

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

KARINNE SILVA AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DO HIV**

Recife – PE

2015

KARINNE SILVA AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DO HIV**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Jair Carneiro Leão, PhD

Co-orientadora: Profa. Alessandra de Albuquerque Tavares
Carvalho

Recife –PE

2015

A994a Azevedo, Karinne Silva.
Avaliação da prevalência do Papilomavírus humano (HPV) em saliva de pacientes portadores do HIV / Karinne Silva Azevedo. – 2015.
52 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Jair Carneiro Leão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Papilomavírus humano 16. 2. Papilomavírus humano 18. 3. Infecções por HIV. 4. Infecções sexualmente transmissíveis. 5. Papilomaviridae. I. Leão, Jair Carneiro (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2016-174)

Ata da 165ª Defesa de Dissertação do curso de Mestrado em Odontologia com Área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 27 de agosto de 2015.

Às 14hs (Quatorze horas) do dia 27 (vinte e sete) do mês de agosto do ano de 2015 (dois mil e quinze), reuniram-se no auditório da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como presidente, Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DIAS PEREIRA, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como primeiro examinador, Profa. Dra. BRUNA DE CARVALHO FARIAS VAJGEL, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DO HIV”** da CD. KARINNE SILVA AZEVEDO, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na área de concentração em CLÍNICA INTEGRADA, sob orientação do Prof. Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO. Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Odontologia, abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu aos membros, seguindo convidou a candidata para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se à disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram à candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DIAS PEREIRA (APROVADA), Profa. Dra. BRUNA DE CARVALHO FARIAS VAJGEL (APROVADA), Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO (APROVADA). A candidata recebeu três conceitos de APROVADA é considerada APROVADA, devendo acatar as sugestões da Banca Examinadora. Face à aprovação, fica a candidata apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o regimento interno do curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, a presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada. Oziclere Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada Mestre pela UFPE. KARINNE SILVA AZEVEDO.

Recife, 27 de agosto de 2015.

Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO Mestrando:
Presidente

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DIAS PEREIRA Orientador:
1º Examinador

Profa. Dra. BRUNA DE CARVALHO FARIAS VAJGEL
2ª Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemus Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Aos meus pais, marido, irmãos e amigos que sempre me apoiaram na realização dos meus sonhos, e contribuíram na conclusão deste trabalho, dedico com carinho as próximas linhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me presenteou com o dom da vida, por me dar conforto nas horas difíceis e determinação para continuar acreditando em mim e seguir em frente nessa busca incessante pelo saber.

Ao meu pai, Jorge, que desde criança incentivou sem saber, o desejo dessa profissão, e agora, mesmo de longe, permanece em minha vida, nos meus pensamentos e no coração.

À minha mãe, Kátia, que com seu amor incondicional, sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos, apoiando minhas decisões e ensinou, junto com meu pai, os verdadeiros valores da vida, sendo exemplos dignidade, honestidade, coragem e perseverança.

Ao meu marido, meu amor, Guto, que me compreende e me incentiva a ser uma pessoa cada vez melhor.

À minha irmã Marianne e meu irmão Jorge, pelo incentivo, pela amizade e pelo carinho.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao programa de pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, pela oportunidade e honra de fazer parte de seu corpo discente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, pela idealização deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, e pela confiança em mim depositada. Obrigada por ter me aceito como sua aluna.

À Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, obrigada pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, por ter, gentilmente, cedido o seu laboratório, me apoiando e acreditando na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos de forma tão simples e humilde. Para mim, foi um privilégio conviver com a equipe do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento Professora Tância Falcão da UFRPE, em especial com os mestrandos Erinaldo e Géssica; e a aluna da graduação Sylvia Sampaio.

Aos professores da pós-graduação em Odontologia da UFPE, pelas experiências e ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

Ao professor José Ricardo Dias pelos ensinamentos e amizade durante o estágio de docência e na vida.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), pela concessão da bolsa de mestrado.

À equipe dos serviços de Odontologia e DST's do Hospital Correia Picanço e Policlínica Lessa de Andrade, pelo acolhimento.

Ao professor Igor Henrique Moraes, por todo o apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus companheiros de turma, obrigada pelos muitos momentos de estudo compartilhados durante o período que passamos juntos. Às minhas amigas Camila Cravo, Marina Maymone, Camila Lins, Marília Lins, Samantha Cardoso e Camila Nunes pelo carinho e companheirismo.

A toda equipe de estomatologia da UFPE, muito obrigada por dividir comigo a experiência de vocês. Sou grata por ter conhecido e trabalhado com pessoas muito boas e dedicadas durante esse período.

À secretária Oziclere Sena e às funcionárias Ritinha e Tânia, pela disponibilidade.

Aos meus professores da graduação da Universidade de Pernambuco (FOP/UPE). Obrigada por me ensinarem através da palavra e do exemplo que a busca pelo conhecimento deve ser contínua.

A todos os pacientes que espontaneamente aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela disponibilidade.

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta pesquisa.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças à Deus não sou o que era antes."

(Marthin Luther King)

RESUMO

Identificar a presença dos sorotipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV) na saliva de pacientes portadores do vírus HIV. A amostra de 90 pacientes foi oriunda de dois centros de referência em tratamento de ISTs da cidade do Recife, PE, Brasil. Uma entrevista foi realizada para identificar o perfil da amostra, sendo realizada uma coleta de saliva empregando tubos falcon e solução para bochecho com sacarose a 5%, com posterior armazenamento em freezer a -20°C para rastreamento do HPV e genotipagem para o sorotipo 16 e 18 por PCR convencional. Na amostra predominou a presença do sexo masculino 59 de 90 (65,6%), com idade média de 38,8 anos, variando entre 18 e 69 anos, renda familiar média de 1,95 Salários Mínimos (DP = 1,37). A prevalência de HPV nesta amostra foi de 23 de 90 (25,6%) e dos sorotipos 16 e 18 foi 8 de 90 (8,9%). A co-infecção por HPV é comumente observada em pacientes portadores de HIV.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano 16. Papilomavírus Humano 18. Infecções por HIV. Infecções Sexualmente Transmissíveis. Papillomaviridae.

ABSTRACT

To identify the presence of high-risk serotypes human papillomavirus (HPV) in patients with sexually transmitted infections (STIs). A sample of 90 patients were from two referral hospitals in treatment of STIs. An interview was conducted to identify the sample's profile a saliva collections being performed using falcon tubes and mouth rinse with 5% sucrose, subsequent storage in a freezer at -20°C for HPV screening and genotyping for serotype 16 and 18 by conventional PCR. In the sample predominant male presence 59 of 90 (65.6%) with mean age of 38.8 years, ranging between 18 and 69 years, average family income of 1.95 minimum wages (SD = 1, 37). The prevalence of HPV in this sample was 23 of 90 (25.6%) and the serotype HPV 16 and 18 was 8 of 90 (8.9%). Co-infection with HPV is commonly observed in HIV patients.

Keywords: Human Papillomavirus 16. Human Papillomavirus 18. HIV Infections. Sexually Transmitted Diseases. Papillomaviridae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição dos pesquisados segundo as variáveis: sexo, faixa etária e renda.	24
Tabela 2:	Relação das Infecções Sexualmente Transmissíveis declaradas	24
Tabela 3:	Prevalência do HPV obtida através dos exames de saliva	25
Tabela 4:	Avaliação da presença do HPV tipos 16-18 segundo as variáveis: sexo, faixa etária e renda familiar	25

LISTA DE ABREVIACES

DNA	cido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
IBM SPSS	IBM Statistical Package of Social Science
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IST	Infeco Sexualmente Transmissível
PCR	Reao em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
SM	Salário Mínimo
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
SIRI	Síndrome da Reconstituo Inﬂamatria Imune

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	15
2	AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DO HIV	16
2.1	INTRODUÇÃO	16
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
2.5	TABELAS	24
3	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS	27
	APÊNDICES	31
	Apêndice 1 – Artigo traduzido	31
	Apêndice 2 – Prontuário clínico	38
	Apêndice 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	41
	ANEXOS	44
	Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	44
	Anexo 2 – Normas do <i>Journal of Oral Pathology and Medicine</i>	46

1. APRESENTAÇÃO

Sabe-se que, independentemente do sexo, portadores de HIV possuem alto risco para desenvolvimento de lesões malignas e a co-infecção pelo vírus HPV é motivo de preocupação na sociedade. Diante desse fato, o artigo exposto visa identificar a presença dos sorotipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV), subtipos 16 e 18, na saliva de pacientes portadores do vírus HIV. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, a pesquisa foi realizada em dois centros de referência em tratamento de ISTs da cidade do Recife, PE, Brasil, a Policlínica Lessa de Andrade e o Hospital Correia Picanço. A amostra foi composta por 90 pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que foram avaliados no período de junho à dezembro de 2014. Após o consentimento, foi coletada a saliva e uma entrevista foi realizada com foco nas características sócio-demográficas e na história médica do paciente. Em laboratório, foi realizado o rastreamento do HPV e a genotipagem para os sorotipos 16 e 18 pela técnica de PCR convencional.

2. Avaliação da prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em saliva de pacientes portadores do HIV

2.1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a infecção viral sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo, de grande impacto para a saúde pública (1, 2) sendo associada com quase todos os cânceres cervicais, 80-90% dos cânceres anais e uma alta proporção de câncer na orofaringe, vagina, vulva e pênis (3, 4). Estes vírus pertencem a uma grande família de pequenos adenovírus sem envelope proteico, formado por um capsídeo com 72 capsômeros de estruturas icosaédricas, epiteliotrópicos, com cerca de 55 nm de diâmetro, chamados Papovaviridae (4, 5).

O HPV é transmitido por via sexual e os fatores de risco são associados ao comportamento sexual. Sua prevalência expandiu a partir de 1960, época em que o uso dos contraceptivos orais se difundiram, ao mesmo tempo que a utilização dos métodos de barreira diminuiu e a evolução na detecção do vírus aumentou (8, 9). Tanto homens quanto mulheres são envolvidos na cadeia epidemiológica, ambos como portadores, transmissores e infectados. Sua infecção pode gerar lesões clínicas, subclínicas ou latentes (6). A infecção inicia-se quando o vírus penetra no novo hospedeiro, através de micro-traumatismos. A progressão da fase de incubação para a de expressão ativa depende de três fatores: da permissividade celular, do tipo de vírus e do estado imunológico do hospedeiro (7).

O vírus afeta a pele e as mucosas e podem induzir a formação de tumores (10) Atualmente são conhecidos mais de 100 tipos de HPV, que são classificados de acordo com o seu potencial carcinogênico em: alto risco e baixo risco (11, 13). Os de alto risco são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 56, 58, 59 e 69, os quais tendem a originar tumores malignos. Já os de baixo risco são os tipos 6, 11, 43 e 44, que geralmente originam tumores benignos (11, 14, 15). O HPV 16 é responsável pela maioria dos casos de carcinoma invasor no mundo, e a prevalência do HPV 18 é menor (12, 13) entretanto não sendo menos graves (16, 17).

O Brasil é um dos líderes mundiais em incidência de HPV, com cerca de 500 mil a 1 milhão de casos novos por ano, sendo as mulheres entre 15 e 25 anos a população mais acometida (1, 6) e os estudos de prevalência da infecção pelo HPV publicados no Brasil analisam principalmente dados de mulheres pela alta relação do HPV no de câncer de colo de útero ou tratamento (18), e não aqueles que são associado a infecções sexualmente

transmissíveis (ISTs), tais como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e sífilis (19). Na verdade, independentemente do sexo, portadores de HIV possuem alto risco para desenvolvimento de lesões malignas, além do fato de que com a evolução da terapia antirretrovirais que tendem a aumentar a longevidade, as co-infecções com o HPV são de crescente preocupação, pois pioram a qualidade da longevidade adquirida (4).

Quanto ao câncer de orofaringe, apesar de dados mundiais relatarem o aumento da incidência dos casos e sua relação com o HPV pouco se conhece da epidemiologia da infecção pelo papilomavírus humano, principalmente na América Latina (19, 21). O tumor mais frequente é o carcinoma oral de células escamosas e sua etiologia tem implicado em hábitos tabagistas, abuso de álcool e a existência de lesões pré-malignas originadas pelo HPV na cavidade oral, laringe, orofaringe e hipofaringe (11).

O câncer de boca tem sido ignorado, mesmo com evidência científica de que sua progressão tem aumentado nos últimos anos e que pode ser potencializado em pacientes imunocomprometidos e portadores de outras ISTs (19). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, o câncer de boca representa o quinto tipo de câncer em incidência entre homens. Para as mulheres, é o nono mais frequente na região Nordeste (3,72/100 mil) e Sudeste (4,88/100 mil). Na região Norte (1,6/100 mil), ocupa a 11ª posição, enquanto, nas regiões Centro-Oeste (3,3/100 mil) e Sul (3,09/100 mil), é respectivamente, o 12º e o 15º mais incidente. Em homens, o câncer da cavidade oral é o quarto mais frequente na região Nordeste (7,1/100 mil) e Sudeste (15,4/100 mil). Na região Centro-Oeste (8,1/100 mil), ocupa a quinta posição, enquanto, nas regiões Sul (15,2/100 mil) e Norte (3,2/100 mil), é o sexto mais frequente. As taxas de incidência para câncer de cavidade oral relacionado à infecção pelo HPV, como amígdala, base da língua e orofaringe, vêm aumentando entre a população de adultos jovens em ambos os sexos (22).

Assim, este estudo objetivou identificar a presença do HPV de alto risco (subtipos 16 e 18) em pacientes portadores do vírus HIV atendidos em dois centros de referência na cidade de Recife/PE, Brasil.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de estudo e seleção da amostra do estudo

Este é um tipo de estudo transversal observacional onde foram avaliados 90 indivíduos de ambos os sexos, entre os meses de junho e dezembro de 2014 e tratados em dois centros de referências, Hospital Correia Picano e Policlínica Lessa de Andrade, na cidade de Recife-PE, Brasil. Todos os avaliados devem ser portadores do vírus HIV e ter mais de 18 anos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob o parecer nº 655.899 em 28 de maio de 2014 e seguiu os preceitos da Resolução nº 466/2012. Todos os participantes do estudo foram esclarecidos sobre o intuito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de qualquer procedimento a ser executado e puderam desistir do estudo a qualquer momento.

Após o consentimento, uma entrevista foi realizada com foco nas características sócio-demográficas (sexo, idade, cor da pele e estado civil) e na história médica do paciente.

Obtenção das amostras e Extração do DNA

As amostras de saliva foram coletadas utilizando tubos falcon e solução para bochecho com sacarose a 5%. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a - 20°C até o momento de realização dos testes.

O DNA foi extraído de amostras de saliva dos participantes, utilizando-se o Kit QIAamp DNA (Qiagen®), de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, o DNA foi mantido a -20°C até processamento pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção e a genotipagem do vírus HPV foi feita pela PCR convencional.

Processamento através da técnica de PCR e detecção do DNA viral

Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (no inglês, PCR) utilizando o kit de reagentes Master mix (Promega, USA) foi realizada a detecção do HPV nas amostras analisadas. Inicialmente foi realizada a amplificação do gene da globina humana para certificar a qualidade das amostras analisadas com primers específicos PC04 e GH20 e posteriormente, a amplificação com os primers MY09 e MY11, para ambos seguimos o

protocolo: 1X GoTaq Green Master Mix, 1,0 pmol de cada primer e ~200ng do DNA molde. A ciclagem da PCR foi: 95°C por 5 min, 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 seg, anelamento a 56°C por 40 seg e extensão a 72° C por 40 seg, seguidos de uma extensão final de 78° C por 8 min, com banda esperada de 450 pares de base.

Para as amostras negativas uma nova reação foi realizada com os primers internos do HPV (GP5+/6+), as condições da reação seguiram seguinte protocolo: 1X Gotaq® Green Master Mix (PROMEGA), 1,0 pmol de cada primer e ~200ng do DNA molde. As ciclagens da PCR foram: 94°C por 35seg, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 35 seg, anelamento a 41°C por 40 seg e 72°C por 45 seg, seguidos de uma extensão final de 72°C por 4 min. Em seguida, os amplicons foram misturados com tampão de carregamento, aplicados em um gel de agarose a 1%, separados eletroforéticamente, e posteriormente visualizados sob luz ultravioleta na presença do corante de DNA gelRed.

Tipagem dos HPVs 16 e 18

Para tipagem dos tipos virais 16 e 18, todas as amostras positivas para o HPV foram amplificadas com os primers específicos, demonstrado no Quadro 1. Posteriormente, os produtos gerados foram corados com o ligante de DNA gel Red, aplicados em um gel de agarose a 1%, e visualizado sob luz ultravioleta após separação eletroforética. Todas as reações foram realizadas como as anteriores apenas alterando as temperaturas de anelamento (Quadro 1) correspondente para cada primer e tiveram controle positivo e um controle negativo sem DNA.

Quadro 1: Primers correspondentes para cada tipo de HR-HPV

HPV	Primer senso	Primer antisenso	Produto	T (°C)
16	5'-GTC AAA AGC CAC TGT GTC CT-3'	5'-CCA TCC ATT ACA TCC CGT AC- 3'	499	60
18	5'-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT-3'	5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT-3'	172	57

Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa IBM Statistical Package of Social Science (IBM SPSS) versão 21.0, por meio de técnicas de estatística descritiva através de percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão e mediana para as variáveis

numéricas e de técnicas de estatística inferencial através do teste Qui-quadrado de Pearson ou do teste Exato de Fisher quando a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada. A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5% (23,24).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a amostra teve 59 de 90 (65,6%) de participantes do sexo masculino e idades que variaram entre 18 e 69 anos de idade. A média de idade foi de 38,8 anos (desvio padrão de 12,0, mediana de 37,0 e Intervalo de confiança [26,61;51,01]). A renda familiar variou de 1 a 7 salários mínimos (SM), entretanto a média foi de 1,95 SM com desvio padrão de 1,37 SM e mediana igual a 2 SM. Entretanto vale salientar que a maioria dos indivíduos examinados 74 de 90 (82,2%) possuíam renda inferior a 2 salários mínimos e pertenciam a extratos mais pobres da população (Tabela 1).

Quanto as ISTs, 9 de 90 (10%) dos pacientes infectados pelo vírus HIV possuíam outras ISTs associadas, tais como sífilis, 5 de 90 (5,6%), e herpes, 4 de 90 (4,4%) (Tabela 2).

Especificamente sobre a detecção do HPV, 23 de 90 (25,6 %) das amostras evidenciaram a presença da infecção nos indivíduos pesquisados. Os sorotipos 16 e 18 estiveram presente em 8 de 90 (8,9%) de toda a amostra e 8 de 23 (34,7%) se considerando apenas os infectados por HPV. (Tabela 3).

Entre os indivíduos infectados com os sorotipos de alto risco para neoplasias malignas, se destaca a presença do HPV 16 ou 18 mais elevada no sexo feminino, 4 de 31 (12,9%), do que masculino 4 de 59 (6,8%), predominou a faixa etária de 30-49 anos e uma renda inferior a 2 salários mínimos. Não houve associação significativa entre a presença dos sorotipos 16 e 18 e as características sociodemográficas da amostra utilizada neste estudo (Tabela 4).

Os dados obtidos nesta pesquisa buscaram enfatizar a importância da associação entre o HPV e o HIV contribuindo, assim, com a divulgação de importantes achados em saúde pública, dentro e fora do âmbito acadêmico.

Apesar do HPV ser universalmente aceito como agente causal do câncer de colo uterino, apenas mais recentemente foi relacionado ao câncer de cavidade oral e orofaringe (25). Não há um consenso sobre a prevalência ou sobre o poder carcinogênico do HPV, principalmente no que concerne o câncer oral e de orofaringe. Considera-se que esta dúvida persiste porque a maioria dos estudos consegue resultados discrepantes com uma estimativa

de pequeno número de pacientes, e pouca identificação entre os muitos tipos de HPV encontrados em lesões de mucosa (5). Bussoloti et al observou em seu estudo que na mucosa oral normal há uma grande variação nas taxas detectadas de HPVs, podendo variar de 0% até 100% em estudos usando vários métodos e com um número limitado de indivíduos, o que parece depender da população a ser examinada e da escolha do método (31).

Com mais de 100 sorotipos, a literatura ressalta que 4 estão envolvidos em lesões carcinogênicas orais: os tipos 6 e 11 (lesões benignas do epitélio oral) e 16 e 18 (comprovadamente carcinogênicos e possivelmente relacionados a carcinomas epidermóides orais) (26). Estes últimos dois sorotipos têm relação clara com presença de maior agressividade e invasividade nos cânceres cervicais (16).

Em nossa amostra encontramos uma prevalência de 8 de 90 (8,9%) de indivíduos com os sorotipos 16 e 18 do HPV. Em um estudo feito na Austrália, com 249 pacientes HIV positivos, a prevalência foi de 19% dos indivíduos para os subtipos HPV 16 e 18 e 0,8% de prevalência dos mesmos subtipos do HPV em 251 indivíduos HIV negativos. Demonstrando que a co-infecção está ligada principalmente à imunossupressão progressiva (29). Alguns fatores contribuem para aumentar a prevalência do papilomavírus humano na cavidade oral e na orofaringe, como: a queda da defesa imunológica do paciente para com o vírus, a presença de mais de um parceiro sexual e a prática de sexo oral (30). Em um estudo feito por Beder et al, 3,2% de sua amostra com HPV, apresentou a co-infecção pelo vírus da herpes (32). Na amostra estudada, nenhum dos pacientes apresentou relação com esse vírus, apenas 1 de 8 (12.5%) apresentou co-infecção pela sífilis, além do vírus HIV.

A escolha da amostra deveu-se a intenção de maximizar as chances de se encontrar portadores do desfecho de interesse (portadores dos sorotipos considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer), além de relacionar um processo de carcinogênese mais acelerado, como o que ocorre entre mulheres imunocomprometidas portadoras dos sorotipos de alto risco em relação ao câncer de colo uterino (17), pois já é fato comprovado que homens e mulheres imunocomprometidos possuem alto risco de malignidades relacionadas ao HPV (4).

O HPV pode estar associado com a síndrome da reconstituição imune (SIRI). Estima-se que cerca de 10% a 25% dos pacientes com HIV com uma contagem de CD4 muito baixa (< 50 cel/ μ l) e carga viral muito alta que são submetidos a tratamentos com drogas retrovirais apresentem essa síndrome (33). Pois, com a restauração do sistema imune, o organismo passa a lutar agressivamente contra as infecções co-existent, podendo causar manifestações atípicas por agentes oportunistas, provocando acentuada inflamação tecidual (34).

Esquenazi et al. afirmam que o achado de tipos do HPV em epitélio de mucosa oral normal, não permite inferências mais precisas quanto ao seu papel na carcinogênese (agente etiológico principal, coadjuvante ou flora normal), mas admite que este vírus pode ser considerado como um fator de risco para o câncer oral, principalmente quando em pacientes com distúrbios imunológicos. Ressaltam ainda que o fato dos HPV dos tipos 16 e 18 estarem associados às proteínas precoces (E6 e E7) que inibem os genes supressores de tumor (p53 e a pRB) induz ao aumento da velocidade de mitose, o que aumentaria a possibilidade de integração do DNA viral ao celular. Esta condição biológica em particular suporta a tese de que estes sorotipos do HPV seriam fatores etiológicos importantes na histogênese de alguns dos carcinomas da região de cabeça e pescoço (27).

Pode-se questionar se uma prevalência pequena poderia influenciar o planejamento, mas como algumas questões justificam pesquisas que objetivem reduzir ao máximo a prevalência deste tipo de câncer: alta taxa de mortalidade; problema grave e crescente de saúde pública no Brasil, uma parte da população desenvolve o câncer oral sem exposição a fatores de risco consagrados na literatura (tabagismo e álcool), fortalecendo a teoria da infecção por HPV como causa componente (5).

O diagnóstico precoce de uma condição pré-carcinogênica possibilita uma vigilância mais acurada e, assim, a detecção de lesões potencialmente malignas em estágio cujo tratamento seja menos agressivo. Assim, minimizaria os custos referente para o tratamento e reabilitação, além de evitar as sequelas estéticas ou funcionais do aparelho estomatognático. Por outro lado, o diagnóstico tardio resulta no prolongado tempo de internação hospitalar do paciente, ocasionando severo impacto no sistema de saúde (28).

Então, acredita-se que é importante identificar uma prevalência dentro destes pacientes imunocomprometidos e com maior risco de malignização. Cabe salientar também que os pesquisados são frequentemente atendidos por cirurgiões-dentistas, realizando nestas instituições a maioria dos procedimentos odontológicos necessários e recebendo todo tipo de informação sobre a manutenção da saúde oral. Todos os pacientes deste exame não possuíam qualquer sintomatologia clínica e aqueles que foram identificados com os sorotipos 16 e 18 serão acompanhados de mais de perto para evitar a progressão da doença.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O HPV esteve presente em 23 de 90 (25,6%) da amostra estudada e, destes, 8 de 23 (34,7%) dos pacientes infectados pelo HPV apresentavam os sorotipos de alto risco para

cânceres de boca e orofaringe. Outros estudos relacionados com a presença de polimorfismos no gene da interleucina 10 (IL-10) em pacientes co-infectados por HPV E HIV já estão sendo desenvolvidos e podem contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento da pré disposição à infecção na presença do HPV de alto risco em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Diante do exposto, visto que todos os pacientes apresentavam-se assintomáticos, sabe-se que devido à alta prevalência de HPV em pacientes imunocomprometidos, deve-se estabelecer o diagnóstico precoce e a vigilância continuada, com o objetivo de evitar o desenvolvimento de lesões cancerígenas ou detectá-las o mais precocemente possível.

2.5 TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos pesquisados segundo as variáveis: sexo, faixa etária e renda

Variável	N	%
TOTAL	90	100,0
• Sexo		
Masculino	59	65,6
Feminino	31	34,4
• Faixa etária (em anos)		
18 a 29	19	21,1
30 a 49	52	57,8
50 ou mais	19	21,1
• Renda familiar (em salários mínimos)		
Até 1	39	43,3
Mais de 1 a 2	35	38,9
Mais de 2	16	17,8

Tabela 2 – Relação das Infecções Sexualmente Transmissíveis declaradas

Variável	N	% ⁽¹⁾
TOTAL	90	100,0
• DST	90	100,0
• Herpes	4	4,4
• HIV	90	100,0
• Sífilis	5	5,6

(1): Considerando que um mesmo pesquisado poderia apresentar mais de uma DST declarada as somas das frequências não coincidem com os totais.

Tabela 3 – Prevalência do HPV obtida através dos exames de saliva

HVP	N	%
TOTAL	90	100,0
☐ HPV		
Presente	23	25,6
Ausente	67	74,4
☐ HPV 16 e 18		
Presente	8	8,9
Ausente	15	16,7
Sem HPV	67	74,4

Tabela 4 – Avaliação da presença do HPV tipos 16-18 segundo as variáveis: sexo, faixa etária e renda familiar

Variável	Tipo de HPV 16-18								Valor de p
	Sim		Não		Sem HPV		TOTAL		
	N	%	N	%	N	%	n	%	
TOTAL	8	8,9	15	16,7	67	74,4	95	100,0	
• Sexo									
Masculino	4	6,8	11	18,6	44	74,6	59	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,533
Feminino	4	12,9	4	12,9	23	74,2	31	100,0	
• Faixa etária (em anos)									
18 a 29	1	5,3	4	21,1	14	73,7	19	100,0	p ⁽²⁾ = 0,805
30 a 49	6	11,5	7	13,5	39	75,0	52	100,0	
50 ou mais	1	5,3	4	21,1	14	73,7	19	100,0	
• Renda familiar (SM)									
Até 1	3	7,7	9	23,1	27	69,2	39	100,0	p ⁽²⁾ = 0,694
Mais de 1 a 2	3	8,6	4	11,4	28	80,0	35	100,0	
Mais de 2	2	12,5	2	12,5	12	75,0	16	100,0	

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

3. CONCLUSÃO

O vírus HPV esteve presente em 25,6% da amostra estudada e, destes, 34,7% dos pacientes infectados pelo HPV apresentavam os sorotipos de alto risco para cânceres de boca e orofaringe, 16 e 18. Diante do exposto, visto que todos os pacientes apresentavam-se assintomáticos, sabe-se que devido à alta prevalência de HPV em pacientes imunocomprometidos, deve-se estabelecer o diagnóstico precoce e a vigilância continuada, com o objetivo de evitar o desenvolvimento de lesões cancerígenas ou detectá-las o mais precocemente possível. Outros estudos podem contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento da pré disposição à infecção na presença do HPV de alto risco em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gaspar J, Quintana SM, Reis RK, Gir E. Sociodemographic and clinical factors of women with HPV and their association with HIV. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2015;23(1):74-81.
2. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012;285(3):771-7.
3. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone A-M, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)–associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013:djs491.
4. Brickman C, Palefsky JM. Human papillomavirus in the HIV-infected host: epidemiology and pathogenesis in the Antiretroviral Era. *Current HIV/AIDS Reports*. 2015;12(1):6-15.
5. Castro T, Bussoloti Filho I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*, São Paulo. 2006;72(2).
6. Tristão W, Ribeiro RMP, Oliveira CAd, Betiol JC, Bettini JdSR. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2012;78(4):66-70.
7. Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV). *I Consenso Brasileiro de HPV*. 2000;1:01-6.
8. Gravitt PE. The knows of HPV natural history. *The Journal of Clinical Investigation – Scholarly Science Biomedical Impact*. 2011; Dec 1, 121(12):4593-4599.
9. Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2002 (31):14-9.

10. Gross G, Barrasso R. Infecção por papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre Artes Médicas; 1999.
11. Leitão EE, João Filho E, da Mata EC, Nakamura EK, Cavassani MO, Silva IC, et al. Screening of Papillomavirus Gene Sequences in Oral Cancer Patients in the Federal District, Brazil. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*. 2015;6(1).
12. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papilloma virus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *The Lancet*. 1999;354(9172):20-5.
13. Wright Jr TC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):489-90.
14. Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *The Oncologist*. 2005;10(7):528-38.
15. Zeferino LC, Derchain SF. Cervical cancer in the developing world. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2006;20(3):339-54.
16. Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC infectious diseases*. 2010;10(1):326.
17. Fernandes APM, Gonçalves MAG, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do HPV em lesões do colo uterino. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2004;16(1):21-5.
18. Ayres ARG, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Revista de Saúde Pública*. 2010;44(5):963-74.
19. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(32):4294-301.

20. Kuhs KAL, Gonzalez P, Struijk L, Castro F, Hildesheim A, van Doorn L-J, et al. Prevalence of and risk factors for oral human papillomavirus among young women in Costa Rica. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(10):1643-52.
21. Steinau M, Hariri S, Gillison ML, Broutian TR, Dunne EF, Tong Z-y, et al. Prevalence of cervical and oral human papillomavirus infections among US women. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(11):1739-43.
22. Brasil. Instituto Nacional de Câncer - INCA. 2012. Available from: www.inca.gov.br.
23. Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1980.
24. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman and Hall; 1991.
25. Araújo MVdA, Pinheiro HHC, Pinheiro JdJV, Quaresma JAS, Fuzii HT, Medeiros RC. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Belém, Pará State, Brazil, in the oral cavity of individuals without clinically diagnosable injuries. *Cadernos de Saúde Pública*. 2014;30(5):1115-9.
26. Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa AdL. HPV and oral carcinogenesis: a bibliographic review. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2003;69(4):553-9.
27. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho MdGdC, Barros FSd. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2010;76(1):78-84.
28. Soares CP, Malavazi I, Reis RId, Neves KA, Zuanon JAS, Neto CB. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):439-44.
29. Konopnicki D, Wit, SD, Clumeck N. HPV and HIV Coinfection, a complex Interaction resulting in epidemiological, clinical and therapeutic implications. *Future Virology*. 2013; 8(9): 903-915.

30. Herrero R, Castellangue X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P. Human papillomavirus and oral cancer: the international Agency for Research on cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Int* 2003; 95(23): 1772-83.
31. Bussoloti Filho I, Castro, TPPG. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Ver. Bras. Otorrinolaringol.* vol. 72 no. 2 São Paulo Mar./Apr.2006
32. Beder CM, Leão JC, Brasil CMV. Oral and Genital Human Herpesvirus 8 and Human Papillomavirus in heterosexual partners. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2013, 42: 61 – 65.
33. Fernandes RCSC, Araújo LC, Acosta EM. Reativação de HPV genital em paciente infectada pelo HIV associada à Síndrome da Reconstituição Imune. *J. bras. Doenças Sex. Transm* 2008; 20(2): 148 – 150 – ISSN:0103 – 4065.
34. Nadal SR, Manzione CR. Síndrome da Reconstituição Inflamatória Imunológica. *Revista Bras. Colorproct*, 2009; 29(1): 125 – 128.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Artigo traduzido

2.1 INTRODUCTION

Infection with human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted viral infection in the world, of great impact to the public health (1, 2) being associated with almost all cervical cancers, 80-90% of anal cancers and a high proportion of cancer of the oropharynx, vagina, vulva and pênis (3, 4). These virus belong to a large family of small protein adenoviruses without protein envelope formed by a capsid with icosahedral structures of 72 capsomeres, epitheliotropic, about 55 nm in diameter, called Papovaviridae (4, 5).

HPV is transmitted by sexual contact and the risk factors are associated with sexual behavior. Its prevalence has expanded since 1960, a time when the use of oral contraceptives spread at the same time that the use of barrier methods decreased and developments in detecting the virus increased (8, 9). Both men and women are involved in the epidemiological chain, both as carriers, transmitters and infected. Its infection can cause clinical injuries, subclinical and latent ones (6). Infection begins when the virus penetrates the new host, through micro-traumas. The progression of incubation for the active expression depends on three factors: cell permeability, type of virus and the immune status of the host (7).

The virus affects the skin and mucous membranes and can induce the formation of tumors (10). Currently there are more than 100 known types of HPV, which are classified according to their carcinogenic potential: high risk and low risk (11-13). The high-risk types are 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 56, 58, 59 and 69, which tend to lead to malignant tumors. On the other hand, the low risk types are 6, 11, 43 and 44, which usually originate benign tumors (11, 14, 15). HPV 16 is responsible for most cases of invasive cancer in the world and the prevalence of HPV 18 is lower (12, 13) not being however less severe (16, 17).

Brazil is a world leader in incidence of HPV, about 500,000 to 1 million new cases each year, with women between 15 and 25 years the population more infected (1, 6) and the studies of prevalence of HPV infection published in Brazil analyzed data from women primarily by the high ratio of HPV in cervical cancer or treatment (18), and not those who are associated with sexually transmitted infections (STIs), such as the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and sífilis (19). In fact, regardless of gender, people with HIV are at high risk for developing malignant lesions, apart from the fact that with the evolution of antiretroviral

therapy that tend to increase longevity, co-infections with HPV are of growing concern because they worsen the quality of the acquired longevity (4).

As for oropharyngeal cancer, although global data reporting an increased incidence of cases and its relationship with HPV, little is known about the epidemiology of human papillomavirus infection, mainly in Latin America (19, 21). The most frequent tumor is oral squamous cell carcinoma and its etiology has been implicated in smoking habits, alcohol abuse, and the existence of pre-malignant lesions originated by HPV in the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx (11).

Oral cancer has been ignored, despite scientific evidence that progression has increased in recent years and can be enhanced in immunocompromised patients and patients with other STDs (19). According to the National Cancer Institute (INCA), in Brazil, oral cancer is the fifth cancer in incidence among men. For women, it is the ninth most common in the Northeast (3.72 / 100,000) and Southeast (4.88 / 100,000). The North region (1.6 / 100,000) occupies the 11th position, while in the Midwest (3.3 / 100,000) and South (3.09 / 100,000), are respectively, the 12th and the 15 more incident. In men, cancer of the oral cavity is the fourth most common in the Northeast (7.1/100,000) and Southeast (15.4/100,000). The Central West Region (8.1/100,000), ranked fifth, while in the South (15.2/100,000) and North (3.2/100,000), is the sixth most common. The incidence rates for oral cavity cancer related to HPV infection, such as tonsil, base of the tongue and oropharynx, are increasing among the population of young adults in both sexes (22).

Thus, this study aimed to identify the high-risk HPV presence (subtypes 16 and 18) in HIV-positive patients treated in two reference centers in Recife / PE, Brazil.

2.2 MATERIALS AND METHODS

Study design and selection of the study sample

This is a type of observational cross-sectional study which evaluated 90 individuals of both sexes, between the months of June and December 2014 who were treated at two centers of references, Correia Picanço Hospital and Lessa de Andrade Polyclinic, in the city of Recife-PE, Brazil. All the evaluated individuals must be carriers of the HIV virus and be over the age of 18 years.

This project was approved by the Ethics Committee on Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, in the opinion No. 655,899 on May 28, 2014 and followed the precepts of the Resolution No. 466/2012. All study participants were informed about the research purpose and signed the Informed Consent before any procedure to run and could withdraw from the study at any time.

After consent, an interview was conducted with a focus on socio-demographic characteristics (sex, age, skin color and marital status) and medical history of the patient.

Obtaining samples and DNA extraction

Saliva samples were collected using falcon tubes and mouth rinse with 5% sucrose. Samples were identified and stored in a freezer at - 20 ° C until the time of testing.

The DNA was extracted from saliva samples from the participants using the QIAamp DNA kit (Qiagen®) according to the manufacturer's specifications. After extraction, the DNA was kept at -20 ° C until processing by the polymerase chain reaction technique (PCR). The detection and genotyping the HPV was performed by standard PCR.

Processing by PCR and detection of viral DNA

By the polymerase chain reaction technique (in English PCR) using the Master Mix reagent kit (Promega, USA) was performed to detect HPV DNA in the samples. Firstly, an amplification of the human globin gene was carried out to certify the quality of the samples analyzed with specific primers PC04 and GH20 and later amplification with MY09 and MY11 primers, for both follow the protocol: 1X GoTaq Green Master Mix, 1.0 pmol of each primer and ~ 200ng template DNA. The cycling of PCR was: 95 ° C for 5 min, 34 cycles of denaturation at 95 ° C for 40 sec, annealing at 56 ° C for 40 sec and extension at 72 ° C for 40 sec, followed by a final extension of 78 ° C for 8 min with the expected band of 450 base pairs.

For negative samples a new reaction was performed with the internal primers HPV (GP5 + / 6 +), reaction conditions followed the following protocol: 1X Gotaq® Green Master Mix (Promega), 1.0 pmol of each primer and ~200ng DNA template. The PCR cycling was: 94 ° C for 35 seg, 35 cycles of denaturation at 95 ° C for 35 sec, annealing at 41 ° C for 40 sec and 72 ° C for 45 sec, followed by a final extension at 72 ° C for 4 min. Then, amplicons were mixed with loading buffer, applied to an agarose 1% gel, separated electrophoretically and subsequently visualized under ultraviolet light in the presence of the dye gelRed DNA.

Typing of HPVs 16 and 18

For typing of HPV types 16 and 18, all HPV-positive samples were amplified with the specific primers shown in Table 1. Subsequently, the products generated were stained with the DNA binding gel Red, applied on a 1% agarose gel, and visualized under UV light after electrophoretic separation. All reactions were performed as above only by changing the annealing temperature (Table 1) corresponding to each primer and had a positive control and a negative control without DNA.

Table 1: Primers corresponding to each type of HR-HPV

HPV	Primer sense	Primer antisense	Product	T (°C)
16	5'-GTC AAA AGC CAC TGT GTC CT-3'	5'-CCA TCC ATT ACA TCC CGT AC-3'	499	60
18	5'-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT-3'	5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT-3'	172	57

Stati
stica
I

analysis

Data were analyzed by IBM Statistical Package of Social Science program (SPSS) version 21.0, using descriptive statistical techniques through percentages for categorical variables and measures: average, standard deviation and median for numerical variables and techniques of inferential statistics through Pearson or Fisher's exact chi-square test when the condition to use the Chi-square test was not verified. The margin of error used in the statistical tests was 5% (23, 24).

2.3 RESULTS & DISCUSSION

In this study, the sample had 59 of 90 (65.6%) of male participants and ages ranging between 18 and 69 years of age. The average age was 38.8 years (standard deviation of 12.0, median 37.0 and confidence interval [26.61, 51.01]). Family income ranged 1-7 minimum wages (SM), though the average was 1.95 SM with standard deviation of 1.37 and a median of SM 2 SM. However it is worth pointing out that most individuals examined 74 of 90 (82.2%) had incomes of less than two minimum wages and belong to the poorest strata of the population (Table 1).

As to STIs, 9 of 90 (10%) of patients infected with HIV had other associated STIs such as syphilis, 5 of 90 (5.6%), and herpes, 4 of 90 (4.4%) (Table 2). Specifically on detection of HPV, 23 of 90 (25.6%) of the samples showed the presence of infection in individuals surveyed. Serotypes 16 and 18 were present in 8 of 90 (8.9%) of the whole sample and 8 of 23 (34.7%) considering only infected by HPV. (Table 3).

Among individuals infected with high-risk serotypes for malignancies, stands out the presence of HPV 16 or 18 higher in females, 4 of 31 (12.9%) than male 4 of 59 (6.8%), predominated the age group of 30-49 years and with an income below 2 minimum salaries. There was no significant association between the presence of serotypes 16 and 18 and socio-demographic characteristics of the sample used in this study (Table 4).

The data obtained in this study sought to emphasize the importance of the association between HPV and HIV, thus contributing to the dissemination of important findings in public health, within and outside the academic sphere.

Although HPV is universally accepted as an etiologic agent of cervical cancer, only recently it has been linked to cancer of the oral cavity and oropharynx (25). There is no consensus on the prevalence or the carcinogenic power of HPV, particularly regarding oral and oropharynx cancer. It is considered that this doubt persists because most studies can get discrepant results with an estimated small number of patients, and little identification among many types of HPV found in mucosal lesions (5). Bussoloti et al observed in his study that, in the normal oral mucosa, there is great variation in the rates of detected HPV, ranging from 0% to 100% in studies using different methods and with a limited number of individuals, which seems to depend on the population studied and the choice of method (31).

With more than 100 serotypes, the literature points out that four are involved in oral carcinogenic injuries: types 6 and 11 (benign lesions of the oral epithelium) and 16 and 18 (proven carcinogenic and possibly related to oral squamous cell carcinoma) (26). The latter two serotypes are clearly related to the presence of increased aggressiveness and invasiveness in servical cancers (16).

In our sample we found a prevalence of 8 of 90 (8.9%) of individuals with serotypes 16 and 18 of HPV. In a study done in Australia, with 249 HIV-positive patients, the prevalence was 19% of subjects for HPV subtypes 16 and 18 and 0.8% prevalence of these HPV subtypes in 251 HIV-negative individuals. Demonstrating that co-infection is linked mainly to progressive immunosuppression (29). Some factors contribute to increase HPV prevalence in the oral cavity and oropharynx, as the fall of the immune defense of the patient

with the virus, the presence of more than one sexual partner and the practice of oral sex. (30). In a study by Beder et al, 3.2% of their sample with HPV, presented co-infection with the herpes virus. (32). In this sample, none of the patients were related to this virus, only 1 of 8 (12.5%) had co-infection with syphilis, besides the HIV virus.

The choice of the sample was due to the intention of maximizing the chances of finding carriers with the outcome of interest (holders of serotypes considered high risk for developing cancer), and relate a faster process of carcinogenesis, as occurs among immunocompromised women with high-risk serotypes in relation to cervical uterine cancer (17) as it is already a proven fact that immunocompromised men and women are at high risk of malignancies related to HPV (4).

HPV may be associated with the immune reconstitution syndrome (IRIS). It is estimated that about 10% to 25% of patients with HIV with a CD4 very low count (<50 cells / uL), and high viral load are subjected to treatment with antiretroviral drugs show this syndrome. (33). For, with the restoration of the immune system, the body begins to fight aggressively against co-existing infections which may cause atypical manifestations by opportunistic agents, causing severe tissue inflammation (34).

Esquenazi et al. claim that the finding of HPV types in normal oral mucosa epithelium does not allow more accurate inferences about its role in carcinogenesis (main agent, reinforcing or normal flora), but admits that this virus can be considered as a risk factor for oral cancer, especially when in patients with immune disorders. They point out also that the fact that HPV types 16 and 18 are associated with early proteins (E6 and E7) which inhibit tumor suppressor genes (p53 and pRB) induces an increase in the mitotic rate, which would increase the possibility of integration the viral DNA to the cell. This biological condition in particular supports the thesis that these serotypes of HPV are important etiological factors in histogenesis of some carcinomas of the head and neck (27).

One can question whether a small prevalence could influence the planning, but as some issues justify research that aim to reduce to a minimum the prevalence of this cancer: high mortality rate; serious and growing public health problems in Brazil, part of the population develops oral cancer without exposure to risk factors established in the literature (tobacco and alcohol), strengthening the theory of HPV infection as a component cause (5).

Early diagnosis of a pre-carcinogenic condition enables a more accurate monitoring and thus the detection of potentially malignant lesion stages in which treatment is less

aggressive. Thus it would minimize the costs related to the treatment and rehabilitation, in addition to avoiding the aesthetic or functional sequelae of the stomatognathic system. On the other hand, the late diagnosis results in prolonged hospital admission of the patient, causing severe impact on the health system (28).

So it is believed that it is important to identify the prevalence within these immunocompromised patients with higher risk of malignancy. It should also be noted that respondents are often assisted by dental surgeons performing in these institutions the most needed dental procedures and receiving all kinds of information on the maintenance of oral health. All patients in this test did not have any clinical symptoms and those who have been identified with serotypes 16 and 18 will be closely monitored to prevent progression of the disease.

2.4 FINAL CONSIDERATIONS

HPV was present in 23 of 90 (25.6%) of the samples and of these, 8 of 23 (34.7%) of HPV-infected patients had serotypes at high risk for oral and oropharyngeal cancers. Other studies related to the presence of polymorphisms in the interleukin gene 10 (IL-10) in patients co-infected with HPV and HIV are already being developed and can contribute to a better understanding of the predisposition developing the infection of HPV presence of high risk in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Given the above, since all the patients presented themselves as asymptomatic, it is known that due to the high prevalence of HPV infection in immunocompromised patients, one must establish early diagnosis and continued monitoring, in order to prevent the development of cancerous lesions or detect them as early as possible.

PRONTUÁRIO Nº: _____

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

PRONTUÁRIO CLÍNICO

ARQUIVO DO GRUPO DE PESQUISAS EM ESTOMATOLOGIA

ANAMNESE

IDENTIFICAÇÃO**Dados pessoais:**

Nome: _____
Data de nascimento: _____ Sexo: () Feminino () Masculino
Est.Civil: _____ Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____
Escolaridade: _____ Renda (*em salários*): _____
Endereço: _____ nº: _____
Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____
Telefone(s) para contato: _____
Referência pessoal: _____ Fone: _____

HISTÓRIA MÉDICA**Antecedentes familiares:**

Condição Sistêmica

Tipo(s) de DST (Doença sexualmente transmissível): _____

Há quanto tempo tem a doença: _____

Forma de transmissão: _____

Tempo de tratamento: _____

Possuem vida sexual ativa: () Sim () Não

Uso de preservativo durante a relação sexual: () Sim () Não

Queixa de alguma alteração bucal: () Sim () Não

Se sim, há quanto tempo: _____

Medicações tomadas: _____

Possui algum parente com DST? Quem: ? _____

OBS: _____

	História médica	SIM	NÃO	DETALHES
SCV	Doença do coração, Hipertensão, Angina, Cirurgia cardíaca, Febre reumática, Hemorragia, Anti-coagulante, Anemia			
SR	Asma, Bronquite, Tuberculose			
GU	Problema renal, DST (sífilis, herpes, HPV), Gravidez, Menstruação, Pílula			
GI	Hepatite, Crohn, Colite Ulcerativa, Úlcera			
SNC	Visão, Audição, AVC, Parkinson, Problema psiquiátrico, Epilepsia			
END	Diabetes, Tireóide			
Outros	Doença de pele, Outras condições não mencionadas			

HÁBITOS	Presen te	Passa do	Nunc a	Idade início	Idade que parou	Consumo Médio
Consumo de álcool						unidade/sem
Fumo						unidade/dia
Outros						

EXAME FÍSICO EXTRA-ORAL

Normal

- () ATM _____
 () Tecido da Face _____
 () Olhos _____
 () Lábios _____
 () Outros _____

Normal

- () Linfonodos _____
 () Tireóide _____
 () Glândulas Salivares _____

EXAME FÍSICO INTRA-ORAL

Normal

- () Lábios _____
 () Mucosa Jugal _____

Normal

- () Língua _____
 () Assoalho Bucal _____

() Palato_____

() Gengiva_____

LESAO () Sim () Não

Localização_____

Cor:_____

Superfície:_____

Consistência:_____

Tamanho:_____

Tempo de evolução:_____

Sintomatologia:_____

Qual_____

() Macular

() Nodular

() Séssil

() Vesículo-bolhosa

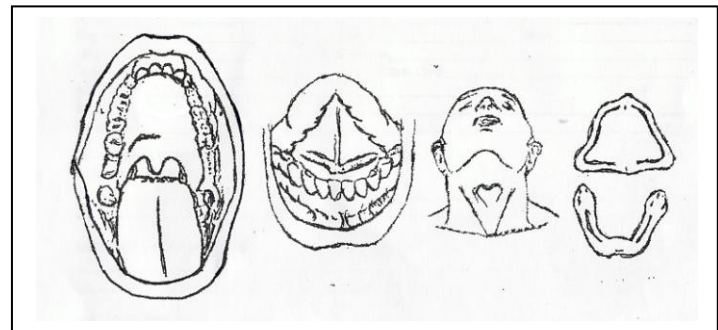
() Papular (até 5mm)

() Papilar

() Pedunculad

() Ulcerada

Descrição do Caso (mais detalhes)



Diagnóstico Provisório:_____

ASS. VOLUNTÁRIO:_____ ASS.: PESQUISADOR:_____

APÊNDICE 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Avaliação da prevalência do papilomavírus humano (HPV) de alto risco para câncer oral em pacientes portadores de infecção sexualmente transmissível na cidade do Recife – PE** que está sob a responsabilidade da pesquisadora Karinne Silva Azevedo, cujo endereço é Rua Sá e Souza, número 1031, apto 702, Boa Viagem – Recife, CEP: 51130-050, Telefone: 81 88336034, email: k_azevedobr@yahoo.com.br, para contato do pesquisador responsável e está sob a orientação do professor Jair Carneiro Leão, (81) 2126-8817 (Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da UFPE);

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- ☐ O objetivo deste trabalho é identificar a presença do HPV de alto risco em pacientes portadores de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) atendidos em centros de referência para tratamento de ISTs no município de Recife/PE. Será realizada uma entrevista com intuito de coletar dados referentes a características sócio-demográficas como sexo, idade, cor da pele e estado civil, além de perguntas sobre a história médica e saúde geral do paciente. Para diagnóstico e confirmação da presença do HPV, serão realizadas a coleta de saliva e coleta de sangue
- ☐ A participação do sujeito da pesquisa será uma única vez, onde será feita a coleta de dados, de saliva e sangue do paciente.
- ☐ Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de constrangimento ao responder o questionário e, na coleta do sangue, o risco de hematoma e desconforto. Caso fique com hematomas, o paciente deverá colocar uma compressa fria na área afetada.
- ☐ Os participantes desta pesquisa receberão orientações sobre a higiene bucal, além de orientações para prevenção e tratamento das lesões orais e doença periodontal bem como, uma vez diagnosticadas, serão encaminhados para o serviço de Estomatologia da UFPE para a

realização do referido tratamento. Caso alguma alteração seja encontrada na boca, será tratada adequadamente. E os achados dessa pesquisa podem contribuir muito aperfeiçoando as estratégias de prevenção, promoção e recuperação da saúde para a população, implicando assim em maior qualidade de vida para os pacientes

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, entrevistas, ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço Rua Sá e Souza, número 1031, apto 702 - Boa Viagem, Recife - CEP: 51130-050, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Avaliação da prevalência do papilomavírus humano (HPV) de alto risco em pacientes portadores de infecção sexualmente transmissível na cidade do Recife – PE** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou perda da assistência e/ou tratamento.

Recife, ____/____/____



Assinatura do participante / Impressão digital (opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Testemunhas:

Nome1:_____

Assinatura1:_____

Nome2:_____

Assinatura2:_____

ANEXO

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) DE ALTO RISCO EM PACIENTES PORTADORES DE INFECÇÃO SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL NA CIDADE DO RECIFE - PE

Pesquisador: Karinne Silva Azevedo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30260914.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 655.899

Data da Relatoria: 28/05/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

S/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 655.899

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação " e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO 2 – Normas do Journal of Oral Pathology and Medicine

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Authors are encouraged to visit [Wiley Blackwell Publishing Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged and any potential grant holders should be listed. Please see **Conflicts of Interest** for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of

an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Anne-Marie Engel at ame@dadlnet.dk

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* will be reviewed by two experts in the field. *Journal of Oral Pathology & Medicine* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Journal of Oral Pathology & Medicine attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, the name and current email address of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript is requested. Additionally, you may mention non-preferred reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

Review Papers: *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

Case Reports: Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts submissions of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. They should not exceed three pages.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and

methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see [Conflicts of Interest](#) for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

Examples of the Journal's reference style:

(1) Standard journal article

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)

BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 688-97.

HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 85-9.

(2) Corporate author

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1992; 339: 1007-12.

(3) No author given

Anonymous. 'The importance of being early' [leader]. *Br Dent J* 1991; 170: 167.

(4) Journal supplement

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: suppl. (208): 35-50.
CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. *J Pathol* 1992; 168: 117A (abstr).

(5) Journal paginated by issue

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. *Dent Historian* 1992; 22: (May): 31-4.

(6) Book

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

(7) Chapter in a book

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. *Oral diseases in the tropics*. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

(8) Published proceedings paper

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. *World workshop on oral medicine*. Chicago: Year Book Medical, 1989; 5-11.

(9) Agency publication

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

(10) Dissertation or thesis

CHUNG PANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.4 Offprints

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the

service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

6.5 Author Services

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.