.....	90
3.9 Referências.....	91
Anexos	96
Anexo A Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	97
Anexo B Normas para publicação no International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.....	99



Introdução Geral

1 Introdução Geral

O câncer bucal é considerado a sexta neoplasia maligna mais comum dos países desenvolvidos, representando quase 3% dos tumores malignos. O Instituto Nacional do Câncer estima que neste ano de 2014, no Brasil, ocorram 11.280 novos casos de câncer de boca em homens e 4.010 novos casos em mulheres, tornando-se a 5^a e 12^a localização primária mais incidente na população masculina e feminina, respectivamente. O tabagismo e o consumo de álcool são considerados fatores de risco para o câncer bucal. No entanto, estes fatores de risco estão ausentes em muitos casos, indicando que existem outras possibilidades etiológicas.

O líquen plano caracteriza-se por uma doença crônica de etiologia desconhecida, que afeta a pele e a mucosa oral. O líquen plano bucal (LPB) é encontrado frequentemente na população de adultos e idosos, onde as mulheres são duas vezes mais acometidas do que os homens e as crianças são raramente afetadas. Possui seis variações clínicas entre elas a forma reticular, em placa, papular, atrófica, erosiva e bolhosa, sendo a forma reticular a mais branda da doença e as variáveis erosiva e bolhosa as formas mais agressivas e sintomáticas. O diagnóstico é baseado na identificação clínica da lesão e a confirmação é realizada por meio de biópsia e análise histopatológica.

Desde 1978 a Organização Mundial de Saúde classificou o LPB como uma condição cancerizável, pois aproximadamente 2-3% dessas lesões podem se tornar malignas, entretanto, devido às controvérsias na literatura o papel do LPB na carcinogênese bucal ainda permanece indefinido.

O LPB possivelmente possui origem multifatorial, nas quais as infecções virais vem atribuindo um maior destaque devido à possível associação com a etiologia do LPB. Dentre essas infecções virais pode-se citar o vírus do herpes simples, o citomegalovírus, o vírus do herpes humano, o vírus da Hepatite C, o Epstein-Barr vírus (EBV) e o vírus do Papiloma Humano (HPV).

O EBV possui dupla fita de DNA e pertence à família herpesvirus humano. É o mais potente vírus imortalizador celular conhecido até o momento, infectando cerca de 90% da população mundial humana sem causar doença para a maioria dos indivíduos. É o agente etiológico da mononucleose infecciosa, da leucoplasia pilosa e de algumas neoplasias malignas como o carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt e linfoma não-Hodgkin.

O HPV pertence a um grupo heterogêneo de DNA vírus. São vírus não envelopados, epiteliotrópicos, de simetria icosaédrica. Possui 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 8.000 pares de bases. Atualmente mais de 150 tipos de HPV foram identificados, sendo que 24 tipos estão associados a lesões bucais dos quais os tipos 16 e 18 são considerados carcinogênicos e possivelmente estão envolvidos na etiologia de alguns carcinomas bucais.

Partindo do princípio de que muitos estudos vem buscando entender a correlação entre o LPB o HPV e o EBV e considerando que esta correlação ainda permanece inconclusiva, o objetivo do presente trabalho foi verificar a correlação entre o HPV, EBV e LPB através da detecção destes vírus nos diferentes tipos de fontes materiais (tecido fresco, plasma sanguíneo, saliva e células esfoliadas orais) de um grupo pareado por sexo e idade de portadores de LPB e de um grupo de pacientes sem lesões de LPB.



Capítulo 1

**Detecção do HPV por nPCR em
líquen plano bucal e tecido
normal de cavidade bucal**

2 Capítulo 1

Detecção do HPV por nPCR em líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal

2.1 Resumo

Este estudo teve por objetivo detectar a presença do DNA do papilomavírus humano (HPV) em diferentes fontes de materiais de um grupo pareado por sexo e idade de portadores de líquen plano bucal (LPB) e em um grupo de pacientes sem lesões de LPB e correlacionar as variáveis epidemiológicas dos grupos estudados com a presença viral. Foram coletadas amostras de tecido fresco, saliva, células esfoliadas orais e plasma de 24 pacientes portadores de LPB (Grupo caso) e de 17 pacientes sem lesões de LPB (Grupo controle). A detecção do HPV foi realizada por meio da nested PCR (nPCR). Obteve-se a positividade viral em 41,7% das amostras teciduais, em 12,5% das amostras de células esfoliadas e em nenhuma amostra de plasma sanguíneo e saliva do Grupo caso e em 52,9% das amostras teciduais e de saliva, 47,1% e 58,8% amostras de células esfoliadas e plasma sanguíneo, respectivamente, no Grupo controle. A maioria das lesões de LPB HPV-positivas eram do tipo atróficas-erosivas (53,8%). Não foi estabelecida uma correlação entre o HPV e os grupos analisados. No entanto, todas as fontes materiais testadas neste estudo foram consideradas viáveis para a detecção do HPV em indivíduos sem lesões de LPB.

Palavras-chave: Papillomaviridae; Reação em Cadeia da Polimerase; Líquen Plano Bucal.

2.2 Abstract

This study aimed to detect the presence of the DNA of the human papillomavirus (HPV) in different sources of materials of a group of patients paired by carriers of oral lichen planus (OLP) and in a group of patients without OLP lesions and correlate the epidemiological variables of studied groups with the viral presence. Fresh tissue samples, saliva, oral exfoliated cells and plasma were collected from 24 patients carriers of OLP (Case group) and from 17 patients without OLP lesions (Control group). HPV detection was performed by nested PCR (nPCR). In the case group, was obtained viral positivity in 41.7% of tissue samples and in 12.5% of exfoliated cells samples. No samples of plasma and saliva of the Case group were positive. Whereas, in the control group, this positivity was of 52.9% in tissue and saliva samples, 47,1% and 58.8% in exfoliated cells and plasma samples, respectively. The majority of HPV-positive lesions of OLP were the atrophic-erosive type (53.8%). Has not been established a correlation between the HPV and the groups analyzed. However, all tested material sources in this study were considered viable for HPV detection in patients without OLP lesions.

Keywords: Papillomaviridae; Polymerase Chain Reaction; Lichen planus, Oral.

2.3 Introdução*

O líquen plano consiste em uma doença crônica, mucocutânea, de etiologia incerta¹, sendo caracterizada por uma resposta imune crônica, mediada por células T e um ciclo de queratinização epitelial anormal^{2,3}. Afeta aproximadamente 2-3% da população⁴ adulta e idosa, sendo que as mulheres são duas vezes mais acometidas do que os homens e as crianças são raramente afetadas⁵.

O líquen plano bucal (LPB) é clinicamente dividido em seis variações: reticular, papular, tipo placa, erosivo, atrófico e bolhoso⁶ e possui origem multifatorial, possivelmente sendo induzido por fatores psicológicos, agentes infecciosos, geralmente idiopáticos⁷. Infecções virais também têm sido associadas com a etiologia do LPB: Vírus do herpes simples (HSV-1), citomegalovírus (CMV), vírus do herpes humano (HHV-6) e (HHV-7)⁷, vírus da Hepatite C (HCV)⁸, Epstein-Barr vírus (EBV) e o papilomavírus humano (HPV)⁹.

Desde 1978 a Organização Mundial da Saúde classificou o LP como uma condição cancerizável¹⁰, sendo que a taxa de transformação maligna varia entre 0,4-5,3%¹¹. Por outro lado, uma revisão sistemática da literatura publicada recentemente mostrou que de 7,806 pacientes portadores de LPB apenas 85 desenvolveram o carcinoma bucal¹², mostrando que o papel do LPB na carcinogênese bucal ainda permanece controverso.

O HPV é um membro da família Papillomaviridae, gênero *Papilomavírus*,

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

os quais são vírus não envelopados, epiteliotrópicos, de simetria icosaédrica, com genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases¹³.

Atualmente mais de 150 tipos diferentes de HPV são reconhecidos, podendo ser divididos nos de "alto risco" pertencendo a esse Grupo os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70; e de "baixo risco", sendo que os mais conhecidos são o HPV 6, 11, 42, 43 e 44^{14,15}.

Levando-se em consideração a possível associação entre o HPV e o LPB, Syrjänen et al.¹⁶ realizaram uma revisão sistemática de literatura utilizando um total de 1.121 publicações, onde 39 foram incluídas. Como resultado, o HPV foi associado ao LPB. Entretanto, Gorsky & Epstein⁴ também realizaram uma revisão de literatura de casos publicados nos últimos 15 anos, na qual discutiram sobre a ligação entre o HPV e o risco de transformação maligna do LPB e concluíram que a epidemiologia do carcinoma bucal proveniente do LPB não está bem definida e que mais estudos devem avaliar o papel potencial do HPV em um subconjunto de lesões de LPB e em lesões que evoluem para o câncer bucal.

Em relação ao percentual de detecção do HPV em amostras teciduais dos indivíduos sem LPB as taxas variaram de 0% até 7,1%^{9,17,18}. Entretanto, em amostras de células esfoliadas estas variaram entre 4,2- 81,1%¹⁹⁻²¹. Quanto à detecção do HPV em saliva e plasma de pacientes saudáveis, estudos realizados por Turner et al.²² e por Seung et al.²³ encontraram taxas de 2,6% e 1,7%, na saliva e no plasma respectivamente.

2.4 Proposição

Considerando que ainda não existe uma correlação estabelecida entre o HPV e o LPB, o objetivo do presente estudo foi verificar a correlação entre o referido vírus e a enfermidade através da detecção viral em diferentes tipos de fontes materiais (tecido fresco, plasma sanguíneo, saliva e células esfoliadas orais) de um grupo pareado por sexo e idade de pacientes portadores de LPB e de um grupo de pacientes sem lesões de LPB. Outros objetivos deste trabalho foram também verificar se as fontes materiais testadas neste estudo podem ser consideradas viáveis para a detecção do HPV e correlacionar os dados epidemiológicos dos grupos estudados com a presença viral.

2.5 Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (FOA-UNESP) através da Plataforma Brasil (CAAE: 03069012.8.0000.5420) (**ANEXO A**). Todos os pacientes pertencentes a esta pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de seleção

Como se tratou de um estudo do tipo caso-controle com grupos pareados, foi necessário que todos os pacientes de um grupo possuíssem o mesmo sexo e tivessem a mesma idade ou com no máximo até 3 anos de diferença comparados aos indivíduos do outro grupo. A partir disto, foram selecionados e incluídos neste estudo 24 pacientes com diagnóstico histopatológico de LPB realizado por um mesmo patologista (Grupo caso) e 17 pacientes sem suspeita de LPB que necessitavam de cunha distal ou cirurgia pré-protética como modalidade de tratamento (Grupo controle), ambos atendidos pela disciplina de Estomatologia da FOA-UNESP, São Paulo, Brasil.

Coleta de dados e materiais:

- *Tecido*

Os pacientes de ambos os grupos foram submetidos a biópsias com finalidade diagnóstico/tratamento e o material obtido foi dividido em duas

partes, uma parte foi armazenada em *freezer* -80° C para posteriores exames biomoleculares e a outra parte foi conservada em formol tamponado a 10% para análise histopatológica.

Para a realização do exame histopatológico, o espécime fixado em formol 10% foi clivado e acondicionado em cassetes histológicos para processamento (desidratação, clarificação e impregnação) e inclusão em parafina. Após, procedeu-se a microtomia e posteriormente, a coloração pelo método HE (hematoxilina e eosina).

Todas as biópsias realizadas neste estudo tiveram o diagnóstico histopatológico realizado por um mesmo patologista e todos os pacientes pertencentes ao Grupo caso, possuíam o diagnóstico histopatológico de LPB.

- *Saliva*

Para a coleta de saliva os pacientes foram orientados previamente a não consumirem nenhuma bebida ou comida até 30 minutos antes do procedimento de coleta. Solicitou-se aos pacientes que os mesmos eliminassem a saliva em um tubo de 15 mL do tipo Falcon pelo período de 10 minutos, a fim de se obter no mínimo 5 mL de saliva. As amostras foram distribuídas em tubos de polipropileno de 2 mL, após, foram identificadas e armazenadas em *freezer* -80°C.

- Células Esfoliadas

As mesmas orientações quanto à coleta de saliva foram dadas aos pacientes para coleta celular. A coleta foi realizada com auxílio de um *citobrush* onde este foi firmemente pressionado e rodado de 5 a 10 vezes na lesão (Grupo caso) e na região normal (Grupo controle). Após, este foi depositado em um tubo de polipropileno de 2 mL contendo 300 µL de água Mili-Q ou TE, identificado e armazenado a -80° C .

- Plasma Sanguíneo

Foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente pela equipe da enfermagem Centro de Oncologia Bucal da FOA-UNESP. O material coletado foi depositado em um tubo do tipo Falcon de 50 mL contendo 0,2 mL de EDTA Trissódico a 10%. Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado para obtenção do plasma e as amostras foram distribuídas em tubos de polipropileno de 2 mL, identificadas e armazenadas a -80° C.

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 todos os materiais foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis) para confirmar a presença e integridade do DNA.

PCR para gene humano controle

Para a realização do PCR para o gene controle da β -globina foram utilizados os oligonucleotídeos PCO3 e PCO4 com 110 pares de base (pb)²⁴. A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100; Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Waltham, EUA) onde se adicionou ao DNA um *mix* contendo 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 um 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 foi utilizado uma amostra de sangue previamente testada e como controle negativo uma amostra contendo somente o *mix* de componentes usado para amplificação do DNA.

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 as amostras de tecido e plasma, a temperatura de anelamento foi alterada para

53°C e 50°C, respectivamente.

Para verificação da presença do DNA humano foi feita uma análise através 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 das bandas após coloração com brometo de etídeo foi realizada sob luz ultravioleta e a documentação fotográfica com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Confirmando a presença e integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa dos genes do HPV.

nPCR para amplificação do HPV

Na primeira etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores MY11 (5'-GCMCAGGGWCTATAAYAATGG-3') e MY09 (5'-CTCCMARRGGAWACTGA TC-3') da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, para amplificar fragmentos da região tardia L1 do genoma viral, com 450 pares de bases²⁵.

Os componentes do *mix* utilizados 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 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 somente pelo *mix* de componentes usados para amplificação do DNA. Os fragmentos foram amplificados em um termociclador sob 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.

Na segunda etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5' TTTGTTACTGTGGTAGATAC YAC-3') e GP6+ (5'-AAAATAAACTTGTA AAA TCATATTC-3') da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, cujo fragmento é de 150 pares de bases²⁶. 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 a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 2,5 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Forma de análise dos resultados

Os dados obtidos de cada grupo foram analisados com o software EPI INFO™ 7 versão 7.1.3.0 (Centers for Disease Control and Prevention, EUA) e Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, EUA). O Teste T foi aplicado para

averiguar se as idades dos grupos estudados não diferiam estatisticamente. Entretanto, para verificar a correlação entre os dois grupos estudados quanto ao *status* do HPV em cada fonte material, foram aplicados o Teste do Qui-Quadrado - Mantel-Haenszel e o Teste exato de Fisher em nível de significância de 5%.

2.6 Resultados

Para a realização deste estudo foram recrutados 24 pacientes para o Grupo caso (com presença de LPB) com idades entre 43 a 72 anos (média de 56,25 e desvio-padrão de 7,81) e 17 pacientes para o Grupo controle (sem a presença de LPB) com idades entre 42 a 69 anos (média de 57,59 e desvio padrão de 9,12) ambos os grupos, pareados por sexo e por idade, com diferença de até 3 anos (**Figura 1**). Não houve diferença estatisticamente significativa em nível de 5% entre as idades dos grupos estudados ($p=0,6171$).

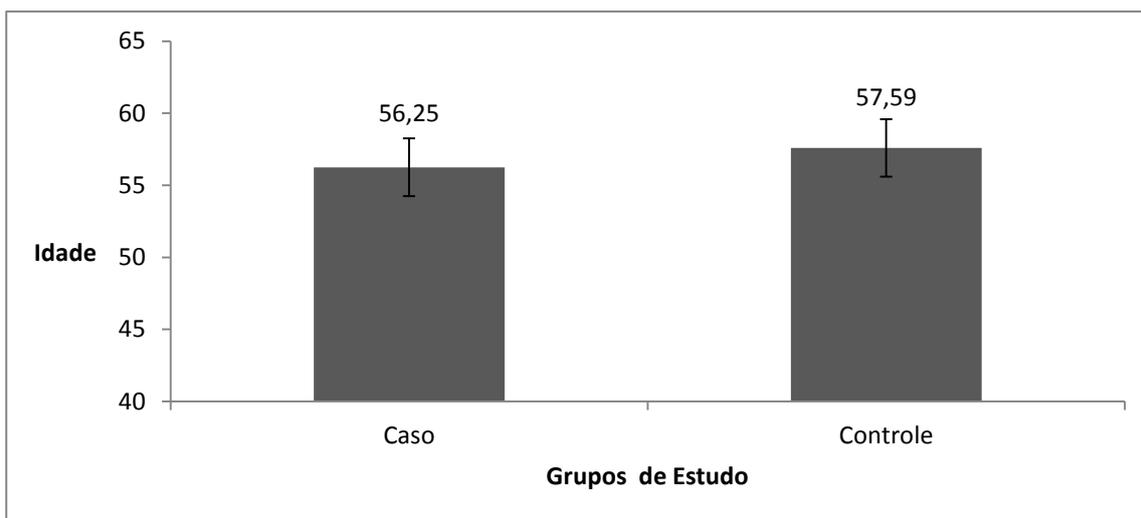


Figura 1 – Média de idade dos pacientes do Grupo caso e do Grupo controle

A maioria dos pacientes era do sexo feminino em ambos os grupos (83,3% no Grupo caso e 76,5% no Grupo controle), como representado na **Figura 2**.

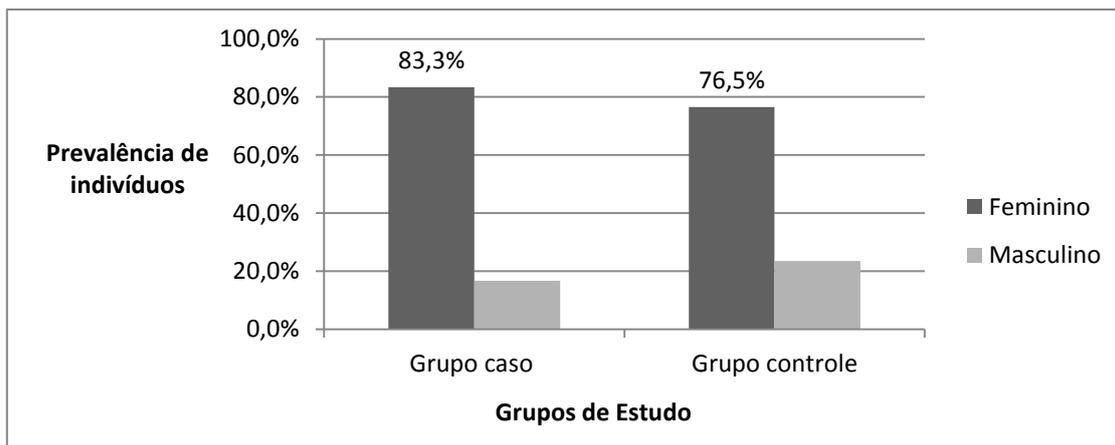


Figura 2 – Prevalência de pacientes do sexo feminino e masculino nos Grupos caso e controle

As localizações anatômicas mais acometidas pelas lesões de LPB no Grupo caso foram a mucosa jugal (83,3%), seguida de borda de língua (12,5%) e dorso de língua (4,2%). Porém, no Grupo controle as regiões mais afetadas pelos indivíduos do Grupo controle foram a região de rebordo alveolar (52,9%), mucosa jugal (23,5%), dorso de língua (17,7%) e borda de língua (5,9%) (Figura 3).

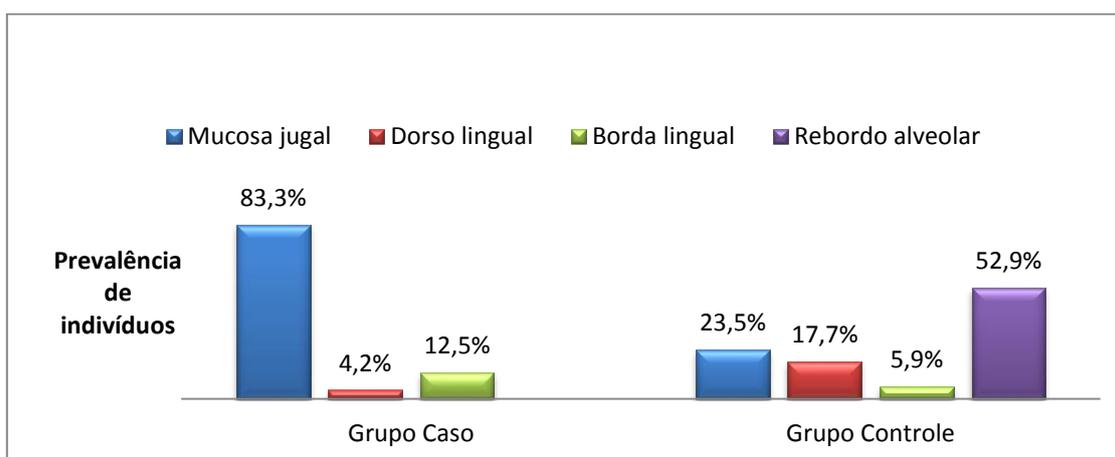


Figura 3 – Prevalência das regiões afetadas nos grupos estudados

As amostras de tecido, saliva, células esfoliadas orais e plasma sanguíneo dos pacientes do Grupo caso e do Grupo controle foram extraídas e testadas para o gene controle da β -globina humana, confirmando a presença e a integridade do DNA (**Figura 4**).

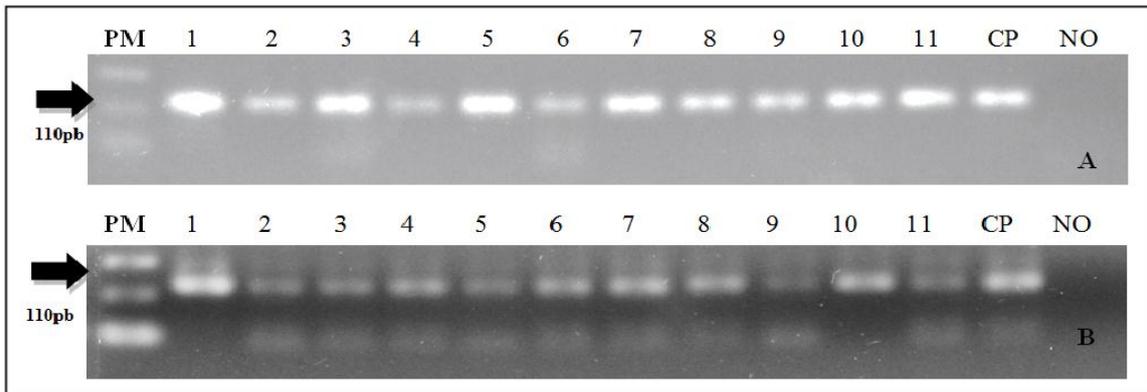


Figura 4 – Resultado da amplificação da β -globina (110 pb) em amostras teciduais do Grupo caso (Foto A) e do Grupo controle (Foto B)

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA de sangue humano previamente testado); NO = controle negativo (sem DNA)

Após, procedeu-se à detecção do HPV por nPCR em amostras do Grupo caso e do Grupo controle (**Figuras 5 e 6**).

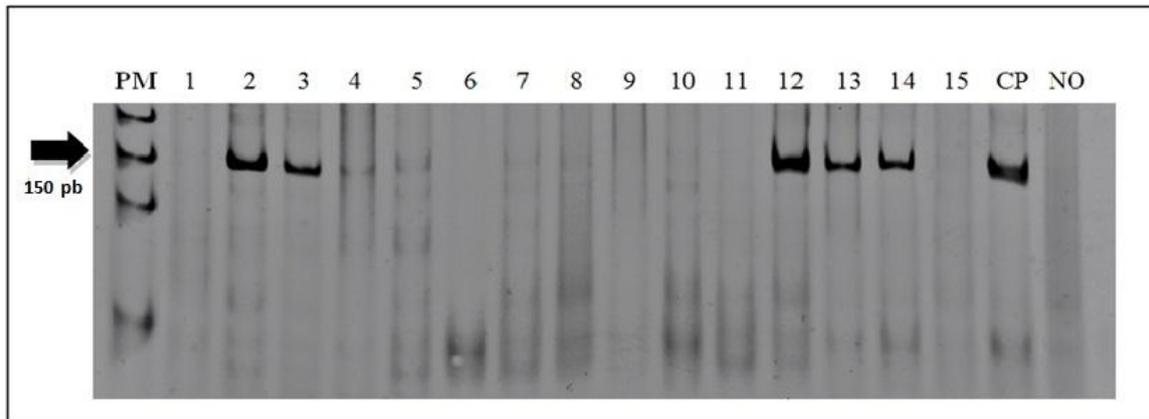


Figura 5 – Resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 15 amostras teciduais do Grupo caso

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de HeLa); NO = controle negativo (sem DNA)

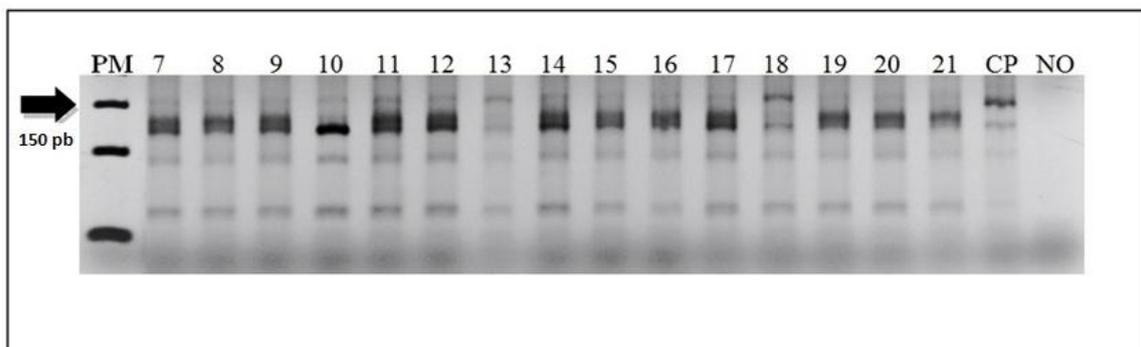


Figura 6 – Resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 15 amostras teciduais do Grupo controle

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de HeLa); NO = controle negativo (sem DNA).

Obeve-se a positividade para o HPV em 10 (41,7%) das amostras teciduais, em 03 (12,5%) das amostras de células esfoliadas e em nenhuma amostra de plasma sanguíneo e saliva dos 24 pacientes do Grupo caso. No Grupo controle, obteve-se a positividade viral em 09 (52,9%) das amostras teciduais, 09 (52,9%) das amostras de saliva, 08 (47,1%) e 10 (58,8%) das amostras de células esfoliadas e plasma sanguíneo, respectivamente, dos 17 pacientes do Grupo controle.

Ocorreu concomitância da presença viral em 12,5% das amostras de tecido e células esfoliadas do Grupo caso. Porém no Grupo controle houve concomitância nas amostras de tecido e saliva (5,9%), tecido e células esfoliadas (11,8%), tecido e plasma (5,9%), saliva e células esfoliadas (5,9%), saliva e plasma (11,8%), células esfoliadas e plasma (11,8%), saliva, células esfoliadas e plasma (5,9%), tecido, saliva e plasma (11,8%), tecido, células esfoliadas e plasma (5,9%), tecido, saliva e células esfoliadas (5,9%). Apenas em uma amostra de tecido, saliva e de plasma não houve concomitância com outra(s) fonte(s) material(is).

Na análise da positividade do HPV entre as diferentes fontes materiais nos portadores de LPB encontrou-se um valor significativo apenas para as variáveis tecido *versus* células esfoliadas ($p= 0,0082$). Entretanto, o teste de proporção encontrou diferenças estatisticamente significativas para as amostras de saliva, células esfoliadas e plasma sanguíneo quanto à positividade viral nos grupos estudados (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Comparação das proporções de positividade para o HPV nos Grupos caso e controle, em cada uma das fontes estudadas

FONTES	GRUPOCASO	GRUPOCONTROLE	P* valor
<i>Tecido</i>	41,67	52,94	0,7317
<i>Saliva</i>	0,00	52,94	0,0008*
<i>Células esfoliadas</i>	12,50	47,06	0,04*
<i>Plasma</i>	0,00	58,82	<0,0001*

*Significativo a nível de 5%

Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos quanto à presença e ausência do HPV nas amostras de saliva ($p < 0,0001$), células esfoliadas ($p = 0,0178$) e plasma sanguíneo ($p < 0,0001$). Entretanto, nas amostras teciduais essa relação não foi significativo ($p = 0,4811$) como descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Análise caso-controle da presença e ausência do vírus do HPV em cada fonte material

Tipo de amostra	GRUPO CASO (n=24)			GRUPO CONTROLE (n=17)			p valor
	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	10 (41,7)	14 (58,3)	24 (100)	9 (52,9)	8 (47,1)	17 (100)	0,4811(1)
<i>Saliva</i>	0 (0)	24 (100)	24 (100)	9 (52,9)	8 (47,1)	17 (100)	<0,0001*(2)
<i>Células Esfoliadas</i>	3 (12,5)	21 (87,5)	24 (100)	8 (47,1)	9 (52,9)	17 (100)	0,0178*(2)
<i>Plasma Sanguíneo</i>	0 (0)	24 (100)	24 (100)	10 (58,8)	7 (41,2)	17 (100)	<0,0001*(2)

*Estatisticamente significativo a nível de 5%.

(1) Teste do Qui-Quadrado - Mantel-Haenszel / (2) Teste exato de Fisher.

Notou-se que o sexo feminino foi o mais prevalente no presente estudo, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao sexo dos pacientes quanto ao *status* do HPV em amostras de tecido e células esfoliadas do Grupo caso (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Relação entre o sexo dos pacientes do Grupo caso quanto à presença e ausência do vírus do HPV em amostras de tecido e células esfoliadas

Tipo de amostra	SEXO FEMININO			SEXO MASCULINO			p valor
	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	8 (40)	12 (60)	20 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	0,5632
<i>Células Esfoliadas</i>	3 (15)	17 (85)	20 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)	0,5632

Teste Exato de Fisher (nível de significância de 5%)

Quanto às variações clínicas das lesões de LPB encontradas no Grupo caso, estas, foram classificadas em dois grupos: (1) lesões atróficas-erosivas; incluindo as variáveis do tipo atrófica, erosiva, bolhosa e mistas (2) lesões não atróficas-erosivas; incluindo lesões do tipo reticular, em placa e mistas. O segundo grupo foi o mais prevalente (54,2%) no presente estudo (**Figura 7**), já em relação ao *status* do HPV entre as variáveis do LPB não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 4**).

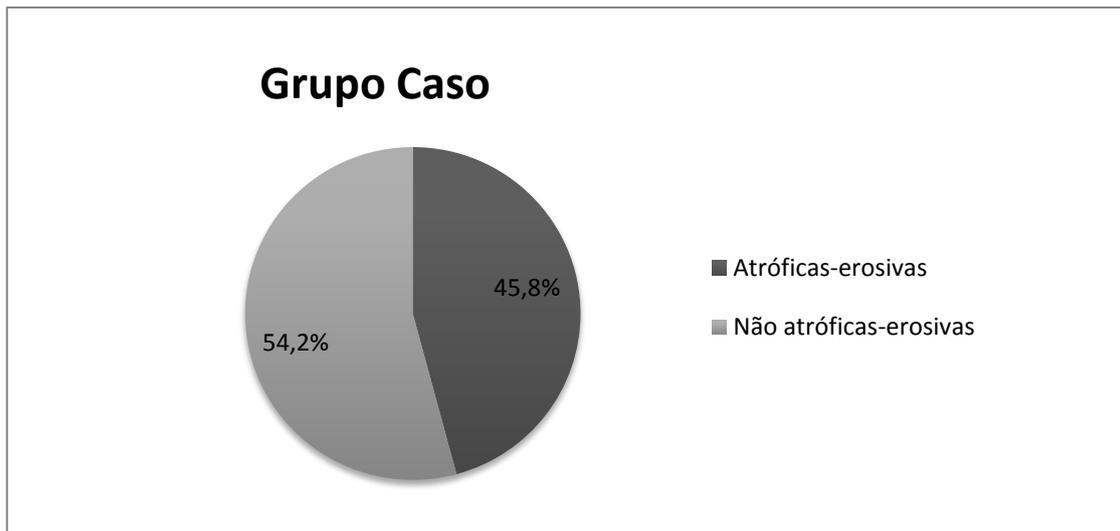


Figura 7 – Variações clínicas das lesões de LPB nos pacientes do Grupo caso

Tabela 4 – Relação entre as variáveis clínicas das lesões de LPB quanto à presença e ausência do vírus do HPV em amostras de tecido e células esfoliadas

Tipo de amostra	VARIÁVEIS AE			VARIÁVEIS NÃO-AE			p valor
	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	HPV+ (%)	HPV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	6 (54,5)	5 (45,5)	11 (100)	4 (30,8)	9 (69,2)	13 (100)	0,2235
<i>Células Esfoliadas</i>	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100)	2 (15,4)	11 (84,6)	13 (100)	0,5652

Teste Exato de Fisher (nível de significância de 5%)

2.7 Discussão

Explorar melhor a correlação entre o HPV e o LPB tem sido o foco de muitos estudos epidemiológicos ao longo dos anos. No entanto, devido à discrepância entre as taxas de detecção viral encontradas na literatura esta relação ainda permanece inconclusiva. De acordo com levantamento na base de dados da PUBMED, este é o primeiro estudo caso-controle que envolve a detecção do HPV em amostras pareadas de LPB e tecido normal de cavidade bucal, utilizando as principais fontes materiais conhecidas para detecção do HPV e empregando a nPCR, um método sensível e eficaz, capaz de detectar uma cópia viral por 10^6 - 10^7 células²⁷.

Acredita-se que o tipo de fonte material utilizada e a sensibilidade da metodologia empregada são fatores que podem interferir na variação dos resultados encontrados.

Comprovou-se que estas variáveis influenciam muito nas taxas de detecção do HPV, e isto foi devidamente observado pela discrepância entre resultados encontrados neste estudo. Em amostras teciduais do Grupo caso, a detecção do HPV foi de 41,7%, entretanto no Grupo controle esta taxa surpreendentemente aumentou para 52,9% superando as taxas encontradas por Oflatharta et al.⁹, os quais realizaram um estudo em 38 casos de LPB e em 20 amostras de tecido normal por meio da PCR. Como resultado foi detectado o genoma do HPV em 26,3% dos casos de LPB e em 0% do tecido normal. Em contrapartida, Arirachakaran et al.²⁸ avaliaram 37 amostras de tecido fresco de pacientes com LPB e também avaliaram amostras de células esfoliadas de um Grupo controle através da PCR. Nenhuma amostra controle e

apenas uma amostra de LPB (2,7%) estava infectada pelo HPV. Yildirim et al.²⁹ avaliaram a prevalência do HPV em 65 amostras teciduais de LPB e 15 amostras controle por meio da imunohistoquímica. O HPV foi encontrado em 21% dos casos de LPB e em nenhuma amostra do Grupo controle.

Notou-se uma disparidade também entre as taxas encontradas por estudos de diferentes continentes em amostras teciduais. Estudos realizados no continente Asiático encontraram positividade para o HPV no LPB em 31% das amostras teciduais examinadas¹⁸. Já no continente Europeu esta taxa variou de 15,9% a 65%^{30,31}. Em um estudo realizado na América do Norte não foi encontrada correlação entre o HPV e o LPB³², porém na América do Sul a taxa de detecção viral foi de 50%³³.

Não foi encontrada diferença estaticamente significativa entre as amostras teciduais dos grupos estudados e a presença do vírus. Entretanto, acredita-se que a alta prevalência do HPV nestas amostras se deve ao fato da utilização de tecido fresco, uma vez que a fixação em formalina, em amostras teciduais parafinadas, pode acarretar na degradação do DNA, tornando mais difícil a detecção do vírus.

Quanto à detecção viral em células esfoliadas, encontrou-se a positividade para o HPV em 12,5% das amostras, valor inferior aos encontrados por Campisi et al.²⁰, Giovannelli et al.³⁴, e Szarka et al.¹⁹, com taxas de 19,7%, 24,5% e 32,8%, respectivamente. No Grupo controle a taxa de detecção foi de 47,1%, valor superior comparado a estudo realizado por Szarka et al.¹⁹ (4,2%) e inferior à pesquisa realizada por Terai et al.²¹, com 81,1% de positividade.

Notou-se uma diferença significativa quanto ao *status* do HPV nas amostras de células esfoliadas entre os grupos estudados. Encontrou-se também, um valor significativo quanto ao *status* do HPV para a variável tecido *versus* células esfoliadas dos pacientes portadores de LPB, sugerindo uma afinidade do HPV pelo epitélio. No entanto, uma prevalência maior do HPV em amostras teciduais comparada às células esfoliadas ocorre devido ao espécime da biópsia ser uma amostra mais representativa, além de incluir células da camada basal, onde o vírus pode estar presente³⁵.

Nas amostras de saliva e de plasma do Grupo caso não foi detectada positividade para o HPV. Em contrapartida, no Grupo controle, a prevalência viral foi de 52,9% na saliva e 58,8% no plasma, valores superiores a outros estudos^{22,36}.

Não foram encontrados na literatura estudos que relatem a presença do HPV em amostras de saliva e plasma de pacientes portadores de LPB. No entanto, esperávamos encontrar o DNA do vírus nestas amostras, pois existem estudos realizados com outras lesões mostrando que estas são fontes realmente viáveis para a detecção do HPV^{36,37}. Por outro lado, pensou-se em alguma hipótese que talvez, pudesse explicar a baixa taxa viral encontrada nestas amostras, como por exemplo, a baixa carga viral decorrente do uso destas fontes materiais³⁸. Entretanto, esta explicação não pôde ser considerada plausível e aplicável, visto que as amostras de plasma e saliva do Grupo caso foram coletadas e processadas empregando a mesma metodologia das amostras do Grupo controle.

Quanto à presença do HPV em amostras de tecido e células esfoliadas e à ausência deste em amostras de plasma e saliva do Grupo caso sugere que

talvez o vírus não se encontre em sua forma ativa, portanto, ainda não se despreendeu das células infectadas para atingir a saliva e a corrente sanguínea.

Verificou-se também, que houve predominância do HPV nas amostras de plasma do Grupo controle. Por outro lado, notou-se que poucos pacientes tiveram a presença do vírus concomitantemente no tecido e no plasma e no tecido e na saliva, sugerindo que os indivíduos do Grupo controle estavam apenas contaminados pelo vírus do HPV.

Quanto ao sexo dos indivíduos do Grupo caso, este seguiu a característica clássica de pacientes com líquen plano (predominância pelo sexo feminino), característica compatível com outros estudos^{19,29}. Já em relação às variações clínicas do LPB e à positividade para o HPV obteve-se a prevalência por lesões do tipo atróficas-erosivas (53,8%) resultado superior ao encontrado por Szarka et al.¹⁹ (42,6%), Campisi et al.²⁰ (20,4%) e Mattila et al.³⁰ (15,9%) e conflitante com estudo realizado por Yildirim et al.²⁹ o qual encontrou a prevalência do HPV em lesões do tipo não atróficas-erosivas.

2.8 Conclusão

Pôde-se observar que as taxas de detecção do HPV variam muito de acordo com a fonte material empregada. Entretanto, todas as fontes testadas neste estudo foram consideradas viáveis para a detecção do HPV, em indivíduos sem lesões de LPB.

Conclui-se que houve uma alta prevalência da detecção do HPV em algumas fontes materiais de ambos os grupos analisados. Entretanto, não houve uma correlação estabelecida entre o HPV e os Grupos estudados. Também não foi encontrada uma correlação entre os dados epidemiológicos dos grupos estudados com a presença do HPV.

2.9 Referências

- 1- Bogdán S, Németh Z. The characteristics of oral lichen planus. *Fogorv Sz* 2012; 105: 35-42.
- 2- Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 46: 15–21.
- 3- Lavanya N, Jayanthi P, Rao UK, Ranganathan K. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011; 15: 127-32.
- 4- Gorsky M, Epstein JB. Oral lichen planus: malignant transformation and human papilloma virus: a review of potential clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111: 461-4.
- 5- Anuradha CH, Reddy GS, Nandan SR, Kumar SR, Reddy BV. Oral mucosal lichen planus in nine-year-old child. *N Y State Dent J* 2011; 77: 28-30.
- 6- 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.
- 7- Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 40-51.
- 8- Micó-Llorens JM, Delgado-Molina E, Baliellas-Comellas C, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Association between B and/or C chronic viral hepatitis and oral lichen planus. *Med Oral* 2004; 9: 183-90.

- 9- Oflatharta C, Flint SR, Toner M, Butler D, Mabruk MJ. Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpesviruses, and the human papillomaviruses. *Mol Diagn* 2003; 7: 73-83.
- 10-El Naggar AK, Reichart PA. Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions In: Barnes I, Eveson, JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and genetics head and neck tumours*. Lion: IARC Press, 180-1, 2005. (World Health Organization Classification of Tambours).
- 11-Shi P, Liu W, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Podoplanin and ABCG2: malignant transformation risk markers for oral lichen planus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 844-9.
- 12-Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2014; 145: 45-56
- 13-Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 23958-64.
- 14-Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–50.
- 15-de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
- 16-Syrjänen S. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 2011;17: 58-72.

- 17-Sand L, Jalouli, J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res* 2000; 20: 1183-8.
- 18-Razavi SM, Ghalayani P, Salehi MR, Attarzadeh H, Shahmoradi M. Human papilloma virus as a possible factor in the pathogenesis of oral lichen planus. *Dent Res J (Isfahan)* 2009; 6: 82-6.
- 19-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: 314-8.
- 20-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: 705-11.
- 21-Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 201-5.
- 22-Turner DO, Williams-Cocks SJ, Bullen R, Catmull J, Falk J, Martin D, Mauer J, Barber AE, Wang RC, Gerstenberger SL, Kingsley K. High-risk human papillomavirus (HPV) screening and detection in healthy patient saliva samples: a pilot study. *BMC Oral Health* 2011;11: 28.
- 23-Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA, Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the

plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Jan; 11; 3-6.

24-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: 219-24.

25-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: 146-52.

26-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: 1057-62.

27-Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 201-5.

28-Arirachakaran P, Chansaengroj J, Lurchachaiwong W, Kanjanabud P, Thongprasom K, Poovorawan Y. Oral lichen planus in thai patients has a low prevalence of human papillomavirus. *ISRN Dent* 2013; 2013: 362750

- 29-Yildirim B, Sengüven B, Demir C. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papillomaviruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 170-4.
- 30-Mattila R, Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions. *Oral Oncol* 2012; 48: 980-4.
- 31-Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K. Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 273-7.
- 32-Miller CS, White DK, Royse DD. In situ hybridization analysis of human papillomavirus in orofacial lesions using a consensus biotinylated probe. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 256-9.
- 33-Gonzalez JV, Gutierrez RA, Keszler A, Colacino Mdel C, Alonio LV, Teyssie AR, Picconi MA. Human papillomavirus in oral lesions. *Medicina* 2007; 67: 363-68.
- 34-Giovannelli L, Campisi G, Colella G, Capra G, Di Liberto C, Caleca MP, Matranga D, D'Angelo M, Lo Muzio L, Ammatuna P. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 49-55.
- 35-Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362-72.
- 36-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: e351-8.

37-Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, Koch W, Jiang W, Sidransky D, Califano J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;117: 605-10.

38-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.



Capítulo 2

**Detecção do EBV por nPCR em
líquen plano bucal e tecido
normal de cavidade bucal**

3 Capítulo 2

Detecção do EBV por nPCR em líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal

3.1 Resumo

Este estudo teve por objetivo detectar a presença do DNA do Epstein-Barr vírus (EBV) em diferentes fontes de materiais de um grupo pareado de pacientes portadores de líquen plano bucal (LPB) e um grupo de indivíduos sem lesões de LPB e correlacionar a presença viral com as variáveis epidemiológicas dos grupos estudados. Foram coletadas amostras de tecido fresco, saliva, células esfoliadas e plasma de 24 pacientes com lesões de LPB (Grupo caso) e de 17 pacientes sem lesões de LPB (Grupo controle). A detecção do EBV foi realizada por meio da nPCR. Obteve-se a positividade viral em 62,5% das amostras teciduais, em 70,8% das amostras de células esfoliadas e em 33,3% das amostras de plasma sanguíneo e 75% em amostras de saliva do Grupo caso e em 35,3% das amostras teciduais, 64,7% em amostras de saliva e em 82,4% e 47,1% das amostras de células esfoliadas e plasma sanguíneo, respectivamente, no Grupo controle. Houve prevalência pelo sexo feminino em ambos os grupos. As variáveis não atróficas-erosivas foram as mais acometidas pelo EBV. Não foi encontrada relação entre o EBV e o LPB, no entanto, todas as fontes testadas neste estudo foram consideradas viáveis para a detecção deste vírus.

PALAVRAS-CHAVE: Herpesvirus humano 4; Líquen Plano Bucal; Reação em Cadeia da Polimerase.

3.2 Abstract

This study aimed to detect the presence of the Epstein-Barr virus (EBV) DNA in different sources of materials from a paired group of patients with oral lichen planus (OLP) (Case group) and from a group without OLP lesions (Control group) and correlate the viral presence with the epidemiological variables of the studied groups. Samples of fresh tissue, saliva, exfoliated cells and blood plasma were collected from 24 patients of the case group and from 17 patients of the control group. EBV detection was performed using nPCR. In the case group, we obtained viral positivity in 62,5% of fresh tissue samples, in 70,8% of oral exfoliated cells samples, in 33,3% of blood plasma samples and in 75% of saliva samples. In the control group, this positivity was of 35,3% in fresh tissue samples, 64,7% in saliva samples and in 82,3% and 47,1% of exfoliated cells and blood plasma samples, respectively. There was a prevalence for females in both groups. The atrophic-erosive variables were most affected by EBV. We did not found a relation between EBV and OLP, however, all tested sources in this study were viable for this virus detection.

Keywords: Herpesvirus 4, Human; Lichen planus, Oral; Polimerase Chain Reaction.

3.3 Introdução*

O líquen plano bucal (LPB) consiste em uma doença autoimune crônica inflamatória¹, que acomete em torno de 2% a 3%² da população sendo que as mulheres de meia-idade são as mais afetadas³. Apesar de sua etiologia ser incerta, acredita-se que um processo multifatorial possa estar envolvido, com a participação de fatores genéticos, psicológicos e infecciosos⁴, os quais fazem parte deste último Grupo vírus da Hepatite C⁵, o vírus do Herpes Simples (tipo 1), Virus do Herpes Humano (tipo 6)^{6,7}, Papilomavírus humano (HPV) e o Epstein-Barr Vírus (EBV)⁸. Clinicamente, o LPB apresenta seis variações, entre elas o tipo reticular, em placa, papular, atrófico, erosivo e bolhoso⁹. O diagnóstico é dado, primeiramente, por meio da aparência clínica da lesão e é confirmado posteriormente por meio de biópsia e análise histopatológica do espécime¹⁰ a qual se apresenta com degeneração hidrópica da camada basal e infiltrado linfocitário em banda subepitelial¹¹.

O tratamento geralmente consiste no uso de esteróides tópicos, corticóides sistêmicos e imunossupressores¹².

O EBV pertence à família Herpesviridae e subfamília *gammaherpesviridae*. Possui dupla fita de DNA contido em um nucleocapsídeo icosaédrico que possui 162 capsômeros e abriga um genoma viral de DNA de aproximadamente 172 mil pares de bases (pb)^{13,14}.

Até o momento, o EBV é conhecido como o mais potente vírus imortalizador celular, infectando aproximadamente 90% da população adulta de maneira assintomática^{15,16}, sendo responsável pelo desenvolvimento da

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

mononucleose infecciosa, além de ser o agente etiológico da leucoplasia pilosa e de algumas neoplasias malignas como o linfoma de Burkitt, linfoma não-Hodgkin e o carcinoma nasofaríngeo¹⁷. Possui dois subtipos, o tipo 1 o qual acomete principalmente as populações asiáticas e caucasianas e o tipo 2 que é encontrado mais frequentemente na população Africana¹⁸. Sua transmissão se dá principalmente pelo contato oral na fase aguda da doença, atingindo primeiramente as células epiteliais da orofaringe e das glândulas salivares, as quais são passíveis de infecção, com replicação periódica e eliminação do vírus pela saliva¹⁹⁻²¹, e posteriormente, os linfócitos B (células-alvo do vírus), onde uma pequena fração destas células atua como reservatórios de EBV, após a infecção primária^{22,23}.

Após a penetração do vírus na célula duas possíveis formas de infecção podem ocorrer: a infecção lítica, na qual o DNA do EBV incorpora-se ao genoma do linfócito, sendo transcrito e replicado no núcleo; e a infecção latente, a qual ocorre após a infecção inicial, onde o DNA viral permanece no núcleo do linfócito como DNA epissomal, circular¹⁴. O estresse e a deficiência imunológica são fatores que estão relacionados com a reativação e replicação do vírus²⁴.

A correlação entre o EBV e o LPB tem sido o foco de muitos estudos ao longo dos anos, onde diversas técnicas para detecção do EBV vem sendo utilizadas, dentre elas a imunohistoquímica, hibridização *in situ*, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a nested-PCR (nPCR). A PCR, uma das mais empregadas nas diversas áreas de diagnóstico molecular, devido a sua grande capacidade de detectar pequenos fragmentos de DNA. A nPCR é uma variação da técnica PCR a qual compreende duas etapas de síntese de DNA, sendo

que o material produzido na primeira etapa é utilizado na segunda etapa, objetivando deste modo a especificidade e eficiência da amplificação do DNA alvo²⁵.

Cruz et al.¹⁵, por meio da PCR pesquisaram a correlação do EBV, em lesões potencialmente malignas e em pacientes sem tais lesões. Foi encontrada correlação entre o EBV e as lesões potencialmente malignas (77,8%), entretanto, no Grupo controle a positividade viral foi de 8,3%. No entanto, Sand et al.²⁶, utilizando a técnica da nPCR, analisaram a presença do EBV em amostras teciduais parafinadas de 23 portadores de LPB e de 67 pacientes do Grupo controle. Como resultados, foram encontradas a prevalência viral em 26,1% das amostras de pacientes com LPB e em 7,3% das amostras do Grupo controle.

3.4 Proposição

Frente às controvérsias na literatura, quanto à existência de uma correlação entre o EBV e o LPB, o objetivo do presente estudo foi verificar a relação entre este vírus e o LPB por meio da técnica da nPCR em diferentes fontes materiais (tecido fresco, plasma sanguíneo, saliva e células esfoliadas orais) de um grupo pareado (por sexo e idade) de pacientes portadores de LPB e de um grupo de pacientes sem lesões de LPB. Este trabalho teve por objetivo também correlacionar os dados epidemiológicos dos grupos estudados com a presença viral, além de verificar se as fontes materiais testadas neste estudo podem ser consideradas viáveis para a detecção do EBV.

3.5 Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (FOA-UNESP) através da Plataforma Brasil (CAAE: 03069012.8.0000.5420) (**ANEXO A**).

Todos os pacientes envolvidos nesta pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de inclusão

Foram adotados os seguintes critérios para a inclusão dos 24 pacientes com líquen plano bucal (Grupo caso):

1. Pacientes atendidos pela disciplina de Estomatologia da FOA-UNESP, com diagnóstico histopatológico definitivo de LPB realizado por um mesmo patologista;
2. Pacientes atendidos na mesma instituição com finalidade de diagnóstico e tratamento, independente da realização desta pesquisa.

Para inclusão dos 17 pacientes controles foram adotados os seguintes critérios (Grupo controle):

1. Pacientes atendidos pela disciplina de Estomatologia da FOA-UNESP, que necessitavam de procedimento cirúrgico oral (cunha distal ou cirurgia pré-protética) como modalidade de tratamento (independentemente da realização desta pesquisa).

Coleta de dados e materiais:

Para os pacientes do Grupo caso:

- Foram realizadas biópsias com finalidade diagnóstica e o material obtido foi dividido em duas partes. Uma parte foi conservada em *freezer* -80°C para posteriores exames biomoleculares de detecção do DNA do EBV e a outra parte foi armazenada em formol tamponado a 10% e enviada para a análise histopatológica. Para a realização do exame histopatológico, o espécime fixado em formol 10% foi clivado e acondicionado em cassetes histológicos para processamento (desidratação, clarificação e impregnação) e inclusão em parafina. Após, procedeu-se à microtomia e posteriormente, à coloração pelo método HE (hematoxilina e eosina).

Todos os pacientes pertencentes ao Grupo caso possuíam o diagnóstico histopatológico de LPB realizado por um mesmo patologista.

- Para a coleta de saliva e células esfoliadas os pacientes foram orientados a não se alimentarem ou consumirem qualquer bebida por até 30 minutos antes da coleta ser realizada. Para a obtenção das amostras de saliva foi solicitado ao paciente que o mesmo eliminasse a saliva em um tubo do tipo Falcon de 15 mL no período 5 a 10 minutos, a fim de se obter no mínimo 5 mL de saliva. A coleta de células esfoliadas foi realizada com auxílio de um *citobrush* onde este foi firmemente friccionado e rodado de 5 a 10 vezes na lesão de LPB e após foi armazenado em um tubo de polipropileno de 2 mL contendo 300 µL de água Mili-Q ou TE.

As amostras de saliva e células esfoliadas foram distribuídas em tubos de polipropileno de 2mL, identificadas, e armazenadas a -80° C para posteriores procedimentos laboratoriais.

- Foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente pela equipe de enfermagem do Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA-UNESP. O material foi coletado e depositado em um tubo do tipo Falcon de 50 mL contendo 0,2 mL de EDTA trissódico a 10%. Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado para obtenção do plasma e as amostras foram distribuídas em tubos de polipropileno de 2 mL e armazenadas a -80°C.

Para os pacientes do Grupo controle:

Todas as etapas de coleta de materiais foram realizadas de forma semelhante à técnica já descrita para os pacientes do Grupo caso. Com exceção às biopsias, que foram realizadas como modalidade de tratamento e a região de coleta das amostras de células esfoliadas, as quais foram realizadas na região normal do paciente.

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.

Para confirmação da presença e integridade do DNA genômico, o DNA obtido de todos os materiais foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

PCR para gene humano controle

Na realização do PCR para o gene controle da β -globina foram utilizados os oligonucleotídeos PCO3 e PCO4 com 110 pb (pares de base) descrito por Nonogaki et al²⁷.

A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, EUA) adicionando-se ao DNA onde adicionou-se ao DNA um *mix* contendo os seguintes componentes: 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 um fluxo-laminar (Heto-Holter Tivo HV PCR, Dinamarca), foi adicionado 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 utilizamos 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), sob 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 realizada a análise através da eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão 1x TBE (Fonte Eletroforética - Amersham Pharmacia Biotech modelo EP3501, Suécia), durante 75 minutos sob voltagem constante de 100 volts. A visualização após coloração com brometo de etídeo foi realizada sob luz ultravioleta e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Após a confirmação da integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do DNA do EBV através da técnica da nPCR.

nPCR para amplificação do EBV

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores que fazem parte da região BamHIW do EBV (oligonucleotídeo externo para frente – GAGACCGAAGTGAAGTCCCT, oligonucleotídeo externo para trás – GGTGCCTTCTTAGGAGCTGT, oligonucleotídeo interno para frente – GCCAGAGGTAAGTGGACTTTAAT, oligonucleotídeo interno para trás – GAGGGGACCCTGAGACGGGT) (Integrated DNA Technologies), utilizados a 10 µM, que amplificam fragmento de 100 pb.

Na primeira etapa a mistura de amplificação foi composta por 2.5 µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8; KCl 50 mM) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1,3 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0.2 mM de cada dNTP (deoxyribonucleoside 5'- triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 0,5 µL de Taq DNA polimerase

(Invitrogen Life Technologies, Brasil), 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies), 5 μ L de amostra de DNA genômico e água ultrapura (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para totalizar o volume final de 50 μ L. Os fragmentos foram amplificados em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.). Na segunda etapa da nPCR, que ocorre após a primeira, os oligonucleotídeos iniciadores amplificaram um fragmento de 100 pb dentro da sequência do fragmento amplificado na primeira etapa. Para isto, utilizamos como amostra de DNA 1 μ L do produto obtido na primeira etapa. A mistura de amplificação e as condições de ciclagem foram semelhantes a da primeira etapa da nPCR, exceto pela substituição dos oligonucleotídeos iniciadores externos pelos internos.

Para controle positivo foi utilizado o DNA extraído de tecido parafinado de amostra de paciente com diagnóstico histopatológico de Linfoma de Hodgkin. O controle negativo foi composto somente pelo *mix* de amplificação.

Os produtos da nPCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 2 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D. Este processo foi repetido para cada material (plasma, saliva, células esfoliadas e tecido) e todas as amostras foram testadas em duplicata.

Forma de análise dos resultados

Os dados obtidos de cada grupo foram analisados com o software EPI INFO™ 7 versão 7.1.3.0 (Centers for Disease Control and Prevention, EUA) e

Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, EUA). O Teste T foi aplicado para averiguar se as idades dos grupos estudados não diferiam estatisticamente, entretanto, para verificar a correlação entre os dois grupos estudados quanto ao *status* do EBV em cada fonte material, foram aplicados o Teste do Qui-Quadrado - Mantel-Haenszel e o Teste exato de Fisher em nível de significância de 5%.

3.6 Resultados

Foram incluídos neste estudo 24 portadores de LPB (Grupo caso) e 17 pacientes não portadores de LPB (Grupo controle), pareados por sexo e idade, com diferença de até 3 anos.

A média de idade dos pacientes que constituíram o Grupo caso foi de 56,25 anos (43-72; desvio-padrão de 7,81) e de 57,59 anos (42-69; desvio-padrão de 9,12) no Grupo controle (**Figura 8**).

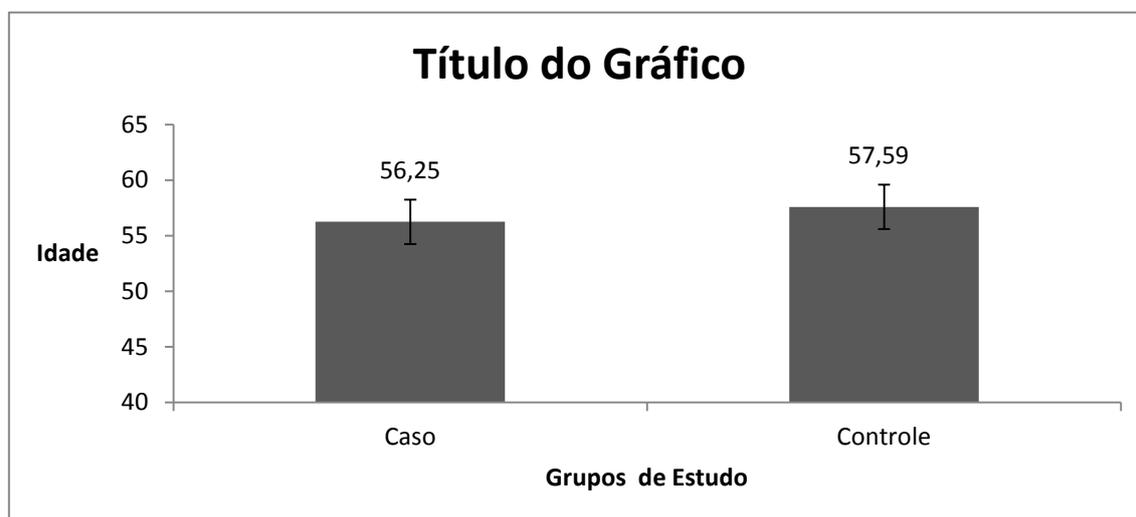


Figura 8 – Média de idade dos pacientes do Grupo caso e do Grupo controle

Não foi encontrada diferença significativa em nível de 5% entre as idades dos grupos estudados ($p=0,6171$).

A maioria dos pacientes era do sexo feminino em ambos os grupos (83,3% no Grupo caso e 76,5% no Grupo controle), como representado na **Figura 9**.

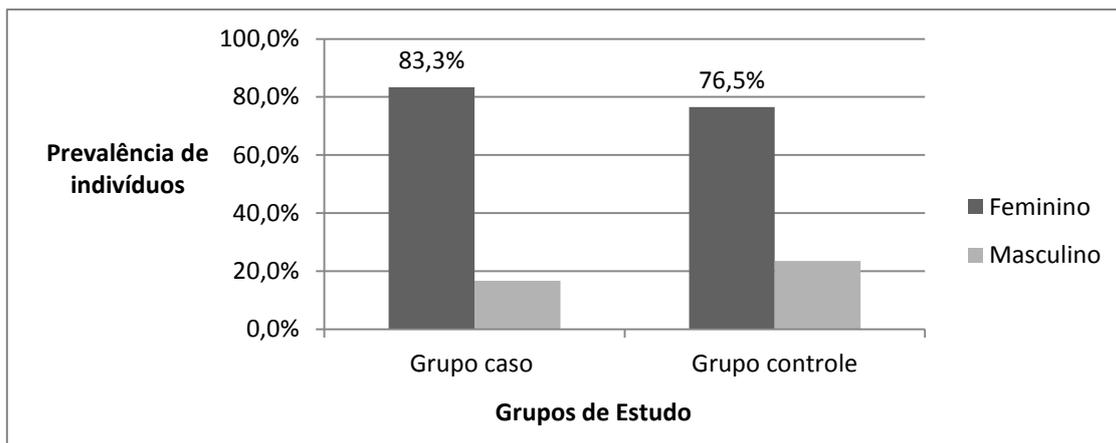


Figura 9 – Prevalência de pacientes do sexo feminino e masculino nos Grupos caso e controle

A área mais afetada pelas lesões de LPB foi a região de mucosa jugal (83,3%) seguida pela região de borda de língua (12,5%) e dorso de língua (4,2%). Já no Grupo controle, a região mais acometida foi a região de rebordo alveolar (52,9%) seguido da mucosa jugal (23,5%), dorso de língua (17,7%) e borda de língua (5,9%) (**Figura 10**).

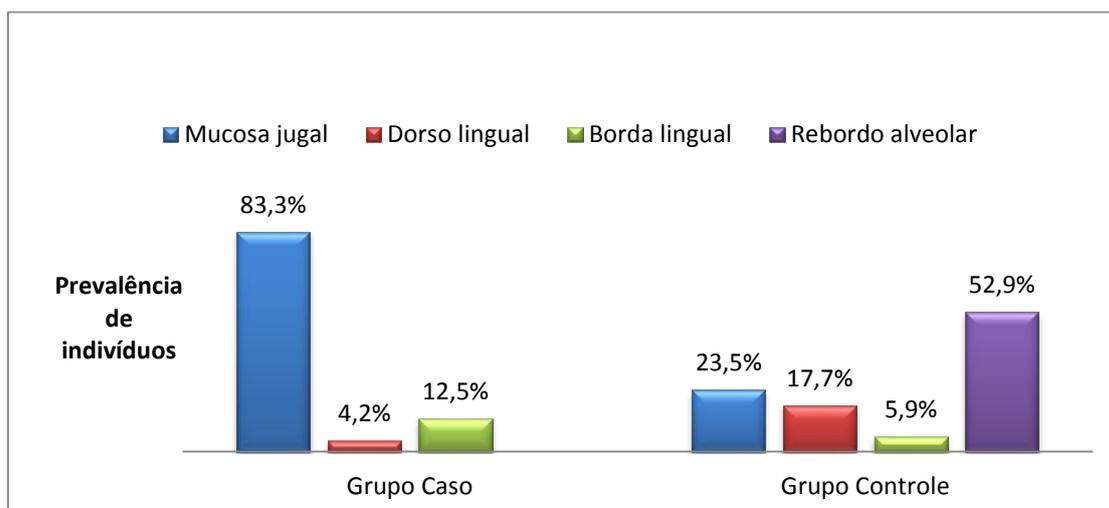


Figura 10 – Prevalência das regiões afetadas nos Grupos estudados

Todas as amostras do Grupo caso e do Grupo controle foram extraídas e testadas para o gene controle da β -globina humana, confirmando a presença e a integridade do DNA (**Figura 11**).

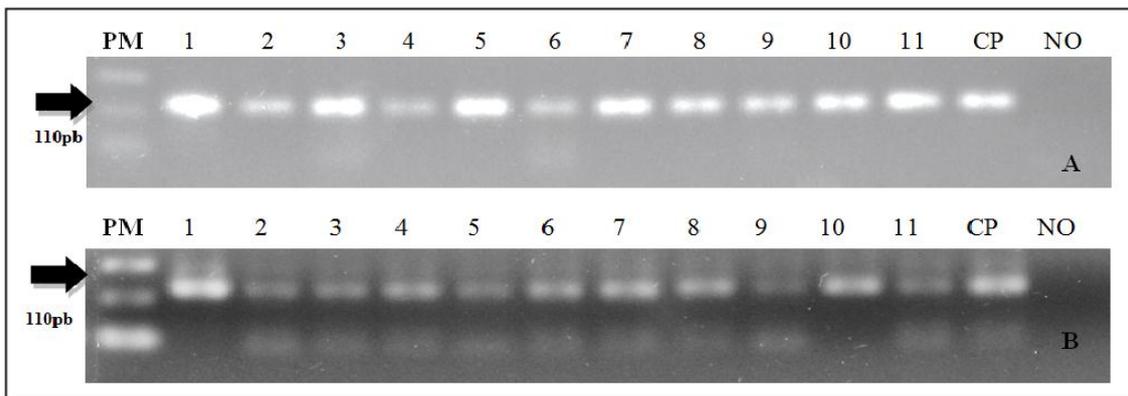


Figura 11 – Resultado da amplificação da β -globina (110 pb) em amostras teciduais do Grupo caso (Foto A) e do Grupo controle (Foto B)

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA de sangue humano previamente testado); NO = controle negativo (sem DNA)

Após, procedeu-se à detecção do EBV por nPCR em amostras do Grupo caso e do Grupo controle (**Figuras 12 e 13**).

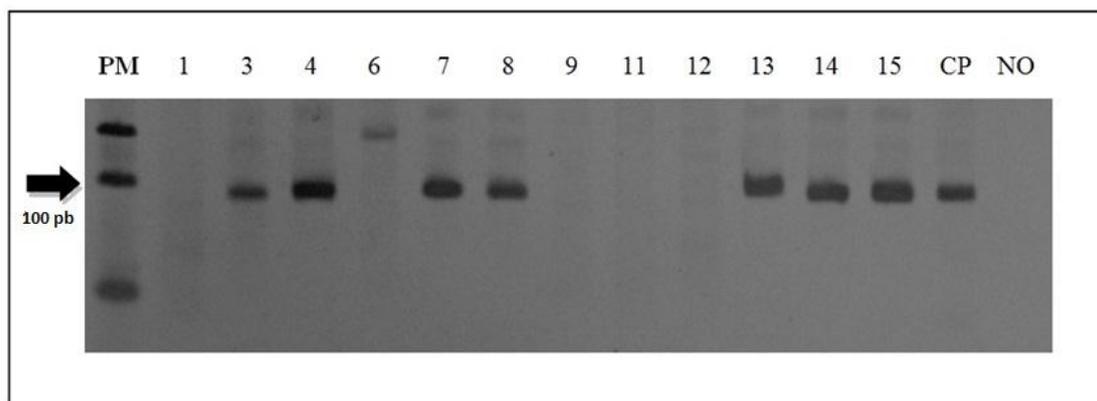


Figura 12 – Resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de 12 amostras de saliva do Grupo caso

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA)

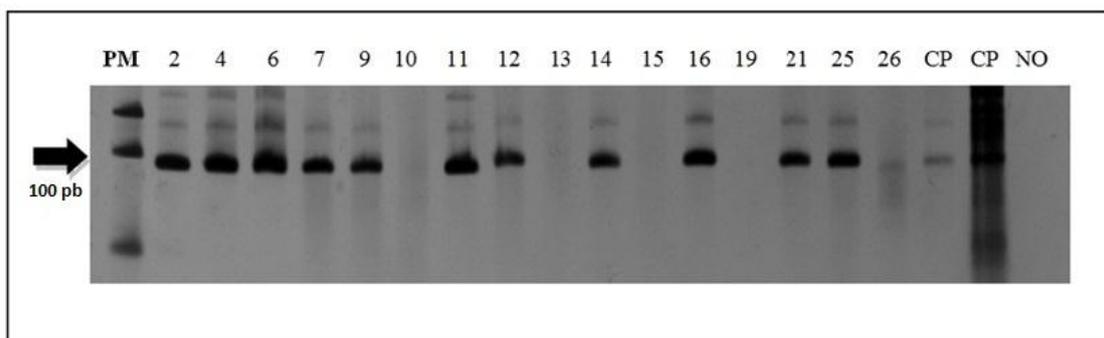


Figura 13 – Resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de 16 amostras de saliva do Grupo controle

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA)

A presença do EBV foi detectada em 62,5% (15/24) e em 35,3% (6/17) das amostras de tecido fresco no Grupo caso e no Grupo controle, respectivamente ($p=0,0899$). Nas amostras de saliva, 75% (18/24) do Grupo caso e 64,7% (11/17) do controle foram positivas para o EBV ($p=0,4808$). Nas amostras de células esfoliadas, o EBV foi encontrado em 70,8% (17/24) e 82,4% (14/17) das amostras do Grupo caso e do Grupo controle, respectivamente ($p=0,4033$). Quanto ao plasma, 33,3% (8/24) e 47,1% (8/17) das amostras do grupo de estudo e controle foram positivas para o EBV ($p=0,3806$) (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Análise caso-controle da presença e ausência do vírus do EBV em cada fonte material

Tipo de amostra	GRUPO CASO (n=24)			GRUPO CONTROLE (n=17)			p valor
	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	15 (62,5)	9 (37,5)	24 (100)	6 (35,3)	11 (64,7)	17 (100)	0,0899
<i>Saliva</i>	18 (75)	6 (25)	24 (100)	11 (64,7)	6 (35,3)	17 (100)	0,4808
<i>Células Esfoliadas</i>	17 (70,8)	7 (29,2)	24 (100)	14 (82,4)	3 (17,6)	17 (100)	0,4033
<i>Plasma Sanguíneo</i>	8 (33,3)	16 (66,7)	24 (100)	8 (47,1)	9 (52,9)	17 (100)	0,3806

Teste do Qui-Quadrado - Mantel-Haenszel (nível de significância de 5%)

O teste de proporção mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as fontes materiais estudadas quanto à positividade viral nos Grupos caso e controle (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Comparação das proporções de positividade para o EBV nos Grupos caso e controle, em cada uma das fontes estudadas

FONTES	GRUPOCASO	GRUPOCONTROLE	p valor
<i>Tecido</i>	62,50	35,29	0,0859
<i>Saliva</i>	75,00	64,71	0,7940
<i>Células esfoliadas</i>	70,83	82,35	0,9652
<i>Plasma</i>	33,33	47,06	0,3748

Nível de significância de 5%

A análise da positividade do EBV entre as diferentes fontes materiais nos pacientes portadores de LPB mostrou um valor significativo para as variáveis: plasma *versus* saliva ($p= 0,0039$), plasma *versus* células esfoliadas ($p= 0,0067$) e plasma *versus* tecido ($p= 0,0196$). No entanto, entre as variáveis saliva *versus* células esfoliadas, saliva *versus* tecido e células esfoliadas *versus* tecido a relação não se mostrou significativa (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Comparação 2 a 2 quanto à presença do EBV entre as fontes materiais dos pacientes do Grupo caso

FONTES MATERIAIS	p valor
<i>Saliva x Células esfoliadas</i>	0,6547
<i>Saliva x Tecido</i>	0,3657
<i>Células esfoliadas x Tecido</i>	0,5271
<i>Plasma x Tecido</i>	0,0196**
<i>Plasma x Saliva</i>	0,0039**
<i>Plasma x Células esfoliadas</i>	0,0067**

**Significativo a nível de 5%.

Em relação ao *status* do EBV quanto ao sexo dos pacientes com LPB em cada fonte estudada, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas apenas em amostras de saliva ($p=0,0353$). (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Relação entre o sexo dos pacientes do Grupo caso quanto à presença e ausência do vírus do EBV em cada fonte material

Tipo de amostra	SEXO FEMININO			SEXO MASCULINO			p valor
	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	12 (60)	8 (40)	20 (100)	3 (75)	1 (25)	4 (100)	0,5138
<i>Saliva</i>	17 (85)	3 (15)	20 (100)	1 (25)	3 (75)	4 (100)	0,0353**
<i>Células Esfoliadas</i>	15 (75)	5 (25)	20 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	0,3281
<i>Plasma Sanguíneo</i>	6 (30)	14 (70)	20 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	0,4071

Teste Exato de Fisher (**significativo a nível de 5%)

Tratando-se das variações clínicas das lesões de LPB encontradas no Grupo caso, estas, foram classificadas em dois grupos: (1) lesões atróficas-erosivas; as quais fazem parte as variáveis do tipo atrófica, erosiva, bolhosa e mistas (2) lesões não atróficas-erosivas; as quais incluem as lesões do tipo reticular, em placa e mistas. As variáveis não atróficas-erosivas foram as mais prevalentes nos participantes do Grupo caso (54,2%) (**Figura14**) e também foram as mais acometidas pelo vírus do EBV, no entanto não houve diferenças significativas entre as variações clínicas do LPB em cada fonte material (**Tabela 9**).

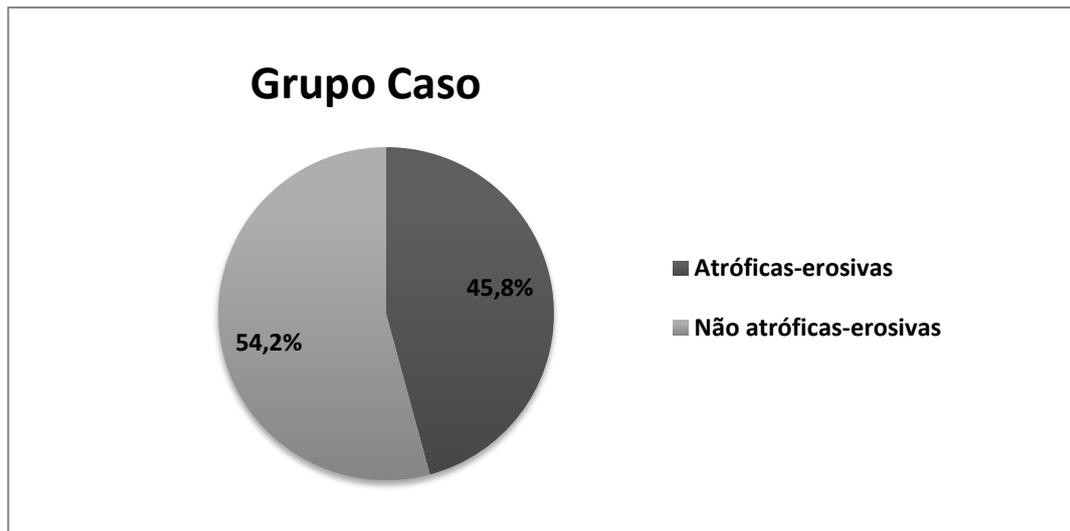


Figura 14 – Variações clínicas das lesões de LPB nos pacientes do Grupo caso

Tabela 9 – Relação entre as variáveis clínicas das lesões de LPB quanto à presença e ausência do vírus do EBV em cada fonte material

Tipo de amostra	VARIÁVEIS AE			VARIÁVEIS NÃO AE			p valor
	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	EBV+ (%)	EBV- (%)	Total (%)	
<i>Tecido</i>	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100)	6 (46,2)	7 (53,8)	13 (100)	0,0836
<i>Saliva</i>	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (100)	11 (84,6)	2 (15,4)	13 (100)	0,2393
<i>Células Esfoliadas</i>	8 (72,7)	3 (27,3)	11 (100)	9 (69,2)	4 (30,8)	13 (100)	0,6049
<i>Plasma Sanguíneo</i>	4 (33,3)	7 (66,7)	11 (100)	4 (30,8)	9 (69,2)	13 (100)	0,5555

Teste Exato de Fisher (nível de significância de 5%).

3.7 Discussão

Não foi encontrada neste estudo uma relação estatisticamente significativa quanto à positividade para o EBV nas amostras teciduais dos grupos estudados ($p=0,0899$). Entretanto as taxas de prevalência viral nestas amostras foram superiores a de estudos realizados por Sand et al.²⁶ e por Kis et al.¹⁹, os quais detectaram a presença do EBV em 26,1% e 46,6% das amostras teciduais parafinadas de pacientes portadores de LPB e em 7,3% e 19,1% pacientes sem lesões de LPB, respectivamente, através da técnica da nPCR e foi superior também a taxa encontrada por Yildirim et al.²⁸, os quais encontraram a prevalência do EBV em 35% das amostras teciduais de LPB por meio da imunohistoquímica.

Acredita-se que a alta taxa viral em no presente estudo, tanto no Grupo caso como no controle, comparado a estes estudos se deu devido ao fato da utilização de tecido fresco ao invés da utilização de tecidos parafinizados, uma vez que o uso deste último material pode acarretar em degradação do DNA devido a sua fixação em formalina. Outra explicação, seria o emprego da técnica da nPCR que atualmente é conhecida como uma das mais sensíveis técnicas empregadas na área da biologia molecular²⁵.

De acordo com a pesquisa realizada na base de dados Pubmed não encontrou-se estudos que relatassem a presença do EBV em amostras de células esfoliadas, saliva e plasma de pacientes portadores de LPB, sendo este o primeiro estudo caso-controle, pareado por sexo e idade, que envolve a detecção do EBV em fontes materiais distintas de um grupo de pacientes portadores de LPB e de um grupo de pacientes sem lesões de LPB.

Encontrou-se uma alta prevalência viral em amostras de saliva e células esfoliadas tanto no Grupo caso como no Grupo controle. No entanto, a análise caso-controle quanto ao *status* do EBV não se mostrou significativa para nenhuma destas fontes materiais. Comparando as taxas de detecção do EBV em pacientes sem lesões de LPB encontradas por este estudo com as taxas encontradas na literatura verificou-se que as mesmas estão de acordo com Saygun et al.²⁹, os quais relatam que as taxas de infecção pelo EBV em indivíduos saudáveis podem variar de 0% a 100% e são superiores às taxas encontradas por Ammatuna et al.³⁰ os quais obtiveram a positividade para o EBV em 15% das amostras de saliva e em 30% das amostras de células esfoliadas de indivíduos saudáveis.

Esperava-se como de fato ocorreu encontrar as maiores taxas de detecção para o EBV nas amostras de células esfoliadas e especialmente nas amostras de saliva de ambos os grupos estudados. Uma explicação para a alta taxa de detecção do EBV na saliva deve-se ao fato da saliva ser considerada uma das principais fontes de disseminação do vírus. No entanto, a alta positividade viral encontrada nas amostras de células esfoliadas sugere que o vírus possa estar em seu ciclo replicativo o qual pode ser detectado nas camadas superficiais do epitélio³¹.

A utilização do plasma sanguíneo na detecção do EBV vem sendo estudada ao longo da última década, onde o DNA circulante do EBV tem se mostrado um valioso marcador diagnóstico e prognóstico para muitas malignidades associadas ao EBV, principalmente para o carcinoma nasofaríngeo e o linfoma³². A prevalência do EBV em amostras de plasma sanguíneo extraídas de carcinomas de orofaringe variam entre 69% a 96%³³,

entretanto, em indivíduos sem a malignidade esta taxa é menor variando entre 7% e 12,2%^{33,34}.

No presente estudo não foi encontrado resultados significativos em nível de 5% quanto ao *status* do EBV no plasma sanguíneo dos pacientes de ambos os grupos estudados. Entretanto, notou-se que a taxa de detecção deste foi a mais baixa no Grupo caso e a segunda mais baixa no Grupo controle quando comparada às taxas encontradas pelas demais fontes. Também pôde-se notar que somente as amostras de plasma tiveram concomitância com as demais fontes levando-se a crer que este fato ocorreu devido ao EBV ser um vírus amplamente disseminado no ambiente, sendo que praticamente a maioria dos indivíduos, na idade adulta, apresenta evidências sorológicas de exposição previa ao vírus³⁵ além do fato do ciclo de vida do EBV envolver dois compartimentos (sangue periférico e cavidade oral), onde a memória da infecção latente dos linfócitos B circula no sangue periférico constituindo um reservatório para o EBV persistente³⁶.

Em relação às características clínicas dos pacientes estudados, encontrou-se predominância pelo sexo feminino nos pacientes em ambos os grupos, onde esta já era esperada no Grupo caso, pois segue uma característica clássica de portadores de LPB. Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por Sand et al.²⁶, os quais relataram não haver diferenças entre o sexo quanto à prevalência do EBV e são conflitantes com o estudo realizado por Kis et al.¹⁹, os quais encontraram prevalência do EBV no sexo masculino. Em relação ao sexo entre os pacientes portadores de LPB e as fontes estudadas, encontrou-se uma relação significativa apenas em amostras de saliva ($p=0,0353$).

Não foi encontrada relação estatisticamente significativa quanto às variáveis clínicas das lesões de LPB e a presença do EBV, sendo este resultado compatível com o estudo realizado por Yildirim et al.²⁸, os quais sugerem que o tipo clínico do LPB não está correlacionado com o *status* do EBV.

3.8 Conclusão

Concluiu-se que todas as fontes materiais testadas neste estudo foram consideradas viáveis para detecção do EBV em ambos os grupos e mesmo que se tenha encontrado uma alta prevalência do EBV entre as fontes materiais testadas em ambos os grupos, não foi estabelecida uma correlação entre o LPB e o EBV e também não foi encontrada correlação entre os dados epidemiológicos dos grupos estudados com a presença do EBV.

3.9 Referências

- 1- Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and Lichenoid reactions; etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci* 2007; 49: 89–106.
- 2- Gorsky M, Epstein JB. Oral lichen planus: malignant transformation and human papilloma virus: a review of potential clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111: 461-4.
- 3- Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350-65.
- 4- 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.
- 5- Gimenez-García R, Pérez-Castrillón JLLichen planus and hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17: 291-5.
- 6- Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993; 29B: 215-9.
- 7- Míco-Llorens JM, Delgado-Molina E, Baliellas-Comellas C, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Association between B and/or C chronic viral hepatitis and oral lichen planus. *Med Oral* 2004; 9: 183-90.

- 8- Oflatharta C, Flint SR, Toner M, et al. Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpesviruses, and the human papillomaviruses. *Mol Diagn* 2003; 7: 73-83.
- 9- Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 31-42.
- 10-Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 2005; 11: 338-49.
- 11-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* 2011; 16: e641-6.
- 12-Keenan AV, Ferraiolo D. Insufficient evidence for effectiveness of any treatment for oral lichen planus. *Evidence-Based Dentistry* 2011; 12: 85-86.
- 13-Cruchley AT, Murray PG, Niedobitek G, Reynolds GM, Williams DM, Young LS. The expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) in oral hairy leukoplakia. *Oral Dis* 1997; Suppl 1: S177-9.
- 14-Rickinson, A.B., Kieff, E.D. Epstein Barr virus In: *Fields Virology*. 5th. Knipe, D, M., Howley .P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strus, S.S. (eds). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2656-60.
- 15-Cruz I, Van den Brule AJ, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Snow GB, Van der Waal I. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal

- mucosa--a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol* 1997; 33: 182-8.
- 16-Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 185-9.
- 17-Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, Thomas R, Reid S, Conacher M, Britton K, Crawford DH. A Study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis* 2007; 195: 474–82.
- 18-Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese UK, Schneider U, et al. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology.* 1986; 154: 56-66.
- 19-Kis A, Fehér E, Gáll T, Tar I, Boda R, Tóth ED, Méhes G, Gergely L, Szarka K. Epstein–Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 536–540.
- 20-Cruz I, Van den Brule AJC, Brink AATP, Snijders PJF, Walboomers JMM, Van der Waal I Meyer CJ. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000; 86: 356–61.
- 21-Clemens MJ. Epstein-Barr virus: inhibition of apoptosis as a mechanism of cell transformation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 164–169.
- 22-Thorley-Lawson DA, Gross A Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350: 1328-37.

- 23-Hammerschmidt W, Sugden B. Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. *Trends Mol Med* 2004; 10: 331-36.
- 24-Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 2008; 10: 279-92.
- 25-Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 987-992.
- 26-Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 586-92.
- 27-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: 219-24.
- 28-Yildirim B, Sengüven B, Demir C. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papillomaviruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 170-4.
- 29-Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res.* 2005 Apr;40(2):187-91.

- 30-Ammatuna P, Capone F, Giambelluca D, Pizzo I, D'Alia G, Margiotta V. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and antigens in oral mucosa of renal transplant patients without clinical evidence of oral hairy leukoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 420-7.
- 31-Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD, Adler-Storthz K. Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J Infect Dis.* 2001; 184(12):1499-507.
- 32-Chan KC, Zhang J, Chan AT, Lei KI, Leung SF, Chan LY, Chow KC, Lo YM. Molecular Characterization of Circulating EBV DNA in the Plasma of Nasopharyngeal Carcinoma and Lymphoma Patients. *Cancer Res* 2003; 63: 2028–32.
- 33-Chai SJ, Pua KC, Saleh A, Yap YY, Lim PV, Subramaniam SK, Lum CL, Krishnan G, Mahiyuddin WR; Malaysian NPC Study Group, Teo SH, Khoo AS, Yap LF. Clinical significance of plasma Epstein–Barr Virus DNA loads in a large cohort of Malaysian patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Clinical Virology* 2012; 55: 34-9.
- 34-Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP. Quantitative Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus DNA in Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 1188–91.
- 35-Cohen JI. Epstein- Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; 343; 481-92.
- 36-Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontal Res* 2006; 41: 235-44.



Anexos

Anexo A

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção do HPV e EBV em líquen plano bucal e tecido normal de cavidade bucal

Pesquisador: Glauco Issamu Miyahara

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03069012.8.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 165.653

Data da Relatoria: 10/12/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto está delineado dentro dos padrões metodológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Detectar a presença do DNA do papiloma virus humano (HPV) e do Epstein-Barr virus (EBV) em amostras de tecidos fresco, plasma sanguíneo, saliva e células exfoliadas orais, extraídas de pacientes portadores e não portadores de lesões de LPB, e verificar correlação entre estes vírus e o Líquen Plano Bucal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Há risco mínimo para os pacientes, e as intervenções são necessárias para diagnóstico, independentemente da pesquisa, ou seja, os pacientes deverão ser submetidos a intervenção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa objetiva verificar a existência de correlação entre a presença dos vírus com o desenvolvimento ou exacerbação do Líquen Plano Bucal. A metodologia escolhida é adequada e o projeto poderá ser desenvolvido sem maiores intercorrências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão dentro do solicitado pelas normas.

Recomendações:

Nada a declarar.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Todas as solicitações realizadas pelo relator foram atendidas pelo pesquisador responsável, o que permite a aprovação para o desenvolvimento do projeto.

ARACATUBA, 07 de Dezembro de 2012

Assinador por:

Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

Anexo B

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO 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