

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

NATÁLIA SOTERO MACHADO PIRES

APLICAÇÃO DA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA NA AVALIAÇÃO DO
COMPROMETIMENTO DA MUCOSA LABIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA

VIRTUS IMPAVIDA

RECIFE-PE
2016

NATÁLIA SOTERO MACHADO PIRES

APLICAÇÃO DA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA NA AVALIAÇÃO DO
COMPROMETIMENTO DA MUCOSA LABIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Dissertação apresentada à banca da Pós-Graduação em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Stevens
Leonidas Gomes

Co-Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Andrea Tavares
Dantas e Prof^a. Dr^a. Daniela da Silva Feitosa

Linha de pesquisa: Avaliação clínica e
laboratorial em odontologia

RECIFE-PE
2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- P667a Pires, Natália Sotero Machado.
Aplicação da tomografia por coerência óptica na avaliação do comprometimento da mucosa labial na esclerose sistêmica / Natália Sotero Machado Pires. – 2016.
63 f.: il.; 30 cm.
- Orientador: Anderson Stevens Leonidas Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Reumatologia. 2. Esclerose sistêmica. 3. Tomografia de coerência óptica. 4. Mucosa oral. I. Gomes, Anderson Stevens Leonidas (Orientador). I. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-038)

NATÁLIA SOTERO MACHADO PIRES

**“APLICAÇÃO DA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA NA AVALIAÇÃO
DO COMPROMETIMENTO DA MUCOSA LABIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA”**

Aprovado em 07 de dezembro de 2016

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. **ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES**

Co-orientação: Profa. Dra. **ANDRÉA TAVARES DANTAS**

3º

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco/ Dept. de Clínica e Odontologia
Preventiva

2º

Profª Drª ANGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco/ Dept. de Clínica Médica

1º

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco/ Dept. de Clínica e Odontologia
Preventiva

Recife, 2016

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sempre estar presente na minha vida e por me fazer acreditar que sou capaz.

À minha **Família**, em especial meus pais, pelo amor, carinho, paciência e confiança.

Ao meu marido, **Thiago Pires**, pelo apoio e incentivo diário para seguir em frente e concluir mais essa etapa do meu ciclo profissional.

Ao meu grande orientador (e muitas vezes pai e sempre amigo), **Prof. Anderson Gomes**, por sonhar e sofrer comigo, por ter caminhado sempre ao meu lado de mãos dadas. Você é um exemplo a ser seguido e quero deixar registrado toda a minha gratidão a você.

À **Prof.^a Daniela Feitosa** pelo seu conhecimento e olhar crítico que foram fundamentais para elaboração deste trabalho.

À **Dra. Angela e Dra. Andrea** pelas idéias inspiradoras, pela receptividade no HC e pela disponibilidade em sempre me ajudar. Vocês foram fundamentais.

À Família **Labfoton** que sempre estiveram em prontidão para me ajudar e me trouxe grandes amigos. Um agradecimento especial à **Emery, Paloma, Luciana, Tereza, Patrícia e Cláudia**.

À **Luana Osório** pelas horas extras dedicadas em todo o decorrer do meu trajeto. Obrigada por tudo!

À **Marcello Magri** pela ajuda com a análise das imagens e pela paciência.

Aos **professores da pós-graduação** pelos ensinamentos.

Ao **CNPQ** pela bolsa de estudo que foi de grande ajuda durante esse processo.

Ao **Prof. José Aleixo** pela disponibilidade e ajuda com a estatística do presente estudo.

Aos **voluntários** que contribuíram de forma significativa para a execução do trabalho.

Aos funcionários **Ozi, Tamires e Tânia** pela paciência e eterna disponibilidade em ajudar.

À todos vocês, meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A esclerose sistêmica (ES) é uma desordem crônica do tecido conjuntivo caracterizada pela fibrose da pele, dos vasos sanguíneos e de alguns órgãos, geralmente diagnosticada em estágio avançado, a partir de manifestações clínicas, associadas a exames complementares. Diante deste quadro, faz-se necessária a utilização de novos métodos de diagnóstico que possam contribuir para a identificação precoce da patologia. Dessa forma, esse estudo teve por objetivo avaliar as características qualitativas e quantitativas da mucosa do lábio inferior utilizando a Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e sua associação com parâmetros clínicos em pacientes com ES. Trata-se de um estudo clínico observacional com 68 voluntários: 33 portadores de ES (GES), que preencheram os critérios ACR/EULAR, 18 da forma cutânea limitada (FL) e 15 da difusa (FD), sendo 28 do sexo feminino com média de idade de 46,1 anos, recrutados do serviço de Reumatologia do HC-UFPE. O grupo controle (GC) foi constituído de 35 indivíduos saudáveis, sendo 28 do sexo feminino com média de idade de 39,2 anos. Todos eles foram submetidos a avaliação da mucosa labial inferior pelo OCT. As imagens passaram por um processamento computacional com o programa Matlab, medindo a densidade óptica, e medidas da espessura das camadas em μm e quantidade de pixel nos tons de cinza foram realizadas utilizando o ImageJ. Para análise estatística, os dados foram tabulados em Excel e analisados pelo SYSTAT 9.0 Version Demo, considerando o valor estatístico significativo de $p < 0.05$. Observou-se que a densidade óptica em 300 μm de profundidade foi maior nos pacientes com ES quando comparado com o GC (0.87 e 0.82, respectivamente), $p = 0.016$. A espessura do epitélio da mucosa labial no GES e no GC foi de 290.90 μm e de 442.63 μm , respectivamente, com $p < 0.0001$, e a quantidade de pixels encontrada no tom de cinza 96 da camada externa foi de 315.79 pixels (GES) e 576.71 pixels (GC), $p < 0.0001$, e da camada total, 764.27 pixels (GES) e 1013.14 pixels (GC), $p = 0.0001$. Não houve diferença estatística significativa na espessura do epitélio obtida, pelo OCT entre as fases precoce e estabelecida nas formas FL ($p = 0.9$) e FD ($p = 0.4$), podendo-se inferir que, mesmo na fase precoce, independente da forma clínica, os pacientes já apresentam alterações no espessamento deste epitélio similar com as fases de diagnóstico estabelecido. Nas correlações com os parâmetros tempo de doença, forma clínica, escore de Rodnan modificado, fenômeno de Raynaud,

úlceras digitais, doença pulmonar intersticial, hipertensão arterial pulmonar, disfunção esofágica e envolvimento músculo esquelético, não foi encontrada associação estatística. Desta forma, conclui-se que a avaliação da mucosa com o OCT mostrou características que a difere entre os grupos GC e GES, e acredita-se que, em analogia com a utilização do escore de Rodnan modificado para determinação do espessamento da pele no diagnóstico precoce e resposta terapêutica da ES, a identificação do envolvimento da mucosa labial possa ser um método complementar com igual importância.

Palavras-chave: Reumatologia. Esclerose Sistêmica. Tomografia de Coerência Óptica. Mucosa Oral.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic connective tissue disorder characterized by fibrosis of the skin, blood vessels and some organs, usually diagnosed at an advanced stage, from clinical manifestations associated with complementary exams. In view of this situation, it is necessary to use new diagnostic methods that may contribute to the early identification of the pathology. The aim of this study was to evaluate the qualitative and quantitative characteristics of the inferior labial mucosa using Optical Coherence Tomography (OCT) and its association with clinical parameters in SSc patients. This is an observational clinical study with 68 volunteers: 33 SSc patients, who met the ACR/EULAR criteria, 18 of the limited cutaneous (lcSSc) and 15 of the diffuse cutaneous (dcSSc) forms, of which 28 were women with a mean aged 46.1 years, recruited from the HC-UFPE Rheumatology Department. The healthy control (HC) consisted of 35 healthy individuals, being 28 females with a mean age of 39.2 years. All of them underwent evaluation of the inferior labial mucosa by OCT. The images underwent computational processing with the Matlab program, measuring the optical density, and measurements of the thickness of the layers in μm and number of pixels in the shades of gray were performed using ImageJ. For statistical analysis, the data were tabulated in Excel and analyzed by the SYSTAT 9.0 Version Demo, considering the statistical significance of $p < 0.05$. It was observed that the optical density at 300 μm depth was higher in SSc patients when compared to HC (0.87 and 0.82, respectively), $p = 0.016$. The thickness of the labial mucosa epithelium in SSc and HC was 290.90 μm and 442.63 μm , respectively, with $p < 0.0001$, and the number of pixels found in the shade of gray 96 of the outer layer was 315.79 pixels (SSc) and 576.71 pixels (HC), $p < 0.0001$, and the total layer, 764.27 pixels (SSc) and 1013.14 pixels (HC), $p = 0.0001$. There was no statistically significant difference in the thickness of the epithelium obtained by OCT between the early and established phases in the lcSSc ($p = 0.9$) and dcSSc ($p = 0.4$) forms, and it can be inferred that, even in the early phase, independent of the clinical form, patients already present alterations in the epithelium thickening similar with the established diagnostic phases. In the correlations with the parameters of disease duration, clinical form, modified Rodnan score, Raynaud phenomenon, digital ulcers, interstitial lung disease, pulmonary arterial hypertension, esophageal dysfunction and musculoskeletal involvement, no statistical association was found. Thus, it is

concluded that the evaluation of the mucosa with the OCT showed characteristics that differ between HC and SSc groups, and it is believed that in analogy with the use of the modified Rodnan score to determine skin thickening in the early diagnosis and the therapeutic response of ES, the identification of the involvement of the labial mucosa may be a complementary method with equal importance.

Keywords: Rheumatology. Sclerosis Systemic. Optical Coherence Tomography. Oral Mucosa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 01	Imagens comparativas de tomografia por coerência óptica (OCT) da região do antebraço, mostrando alterações estruturais nas camadas da pele entre pacientes saudáveis e com esclerose sistêmica (ES)	20
Fig. 02	Imagem ilustrativa do Interferômetro de Michelson, demonstrando o percurso do feixe de luz para formação da imagem na tomografia por coerência óptica (OCT)	22
Fig. 03	Ilustração do A-scan, que representa a luz retroespalhada em profundidade de um único ponto, e B-scan, o mapa bidimensional do feixe de prova varrido transversalmente	22
Fig. 04	Swept Source - OCT (SS-OCT) da Thorlabs operando em 1325 nm de comprimento de onda (modelo do tomógrafo utilizado no estudo)	23
Fig. 05	Imagens da mucosa oral mostrando a semelhança entre as estruturas visualizadas nas a) biópsia óptica, com o auxílio da tomografia por coerência óptica, e b) biópsia tradicional.	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	Esclerose Sistêmica	13
2.2	Tomografia por Coerência Óptica	20
	REFERÊNCIAS	25
	APÊNDICES	
	A - Article to be submitted to Annals of the Rheumatic Diseases	31
	B - Instrumento de Coleta de Dados	47
	ANEXO	
	A - Parecer Consubstanciado do CEP	51
	B - Normas da Revista	55

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação apresenta-se em forma de artigo, com uma breve revisão da literatura sobre o assunto abordado, e segue com o artigo que será submetido à revista *Annals of the Rheumatic Diseases* (IF 12.3 e Qualis A1 Medicina), contendo a metodologia, os resultados e a discussão do estudo desenvolvido para a obtenção do grau de mestre.

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumatológica rara, crônica, autoimune, caracterizada pela fibrose da pele, dos vasos sanguíneos e de alguns órgãos, como o pulmão, o rim, o coração e o trato gastrointestinal. Por isso, apresenta um quadro clínico que varia muito em gravidade e prognóstico (FISCHER; PATTON, 2000). Histologicamente, a microscopia revela deposição difusa de colágeno denso dentro e ao redor das estruturas normais, resultando na perda da função normal do tecido (NEVILLE et al., 2004).

Algumas doenças reumáticas, como a ES, apresentam manifestações mucocutâneas. Geralmente, as alterações são consequências de alterações sistêmicas e manifestam-se de forma insidiosa, podendo apresentar sinais e sintomas na cavidade oral. Contudo, a abordagem bucal na ES parece que ainda não despertou de forma adequada o interesse científico. Os artigos evidenciam que o dentista pode atuar no diagnóstico da ES, uma vez que esses pacientes apresentam manifestações orais relacionadas a doença e limitações que dificultam a higiene oral e o atendimento odontológico (ABRÃO et al., 2016).

A literatura relata que alterações orais como microstomia, maior número de dentes perdidos, maior prevalência de doenças periodontais, xerostomia e reabsorção óssea na mandíbula são comuns nesses pacientes (ALBILIA et al., 2007; NAGY et al., 1994; VINCENT et al., 2010; BARON et al., 2014; NEVILLE et al., 2004; LEUNG et al., 2011).

O diagnóstico da ES é estabelecido a partir das manifestações clínicas, associadas a exames complementares. Em um paciente que se apresenta com espessamento cutâneo e manifestações viscerais características, o diagnóstico é claro, porém, geralmente tardio e, dessa forma, muitas vezes sem possibilidade de intervenção terapêutica efetiva. Esforços têm sido empreendidos para uma identificação mais precoce da doença, com o objetivo de estabelecer um tratamento em fase inicial e tentar prevenir o desenvolvimento de danos irreversíveis.

Portanto, a ES trata-se de uma condição que pode levar a morte, principalmente pelo envolvimento cardiopulmonar (TOLLE, 2008; CO; BLOCK; SEQUEIRA, 2000; STEEN; MEDSGER, 2007; COGHLAN; MUKERJEE, 2001) e apresenta grandes desafios para a comunidade médica quanto ao seu diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Apresenta alterações na região oral e na face que merecem ser melhor investigadas, podendo possibilitar um diagnóstico mais precoce da doença e, como consequência, um aumento na perspectiva de vida desses pacientes. Além disso, tem um profundo impacto na higiene oral, o que torna seu estudo na área odontológica de importante valor.

A técnica de OCT proporciona a aquisição de imagens de alta resolução espacial ($<10\mu\text{m}$) baseada na interferência entre dois feixes de luz de baixa coerência (WILDER-SMITH et al., 2007). É composto basicamente por um interferômetro do tipo *Michelson* iluminado com fonte de luz de baixa coerência, em que a largura espectral é da ordem de dezenas a uma centena de nanômetros (FERCHER et al., 2003).

É uma técnica de particular importância por proporcionar diagnósticos *in vivo*, de modo não invasivo e em tempo real. A imagem resultante de um corte transversal tecidual possui resolução semelhante à microscopia óptica. Por tal motivo, alguns autores denominam a técnica de “biópsia óptica”. Com isso, não há necessidade de excisão e processamento das amostras como na biópsia convencional e histopatologia (HSIEH et al., 2013; FERCHER et al., 2003; FARAH, 2006).

Neste contexto, técnicas para diagnóstico, classificação e acompanhamento clínico dessa doença precisam ser aprimoradas e a Tomografia por Coerência Óptica (OCT, sigla em inglês para *Optical Coherence Tomography*) apresenta-se como um método promissor para tal.

Esse estudo teve por objeto avaliar as características qualitativas e quantitativas da mucosa do lábio inferior utilizando o OCT e sua associação com parâmetros clínicos em pacientes com ES.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Esclerose Sistêmica

Esclerodermia origina das palavras gregas "skleros" (que significa "duro") e

"derma" (que significa "pele"). É um termo utilizado para descrever qualquer forma de fibrose da pele e pode ser dividida na forma localizada, com comprometimento restrito à pele e mais comum em crianças, e na forma sistêmica (Esclerose Sistêmica - ES), com acometimento de pele e de órgãos internos (ALBILIA et al., 2007).

A ES é uma doença de início geralmente insidioso, clinicamente heterogênea, de causa desconhecida, com evidências científicas para participação de fatores genéticos e ambientais (agentes infecciosos, físicos e químicos), patogênese extremamente complexa e tem um componente auto-imune proeminente. Caracteriza-se por inflamação e hiper-reatividade vascular da micro e macro circulação associadas à deposição excessiva de colágeno nos tecidos, com consequente fibrose da pele e/ou órgãos internos, apresentando gravidade e prognóstico variáveis (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; TAMBY et al., 2003; JIMENEZ; DERK, 2004).

A literatura relata muitas variações geográficas na prevalência, de 07/milhão (Japão) a 489/milhão (Itália) de habitantes. Não existem dados oficiais para o Brasil. A susceptibilidade à doença varia de acordo com sexo, idade e raça. Ocorre com mais frequência nas mulheres, com pico de incidência na faixa etária entre os 30 e 50 anos de idade. Vários estudos epidemiológicos sugerem que os indivíduos negros têm maior probabilidade de ter manifestações viscerais graves do que os brancos, além de um pior prognóstico e maior prevalência (REVEILLE, 2003; CHIFFLOT et al., 2008).

Disfunções em pelo menos três tipos de células (fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune, principalmente os linfócitos T e B) estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento das manifestações patológicas da doença: fibrose cutânea e visceral progressiva; obliteração do lúmen de pequenas artérias e arteríolas; anormalidades imunológicas humoral e celular, produzindo auto-anticorpos, infiltração de células mononucleares nos tecidos afetados e a desregulação na produção de citocinas e quimiocinas (JIMENEZ; DERK, 2004).

A fibrose progressiva do tecido cutâneo e vascular ocorre por deposição de quantidades excessivas de colágeno tipo I e III e de outras proteínas da matriz extracelular, através da ativação imunológica persistente e não controlada dos fibroblastos em vários locais, aumentando, dentro do tecido conjuntivo, a substância

fundamental amorfa, os glicosaminoglicanos e a fibronectina (KURODA; SHINKAI, 1997).

A disfunção vascular é uma das primeiras alterações encontradas em pacientes com ES, representada clinicamente pelo fenômeno de Raynaud, e pode representar o evento inicial na sua patogenia, semelhante ao de muitas outras doenças reumáticas. As alterações vasculares podem afetar aspequenas artérias e arteríolas, resultando no espessamento das paredes dos vasos e a redução do diâmetro do lúmen (KOWAL-BIELECKA, 2006).

O fenômeno de Raynaud é um evento vasoconstritor que pode ser desencadeado por distúrbio emocional ou exposição ao frio. É a segunda manifestação mais comum da doença, mas não exclusiva da ES, presente em mais de 85% dos pacientes. É caracterizado por uma evolução trifásica, inicialmente com palidez, seguido por cianose e hiperemia reacional. Porém, em alguns casos, vasos sanguíneos mais calibrosos são afetados com estreitamento e obliteração luminal, podendo resultar em necrose isquêmica (NEVILLE et al., 2004; ALBILIA et al., 2007; JIMENEZ; DERK, 2004; BLOCK; SEQUEIRA, 2001).

O espessamento cutâneo representa o principal marcador clínico da ES. Podem ser identificadas três fases durante o processo de fibrose cutânea: no início, uma fase de edema associado com aumento da quantidade de fluido intersticial por lesão microvascular e inflamação; uma fase de rigidez na qual ocorre deposição de colágenos recém-sintetizados na pele; uma fase de atrofia na qual a pele normal se torna mais delgada (RODNAN; LIPINSKI; LUKSICK, 1979).

Alterações músculo-esqueléticas são comuns nesses pacientes e podem variar desde poliartralgia leve a artrite franca. Em estágios mais avançados, o espessamento e fibrose de tecidos periarticulares promovem contratura severa das mãos em flexão. Os músculos podem apresentar miopatias inflamatórias e não-inflamatórias, devido a infiltração muscular com tecido fibrótico (POPE, 2003).

O trato gastrointestinal é o sistema visceral mais envolvido pela ES. Os sintomas no esôfago, como refluxo, pirose e disfagia por alimentos sólidos, ocorrem pela redução na pressão do esfíncter esofágico inferior e pela dismotilidade dos dois terços inferiores do esôfago. O refluxo gastresofágico, por sua vez, pode ser diagnosticado pela primeira vez por um dentista. O meio ácido resultante no interior da cavidade oral, corrói esmalte e dentina, tornando a dentição mais susceptível à cárie. O envolvimento gástrico e do intestino pode causar distensão abdominal,

náusea, dor, diarreia e perda de peso (ALBILIA et al., 2007; BARRON et al., 2003; ROSE; YOUNG; REYNOLDS, 1998).

Também podem ocorrer envolvimento pulmonar, cardíaco e renal, sendo o primeiro considerado o mais grave, pois frequentemente leva à deficiência respiratória grave e à morte (COGHLAN; MUKERJEE, 2001; DESWAL; FOLLANSBEE, 1996; STEEN, 2003; GORDON et al., 1981).

As manifestações orais são pouco estudadas e muitas vezes negligenciadas pelos clínicos, apesar de acarretar grande incapacidade funcional. A fibrose facial e na mucosa causam microstomia, achado bucal mais frequente que se desenvolve devido à deposição de colágeno nos tecidos periorais, causa limitação da abertura da boca, enrugamento dos sulcos periorais, rigidez do palato mole, da laringe e da mucosa oral, dificultando a higiene oral e os procedimentos odontológicos (YUEN et al., 2012).

A deposição de colágeno subcutâneo na pele do rosto resulta em uma face aplainada e esticada, semelhante a uma máscara. A região alar do nariz torna-se atrofiada, levando a uma aparência nasal contraída, chamada de "*mouse-like facies*" (ALBILIA et al., 2007).

Além disso, a hipossalivação e a xerostomia são manifestações secundárias da doença. Podem ocorrer, também, DTM (disfunção têmporo-mandibular) com graus variáveis de reabsorção posterior do ramo da mandíbula, processo coronóide, mento e côndilo. Acredita-se que essas áreas são reabsorvidas devido a deposição crônica de colágeno (ALIKO et al., 2011).

A reabsorção de alguns dentes também tem sido relatada com certa frequência nesses pacientes. Pode ocorrer um aumento de dentes cariados e erupção dentária atípica. A literatura também sugere haver uma maior predisposição à doença periodontal devido ao maior acúmulo de placa bacteriana. Isso decorre da dificuldade de higienização oral causada pela diminuição da abertura de boca e dificuldade de manuseio da escova dental. Essa última é causada pelas alterações escleróticas nos dedos e nas mãos (NAGY et al., 1994).

No exame histopatológico de pele, encontra-se um espessamento da derme com grande quantidade de colágeno, causando atrofia da epiderme, substituição das glândulas sebáceas e sudoríparas e dos folículos capilares, obliteração de artérias e arteríolas e achatamento das cristas epiteliais. Pode-se também encontrar,

principalmente em lesões precoces, um infiltrado inflamatório na interface do tecido dérmico com o tecido adiposo (JIMENEZ, 1983).

A fibrose da derme papilar (ou derme superficial) precede a da derme reticular em ES e outros achados histológicos (rarefação capilar e infiltração perivascular) são representados com mais frequência na derme superficial (JIMENEZ; DERK, 2004). Também se tem demonstrado uma interação fundamental entre queratinócitos e derme superficial na fibrose precoce da pele em ES (ADEN et al., 2010).

A classificação da doença é baseada na extensão do comprometimento cutâneo e do envolvimento dos órgãos. Clinicamente, pode ser classificada em: cutânea difusa e cutânea limitada. A ES cutânea difusa é identificada pelo rápido desenvolvimento de espessamento da pele de forma simétrica, nas extremidades proximal e distal, na face e no tronco, com maior prevalência de envolvimento de órgãos viscerais. Já a ES cutânea limitada apresenta-se confinada na pele das extremidades distais e da face, envolvendo os órgãos internos menos frequentemente do que a forma difusa (MASI et al., 1980; ALBILIA et al., 2007).

A Escola Americana de Reumatologia (*American College of Rheumatology* - ACR) criou critérios para classificar o paciente com ES, não com a intenção de promover um diagnóstico precoce da doença, mas com o objetivo de estabelecer um padrão definido desta classificação para poder haver comparação entre grupos de pacientes de centros diferentes, principalmente para auxiliar na adequada avaliação dos resultados dos estudos clínicos e ensaios terapêuticos (MASI et al., 1980).

Segundo a ACR, um paciente deve apresentar pelo menos um dos critérios principais (esclerose proximal dos dedos das mãos - articulação metacarpofalangeana - ou dos pés - articulação metatarsofalangeana) ou dois dos critérios secundários (esclerodactilia, cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos e fibrose pulmonar bibasal) (MASI et al., 1980).

Visto que os critérios da ACR (1980) careciam de sensibilidade para o início da doença e para a forma clínica limitada, em 2013, um comitê misto formado pela ACR e pela Liga Européia contra o Reumatismo (*European League Against Rheumatism* - EULAR) desenvolveram novos critérios de classificação para ES. Determinou-se que o espessamento da pele dos dedos das mãos que se estendem proximalmente a articulação metacarpofalangeana é suficiente para o paciente ser classificado como portador da ES; se isso não estiver presente, 7

critérios, com diferentes pontuações, devem ser analisados e se somados der igual ou superior a 09, o paciente é classificado como portador da doença, são eles: espessamento da pele dos dedos, lesões de polpa digital, telangiectasia, capilaroscopia alterada, doença intersticial pulmonar ou hipertensão arterial pulmonar, fenômeno de Raynaud e auto-anticorpos específicos (HOOGEN et al., 2013).

No estudo de Hoogen et al.(2013), foram avaliadas a sensibilidade e especificidade para os dois critérios citados acima, que foram, respectivamente, 0,91e 0,92 para os novos critérios de classificação e 0,75 e0,72 para os critérios de classificação de 1980. Também neste estudo, todos os casos classificados como ES de acordo com os critérios do ACR, 1980, foram classificados como ES com os novos critérios (ACR/EULAR, 2013), além de vários casos adicionais. Desta forma, os novos critérios de classificação para ES apresentaram melhor desempenho e deve permitir que mais pacientes possam ser corretamente classificados como tendo a doença (HOOGEN et al., 2013).

A extensão e progressão do espessamento causado pela fibrose é um parâmetro importante na determinação das características clínicas e no prognóstico da doença, correlacionando com ambas a sobrevivência e limitações funcionais (STEEN; MEDSGER, 2001).

Foi introduzido, em 1979, a avaliação clínica semiquantitativa da espessura da pele (pontuação de Rodnan), técnica de palpação da pele para caracterizar e quantificar seu comprometimento pela doença ao longo de 26 áreas do corpo (dedos das mãos, dorso das mãos, antebraços, braços, ombros, face, pescoço, tórax, mamas, abdômen, dorsal, lombar, coxas, pernas, dorso dos pés e dedos dos pés) (CLEMENTS et al., 1990; POPE et al., 1995). O escore de Rodnan modificado (mRSS, sigla do inglês *modified Rodnan Semiquantitative Score*) é atualmente o mais utilizado. O espessamento da pele é avaliado em 17 áreas do corpo (dedos das mãos, mãos, antebraços, braços, pés, pernas, coxas, face, tórax e abdômen), utilizando escala de 0 a 3, sendo 0=pele normal, 1=espessamento cutâneo leve, 2=espessamento cutâneo moderado, 3=espessamento cutâneo intenso, com incapacidade de pregar a pele. A pontuação total da pele pode variar de 0 (sem espessamento) a 51 (espessamento grave em todas as 17 áreas) (KALDAS et al., 2009). Apesar de ser a forma de exame mais utilizada na prática clínica para a avaliação do espessamento da pele em ES, tem algumas limitações, como

subjetividade, variabilidade interobservador e a necessidade de um alto nível de treinamento para adquirir sensibilidade para a sua utilização (POPE et al., 1995; STEEN; MEDSGER; RODNAN, 1982).

Na fase precoce, o diagnóstico da ES pode ser difícil. Geralmente a presença do fenômeno de Raynaud associado a alterações microvasculares características avaliadas pela capilaroscopia são sugestivos da doença. A biópsia de pele pode confirmar a alteração cutânea, mas, por se trata de um procedimento invasivo. Exames laboratoriais também podem ajudar no diagnóstico, como a dosagem de anticorpo anticentrômero, anti-Scl-70 (topoisomerase I) ou anti-RNA polimerase 3; esses autoanticorpos, apesar de serem bem característicos, apresentam baixa sensibilidade (NEVILLE et al., 2004; ALBILIA et al., 2007).

As terapias de tratamento praticadas atualmente visam limitar a progressão da fibrose causada pela doença, sendo sua eficácia bastante dependente do diagnóstico precoce da enfermidade e o prognóstico é bem variado devido ao grau de variedades clínicas da doença (ALBILIA et al., 2007).

As modalidades de imagem estão sendo cada vez mais empregadas para medir o comprometimento cutâneo relacionado a ES e, até agora, o ultrassom de alta frequência usado em pele provou ser um método eficaz, porém ainda sem aplicabilidade na rotina clínica (AKESSON et al., 2004; MOORE et al., 2003; KALOUDI et al., 2010). No entanto, a resolução espacial fornecida pelas sondas de frequências mais altas que estão atualmente disponíveis no mercado (20MHz, resolução 60 x 200 μm e 50 MHz, resolução 30 x 60 μm - Dermascan, CortexTechnology, Denmark) (AKESSON et al., 2004) não é adequada para descrever os detalhes estruturais da pele quando comparado a Tomografia por Coerência Óptica (OCT) (resolução axial no ar/água de 12/9 μm e resolução lateral de 25 μm - Swept Source OCT, Thorlabs, New Jersey, USA).

Assim, Abignano et al. (2013), foram os primeiros a sugerir a Tomografia por Coerência Óptica (OCT) como um método de imagem capaz de visualizar com alta definição os primeiros milímetros abaixo da superfície da pele, na identificação da fibrose cutânea no diagnóstico na ES, como demonstrado na Figura 1, propondo-a como potencial biomarcador de imagem sensível para avaliar e quantificar a fibrose da pele em ES. Avaliaram imagens de OCT de mãos e antebraços de 21 pacientes com ES e de 22 indivíduos saudáveis e as comparou com 03 imagens histológicas de biópsia de pele, bem como com o escore de Rodnan modificado. Em geral, a pele

afetada pela ES mostrou uma diminuição da densidade óptica na derme papilar, progressivamente pior em doentes com a maior pontuação pelo escore de Rodnan modificado.

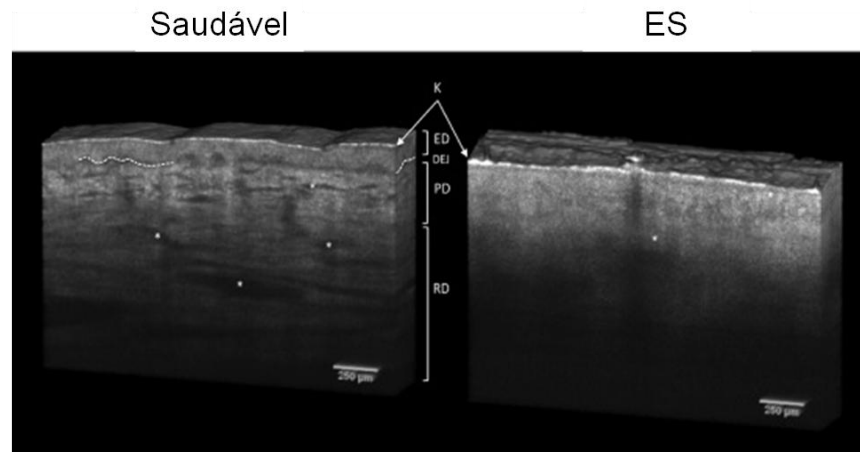


Figura 1 - Imagens comparativas de tomografia por coerência óptica (OCT) da região do antebraço, mostrando alterações estruturais nas camadas da pele entre indivíduos saudáveis e com esclerose sistêmica (ES) (Fonte: ABIGNANO et al., 2013)

2.2. Tomografia por Coerência Óptica

A tomografia por coerência óptica (OCT, sigla em inglês para *Optical Coherence Tomography*) foi primeiramente relatada por Huang et al. em 1991 e foi aplicado pela primeira vez *in vitro* na retina humana e na placa aterosclerótica (HUANG et al., 1991). A primeira aplicação em Odontologia foi realizada em 1998 (COLSTON et al., 1998).

Desde então, vem sendo amplamente utilizado na oftalmologia e pesquisas vêm sendo desenvolvidas para tornar seu uso cada vez mais rotineiro nas diversas áreas da saúde como na otorrinolaringologia, dermatologia, reumatologia e odontologia, além de diversas áreas não-médicas (octnews.org). Técnicas de imagem óptica são consideradas como uma tecnologia importante para a pesquisa básica e para atenção primária de vários problemas de saúde, por oferecer muitas vantagens não encontradas em outras técnicas de imagem (SHELTON et al., 2013; BOPPART; RICHARDS-KORTUM, 2014).

A técnica de OCT tem analogia com a técnica de ultrassom, que usa ondas sonoras, pelo fato de que em ambas as técnicas se analisa o eco da radiação proveniente do tecido estudado. A principal diferença está no tipo de radiação

utilizada, luz em vez de ondas sonoras. De maneira geral, quando uma onda incide sobre um meio, estruturas internas podem transmitir, refletir, espalhar e absorver parte da onda (KYOTOKU, 2006). Desta forma, o OCT analisa alterações ópticas a partir da reflexão e do retroespalhamento da luz, neste caso não ionizante, sobre o material de maneira não invasiva, não destrutiva, formando imagens em secções transversais de alta resolução espacial ($<10\mu\text{m}$), mostrando detalhes microestruturais dos tecidos vivos *in situ*, e em tempo real (HSIEH et al., 2013; HUANG et al., 1991).

OCT é uma técnica que fornece imagens bi ou tridimensionais de tecido biológico, tipicamente com 1-3 mm em profundidade, dependendo do tecido que esta sendo analisado e do comprimento de onda da luz usada, pois este interfere na profundidade de penetração devido à absorção do tecido, além de determinar o grau de espalhamento (BAUMGARTNER et al., 2000; FUJIMOTO, 2003).

A configuração mais comum de interferometria de baixa coerência usada no OCT é o interferômetro de *Michelson* (Figura 2), que consiste num interferômetro de divisão de amplitude. A luz proveniente da fonte (a maioria dos sistemas de OCT utilizam diodos super luminescentes como fonte de luz) chega a um divisor de feixes (espelho semitransparente) onde é dividida em dois feixes. Um dos feixes segue até o espelho móvel, e o outro viaja até o espelho fixo (amostra a ser analisada), cujas distâncias devem ser idênticas. Ambos os feixes retornam ao divisor de feixes e porções destes dois feixes se recombinam, viajando até o ponto de observação (detector) (HUANG et al., 1991).

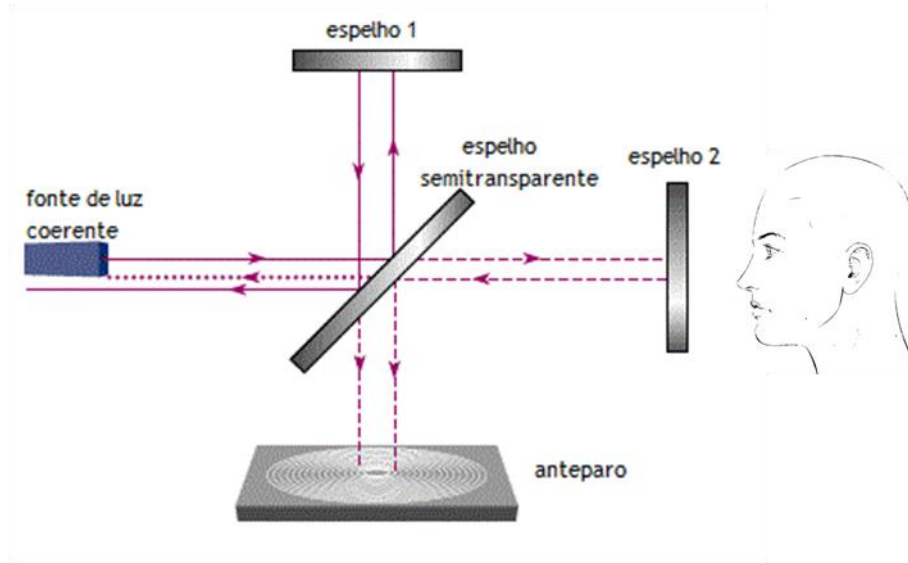


Figura 2 - Imagem ilustrativa do Interferômetro de *Michelson*, demonstrando o percurso do feixe de luz para formação da imagem na tomografia por coerência óptica (OCT) (Fonte: adaptado de pt.wikipedia.org)

A variação na medida de espalhamento em relação à profundidade de um único ponto na superfície do tecido é chamado de “A-scan”. Fazendo uma série dessas medidas, e varrendo transversalmente o feixe de prova, obtém-se um mapa bidimensional (B-scan) da luz refletida em cada ponto da área que foi varrida (Figura 3). O sinal passa por um processamento eletrônico e computacional, a partir da qual é gerada a imagem (KYOTOKU, 2006; HALL; GIRKIN, 2004).

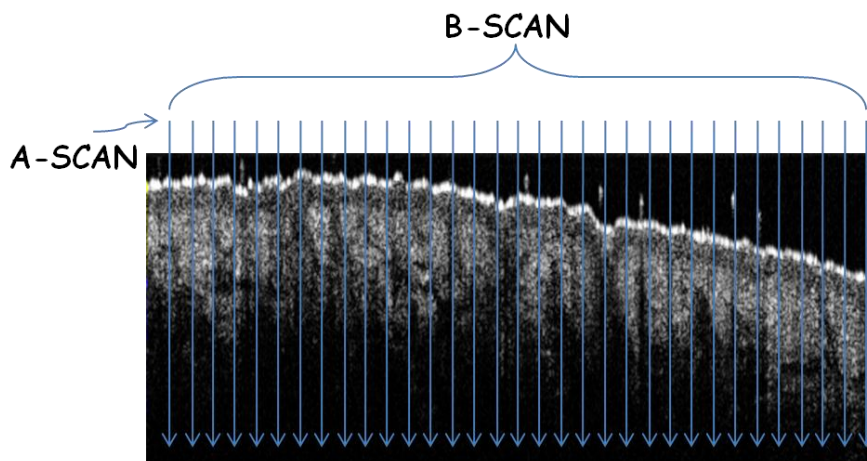


Figura 3 - Ilustração do A-scan, que representa a luz retroespalhada em profundidade de um único ponto, e B-scan, o mapa bidimensional do feixe de prova varrido transversalmente (Fonte: arquivo pessoal)

O primeiro sistema de OCT utilizado em estudos laboratoriais foi o de Domínio Temporal (TD-OCT), composto por um sistema de atraso óptico que é produzido no

braço de referência e adquire vários comprimentos de caminho óptico por mover um refletor de referência. Recentemente, utiliza-se com mais frequência sistemas operando no Domínio de Fourier (FD-OCT), que não possui partes móveis, todo o espectro de interferência da amostra é registrado e as informações de amplitude e profundidade são obtidas através da transformada de Fourier (HSIEH et al., 2013), utilizando um espectômetro e uma fonte de banda larga ou um fotodetector e uma fonte com varredura espectral (*Swept Source*, em inglês). A alta velocidade de aquisição e maior sensibilidade de detecção de dados são as principais vantagens do FD-OCT em relação ao TD-OCT (ZHENG et al., 2008; LIU; BREZINSKI, 2007).

Para esta dissertação, foi usado o *Swept Source - OCT* (SS-OCT) operando em 1325 nm (SS-OCT, Thorlabs, New Jersey, USA) (Figura 4). Este comprimento de onda foi escolhido por permitir uma maior penetração em tecido mole (MOTA et al., 2015). É um FD-OCT que usa uma fonte de laser de banda estreita com varredura de frequência.

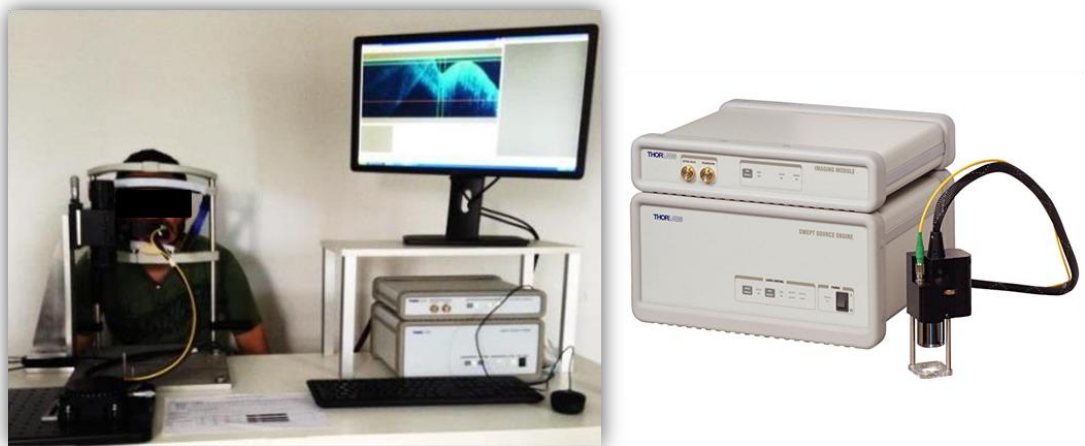


Figura 4 –Swept Source - OCT (SS-OCT) da Thorlabs operando em 1325 nm de comprimento de onda (modelo do tomógrafo utilizado no estudo) (Fonte: arquivo pessoal)

As imagens (Figura 5) geradas são consideradas uma biópsia óptica devido a capacidade de expor detalhes microestruturais do tecido vivo, permitindo a verificação de estruturas que, muitas vezes, só poderiam ser avaliadas por exame histopatológico, sem a necessidade de excisão e processamento das amostras e sem produzir conhecidos efeitos prejudiciais das radiações. Com a melhoria das especificações ópticas e as capacidades do sistema, a técnica de OCT demonstra grande potencial em temas de investigação e aplicações clínicas (OTIS et al., 2000;

HSIEH et al., 2013) e nesta dissertação estendemos sua aplicação para avaliação do comprometimento da mucosa labial na esclerose sistêmica.

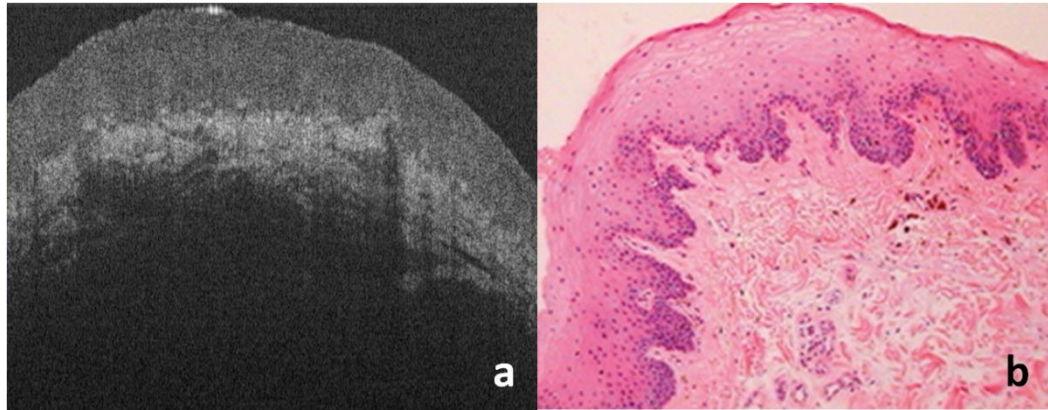


Figura 5 - Imagens da mucosa oral mostrando a semelhança entre as estruturas visualizadas nas a) biópsia óptica (Fonte: arquivo pessoal), com o auxílio da tomografia por coerência óptica, e b) biópsia tradicional (Fonte: http://www.luciana.correa.nom.br/che/che2/aula_mucosa.htm).

REFERÊNCIAS

- ABIGNANO, G. et al. Virtual skin biopsy by optical coherence tomography: the first quantitative imaging biomarker for scleroderma. **Ann Rheum Dis**, v. 72, p. 1845–1851, 2013.
- ABRÃO, A. L. P. et al. O que o reumatologista deve saber sobre as manifestações orofaciais das doenças reumáticas autoimunes. **Rev Bras Reumatol**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.08.011>.
- ADEN, N. et al. Epithelial Cells Promote Fibroblast Activation via IL-1alpha in Systemic Sclerosis. **J Invest Dermatol**, v. 130, p. 2191–200, 2010.
- AKESSON, A. et al. Longitudinal development of skin involvement and reliability of high frequency ultrasound in systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. 791–6, 2004.
- ALBILIA, J. B. et al. Small Mouths ... Big Problems? A Review of Scleroderma and its Oral Health Implications. **J Can Dent Assoc**, v. 73, n. 9, Nov. 2007.
- ALIKO, A. et al. Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis: systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 7, p. 704–9, 2011.
- BARON, M. et al. The Canadian systemic sclerosis oral health study: orofacial manifestations and oral health-related quality of life in systemic sclerosis compared with the general population. **Rheumatology**, v. 53, p. 1386-1394, 2014.
- BARRON, R. P. et al. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. **J Can Dent Assoc**, v. 69, n. 2, p. 84–9, 2003.
- BAUMGARTNER, A. et al. Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography of Dental Structures. **Caries Research**, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2000.
- BLOCK, J. A.; SEQUEIRA, W. Raynaud's phenomenon. **Lancet**, v. 357, p. 2042-8, 2001.
- BOPPART, S. A.; RICHARDS-KORTUM, R. Point-of-care and point-of-procedure optical imaging technologies for primary care and global health. **Sci Transl Med**, v. 6, p. 1-12, Sep 2014.
- CHIFFLOT, H. et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. **Semin Arthritis Rheum**, v. 37, p. 223 - 235, 2008.
- CLEMENTS, P. J. et al. Skin Score. A Semiquantitative Measure of Cutaneous Involvement That Improves Prediction of Prognosis in Systemic Sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 8, p. 1256-63, Aug. 1990.

- CO, H. T.; BLOCK, J. A.; SEQUEIRA, W. Scleroderma lung: pathogenesis, evaluation, and current therapy. **Am J Ther.**, v. 7, p. 321-4, 2000.
- COGHLAN, J. G.; MUKERJEE, D. The heart and pulmonary vasculature in scleroderma: clinical features and pathobiology. **Curr Opin Rheumatol**, v. 13, p. 495-9, 2001.
- COLSTON, B. W. et al. Dental OCT. **Optics Express**, v.3, n. 6, p. 230-238, 1998.
- DESWAL, A.; FOLLANSBEE, W. P. Cardiac involvement in scleroderma. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 22, p. 841-60, 1996.
- FARAH, M. E. **Tomografia de coerência óptica - OCT - Textos e Atlas**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- FERCHER, A. F. et al. Optical coherence tomography - principles and applications. **Rep Prog Phys**, v. 66, p. 239–303, 2003.
- FISCHER, D. J.; PATTON, L. L. Scleroderma: oral manifestations and treatment challenges. **SCD Special Care In Dentistry**, v. 20, n. 6, 2000.
- FUJIMOTO, J. G. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 11, p. 1361-67, 2003.
- GABRIELLI, A.; AVVEDIMENTO, E. V.; KRIEG, T. Scleroderma. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1989–2003, 2009.
- GORDON, M. B. et al. Thyroid disease in progressive systemic sclerosis: increased frequency of glandular fibrosis and hypothyroidism. **Ann Intern Med**, v. 95, p. 431-5, 1981.
- HALL, A.; GIRKIN, J. M. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. **Journal of Dental Research**. v.83, n. especial C, p. C89-C94, 2004.
- HOOGEN, F. et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, p. 2737–2747, 2013.
- HSIEH, Y. et al. Dental Optical Coherence Tomography. **Sensors**, v. 13, p. 8928-49, 2013.
- HUANG, D. et al. Optical coherence tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178–1181, 1991.
- JIMENEZ, S. A. Cellular immune dysfunction and the pathogenesis of scleroderma. **Semin Arthritis Rheum**, v. 13, p. 104-13, 1983.

JIMENEZ, S. A.; DERK, C. T. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. **Ann Intern Med**, v. 140, p. 37–50, 2004.

KALDAS, M. et al. Sensitivity to change of the modified Rodnan skin score in diffuse systemic sclerosis--assessment of individual body sites in two large randomized controlled trials. **Rheumatology**, v. 48, p. 1143-6, 2009.

KALOUDI, O. et al. High frequency ultrasound measurement of digital dermal thickness in systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, p. 1140–3, 2010.

KOWAL-BIELECKA, O. Targeting vascular disease in systemic sclerosis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 6, n. 4, p. 401–7, 2006.

KURODA, K.; SHINKAI, H. Decorin and glycosaminoglycan synthesis in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. **Arch Dermatol Res**, v. 289, n. 8, p. 481–5, 1997.

KYOTOKU, B. B. C. Desenvolvimento de um sistema de imageamento usando a tomografia por coerência óptica no domínio temporal e de Fourier. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Física) – **Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, 2006.

LEUNG, W. K. et al. Periodontal status of adults with systemic sclerosis: case-control study. **J Periodontol**, v. 82, p. 1140-45, 2011.

LIU, B.; BREZINSKI, M. E. Theoretical and practical considerations on detection performance of time domain, Fourier domain, and swept source optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 4, p.0440071-04400712, 2007.

MASI, A. T. and Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee (1980), Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis & Rheumatism**, v. 23, p. 581–590, 1980.

MOORE, T. L. et al. Seventeen-point dermal ultrasound scoring system - a reliable measure of skin thickness in patients with systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 42, p. 1559–63, 2003.

MOTA, C. C. B. O. et al. Non-invasive periodontal probing through Fourier Domain Optical Coherence Tomography. **J of Periodont**, v. 86, p. 1087-1094, Sep. 2015.

NAGY, G. et al. Analysis of the oral manifestations of systemic sclerosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 77, n. 2, p. 141-6, Feb 1994.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.665-668.

OTIS, L. L. et al. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 131, n. 4, p. 511-4, 2000.

POPE, J. E. et al. Variability of skin scores and clinical measurements in scleroderma. **J Rheumatol**, v. 22, p. 1271–6, 1995.

POPE, J. E. Musculoskeletal involvement in scleroderma. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 29, p. 391-408, 2003.

REVEILLE, J. D. Ethnicity and race and systemic sclerosis: how it affects susceptibility, severity, antibody genetics, and clinical manifestations. **Curr Rheumatol Rep**, v. 5, p. 160-7, 2003.

RODNAN, G. P.; LIPINSKI, E.; LUKSICK, J. Skin thickness and collagen contents in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. **Arthritis Rheum**, v. 22, p. 130–40, 1979.

ROSE, S.; YOUNG, M. A.; REYNOLDS, J. C. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 27, p. 563-94, 1998.

SHELTON, R. L. et al. Optical coherence tomography for advanced screening in the primary care office. **J. Biophotonics**, 2013. DOI 10.1002/jbio.201200243

STEEN, V. D. Scleroderma renal crisis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 29, p. 315-33, 2003.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. **Ann Rheum Dis**, v. 66, p. 940–4, 2007.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. **Arthritis Rheum**, v. 44, p. 2828–35, 2001.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A.; RODNAN, G. P. D-penicillamine therapy in progressive systemic sclerosis (scleroderma). **Ann Intern Med**, v. 97, p. 652-9, 1982.

TAMBY, M. C. et al. Newinsights into the pathogenesis of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 2, n. 3, p. 152–7, 2003.

TOLLE, S. L. Scleroderma: considerations for dental hygienists. **Int J Dent Hygiene**, v. 6, p. 77–83, 2008.

VINCENT, C. et al. Orofacial manifestations of systemic sclerosis: a study of 30 consecutive patients. **Rev Stomatol Chir Maxillofac**, v. 111, p. 128-34, 2010.

WILDER-SMITH, P. et al. In vivo Imaging of Oral Mucositis in an Animal Model Using Optical Coherence Tomography and Optical Doppler Tomography. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 8, April 2007.

YUEN, H. K. et al. Effect of orofacial exercises on oral aperture in adults with systemic sclerosis. **Disability and Rehabilitation**, v. 34, n. 1, p. 84–9, 2012.

ZHENG, K. et al.. Experimental confirmation of potential swept source optical coherence tomography performance limitations. **Applied Optics**. v. 47, n. 33, p.6151-6158, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Article to be submitted to Annals of the Rheumatic Diseases

(IF 12.3 e Qualis A1 Medicina)

EXTENDED REPORT

**Is an evaluation of labial mucosa by Optical Coherence Tomography a
method for early diagnosis in systemic sclerosis?**

Natália Sotero Machado Pires¹, Anderson Stevens Leônidas Gomes^{1,2*}

¹ Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

² Department of Physics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

*Corresponding author - E-mail: anderson@df.ufpe.br; Phone: +55 81 2126-7636; Fax: +55 81 2126-8450.

ABSTRACT

Objectives. This study evaluated the qualitative and quantitative characteristics of the labial mucosa using optical coherence tomography (OCT) and its association with clinical parameters in patients with systemic sclerosis (SSc).

Methods. An observational clinical study was developed with 33 SSc patients: 18 of the limited cutaneous (lcSSc) and 15 of the diffuse cutaneous (dcSSc) forms. The healthy control (HC) consisted of 35 individuals. All of them underwent evaluation of the inferior labial mucosa by OCT. For statistical analysis, the data were analyzed by SYSTAT 9.0, value of $p < 0.05$.

Results. It was observed that the optical density at 300 μm depth was higher in the SSc patients when compared to the HC ($p = 0.016$). The thickness (μm) of the labial mucosa

epithelium ($p < 0.0001$), and the number of pixels found in shade of gray 96 in outer ($p < 0.0001$) and total ($p = 0.0001$) layers in the SSc were lower than those observed in the HC. There was no statistically significant difference between the early and established phases in the lcSSc ($p = 0.9$) and dcSSc ($p = 0.4$). This means that, even in the early stage, patients already present changes in the thickening of this epithelium similar with the established phases.

Conclusions. The mucosa evaluation with the OCT showed characteristics between groups, and it is believed that, in analogy with the use of the modified Rodnan score to determine skin thickening in the early diagnosis and the therapeutic response of SSc, the identification of the involvement of the labial mucosa may be a complementary method with equal importance.

Keywords: Optical Coherence Tomography. Sclerosis Systemic. Oral Mucosa.

INTRODUCTION

Systemic Sclerosis (SSc) is an usually insidious disease, clinically heterogeneous, of unknown cause. It is characterized by inflammation and hyper-reactivity of micro and macro vascular circulation associated with excessive collagen deposition in tissues, resulting in fibrosis of the skin and/or internal organs, with varying severity and prognosis.[1-4]

In the current classification criteria (ACR/EULAR 2013),[5] it was determined that the thickening of the skin of the fingers that extend proximally to the metacarpophalangeal joint is sufficient for the patient to be classified as having SSc. However, in the absence of this, other elements should be evaluated and scored. The extent and progression of thickening caused by cutaneous, visceral and mucosal fibrosis is a determinant parameter in the clinical characteristics and morbimortality of the disease,[6] and the oral mucosa is also often compromised in these patients. Thus, the early identification of this thickening is fundamental.

The most common oral changes, resulting from altered collagen deposition, are: microstomia, xerostomia, periodontal disease and teeth loss.[7-11] These changes, in the oral region, have been somehow neglected when compared to evaluation in other parts of the human body,[12-14] and therefore deserve further investigation. Evaluation of the patient oral biological structure have not been exploited as a correlation clinical marker, even though it is already known that structural tissue modifications are highly prevalent in patients with SSc.

Optical imaging techniques have been widely employed in several medical areas, and are contemplated to be introduced in primary care, because in the early stages of many diseases, it is difficult to see abnormalities with limited tools currently available to doctors in this service sector.[15,16] Among the several optical imaging methods, Optical Coherence Tomography (OCT) is presented as an established method in ophthalmology.[17] It is a technique of particular importance for providing *in vivo*, noninvasive in real time diagnostics. The generated images are regarded as an optical biopsy due to its ability to expose micro structural details of living tissue, allowing the verification of structures which could often be assessed only by histopathology, without excision and processing of the samples and without producing known harmful effects.[18-20] Abignano et al. were the first to apply OCT to SSc as a potential biomarker.[21]

This study evaluated the qualitative and quantitative characteristics of the inferior labial mucosa using OCT and its association with clinical parameters in patients with SSc.

METHODS

Study design and population

The study was carried out in accordance to the Helsinki Declaration, and approved by the Ethics Committee of Universidade Federal of Pernambuco (protocol number 54101316.1.0000.5208). Written informed consent was obtained from each patient before participation in the study. All patients were properly informed of the nature, benefits and possible risks of the study.

An observational clinical study was developed and carried out at the Rheumatology Clinic of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal of Pernambuco, Brazil, location where the collection of rheumatologic clinical data and imaging procedure was performed.

Thirty-three Brazilian patients with SSc (28 female; mean age 46.1 years; range 19-71yrs) were recruited. All patients were ≥ 18 years of age and fulfilled criteria for SSc proposed by the American College of Rheumatology (ACR)[22] or criteria of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR, 2013)[5] and were classified into limited cutaneous SSc (lcSSc; n=18) or diffuse cutaneous SSc (dcSSc; n=15) groups. Up to 03 years (diffuse) and 05 years (limited) of disease onset, it was considered at an early stage.[7,22] Patients answered a clinical questionnaire from which demographic and clinical data were collected and additional information was obtained from hospital records and reviewed by experienced physicians (Table 1).

Thirty-five healthy control - HC (28 women, mean age 39.2yrs; range 20-68 yrs) were also included as a comparator group. Individuals with disorders that compromise the understanding and adherence to the tests, patients with other known autoimmune rheumatic diseases and clinical evidence of any other type of injury in the area being studied were excluded of the study.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the 33 SSc patients

Characteristics	
Age (yrs)	
Mean $\pm$ SE (range)	46.1 $\pm$ 11.4 (19-71)
Gender	N(%)
Female	28 (84.8)
Disease duration (years)	
Median (IQR)	08 (4-14.5)
Clinical subgroups	N(%)
Diffuse cutaneous	15 (45.5)
Early diffuse cutaneous	3/15 (20)
Limited cutaneous	18 (54.5)
Early limited cutaneous	5/18 (27.8)
Clinical manifestations	N(%)
Raynaud phenomenon	26 (78.8)
Digital ulcer	16 (48.5)
Esophageal dysfunction	29 (87.9)
Interstitial lung disease	18 (54.5)
Pulmonary arterial hypertension	4 (12.1)
Musculoskeletal involvement	9 (27.3)
Rodnan score	
Mean $\pm$ SE (range)	19.2 $\pm$ 13.2 (0-45)

Clinical evaluation

All individuals selected for this study underwent a rheumatologic clinical assessment with a professional (A.T.D.) experienced in the diagnosis of SSc. Lung involvement was observed using high-resolution computed tomography (HRCT) and a pulmonary function test (PFT); esophagus involvement was determined by scintilography and/or endoscopy; proximal muscle weakness and elevated serum creatine kinase indicated muscle involvement; and pulmonary hypertension was evaluated by Doppler echocardiogram.[23] The modified Rodnan total skin thickness score was used to evaluate skin fibrosis.[24]

OCT evaluation

Two-dimensional images were obtained of all participants by two examiners (L. S. A. M. and T. J. C. D.) of the central region of the inferior labial mucosa (Figure 1) with the beam focusing in the cranium-caudal direction, made with 512 pixels in the X-axis and Z-axis, using a 6mm width window in the X axis and 3mm depth in the Z axis with a Swept Source-OCT (SS-OCT, Thorlabs Inc., New Jersey, USA), operating at 1325 nm central wavelength, spectral bandwidth of >100 nm and instantaneous bandwidth of 0.13 nm (0.5 GHz). The axial scan rate is 16 kHz, average output power up to 10 mW, and 100 dB sensitivity. The system captures 25 frames per second, with axial resolution in air/water of 12/9 μm and lateral resolution of 25 μm . All images were stored in BITMAP format.



Figure 1 - Central region of the inferior labial mucosa, where the OCT image was obtained (personal archive)

Data and statistical analysis

A quantitative analysis of OCT images was obtained from a computational processing, through the calculation of the intensity attenuation as the light beam penetrates the skin, which leads to the tissue optical density (OD), represented by the graph of intensity normalized by depth, using the Matlab program (Mathworks Inc.).

Images of the inferior labial mucosa were analyzed using ImageJ (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, Bethesda, MD) for measuring the thickness of the epithelium (in μm) and quantify its pixels with respect to gray tones found in the image. Three different points of the image were measured in μm and their averaged were used for later comparisons. Using the same program, each labial mucosa image had its outer layer (OL), referring to the epithelium, and the whole region of the image that contains

information related to backscattered light (full layer - FL) bounded to measure the number of pixels in relation to grayscale present (Figure 2a).

Aiming at statistical comparison of the optical density and pixels quantification, two references were fixed: optical density at a depth of 300 μ m (OD300), in accordance with the Abignano et al.:[21] and the number of pixels present in the gray tone 96 (P96), the middle point with the highest concentration of pixels in the histogram for both groups (Figure 2b).

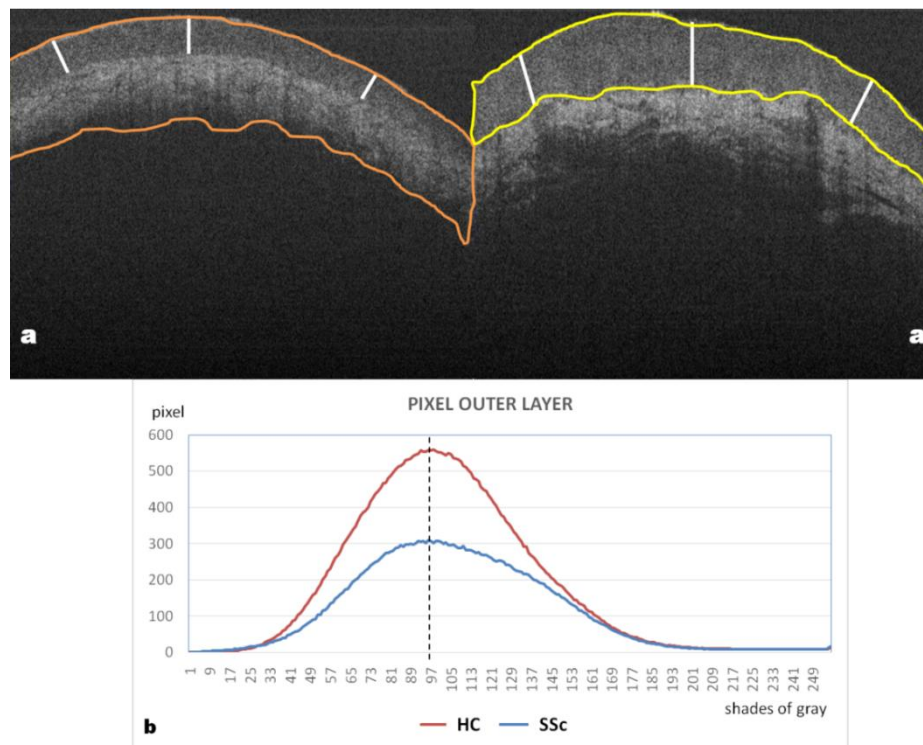


Figure 2 - a) Using Image J were made measurements (in μ m) in three distinct mucosal epithelium points (white lines), bounded to the outer layer refers to epithelium (yellow trace) and the whole region of the image that contains information related to backscattered light (orange trace); b) Graphical representation of the outer layer, how many pixels have a certain shades of gray between HC and SSc and delimiting the gray tone 96 (P96) (dotted black).

Data were tabulated in Excel (Microsoft Office 2007) and then subjected to statistical analysis. Numerical data were expressed as mean $\pm$ standard error (SE) if they were in normal distribution or median and interquartile range (IQR) if they were not in Gaussian distribution. The test of Shapiro/Wilks was applied to verify the normality of data set. In order to verify the degree of association between the considered variables, the Pearson correlation coefficient was applied. Later, a variance analysis (ANOVA) was carried out. In the event of significance

by F test, then proceeded to the mean comparison tests using Tukey's test. p Value < 0.05 was considered statically significant. Data were analyzed employing the SYSTAT 9.0 Version Demo.

RESULTS

Qualitative analysis of the labial mucosa

In a qualitative analysis of the images obtained by the OCT in the central region of the inferior labial mucosa, the distinction between two layers representing the epidermis (hypodense) and the lamina propria and submucosa (hyperdense) is observed. It was found a distinct behavior of epithelial thickness in the image obtained in patients with SSc compared to HC, which deserved deeper investigation. It is also observed a difference in the total thickness of the layers of the mucosa, corresponding to the light penetration behavior, where in the healthy individuals it is deeper (Figure 3a e 3b). In the OD graphic, the intensity attenuation in the curves related to the HC was much higher than in the patients with SSc, in other words, the normalized intensity is higher in SSc (Figure 3c).

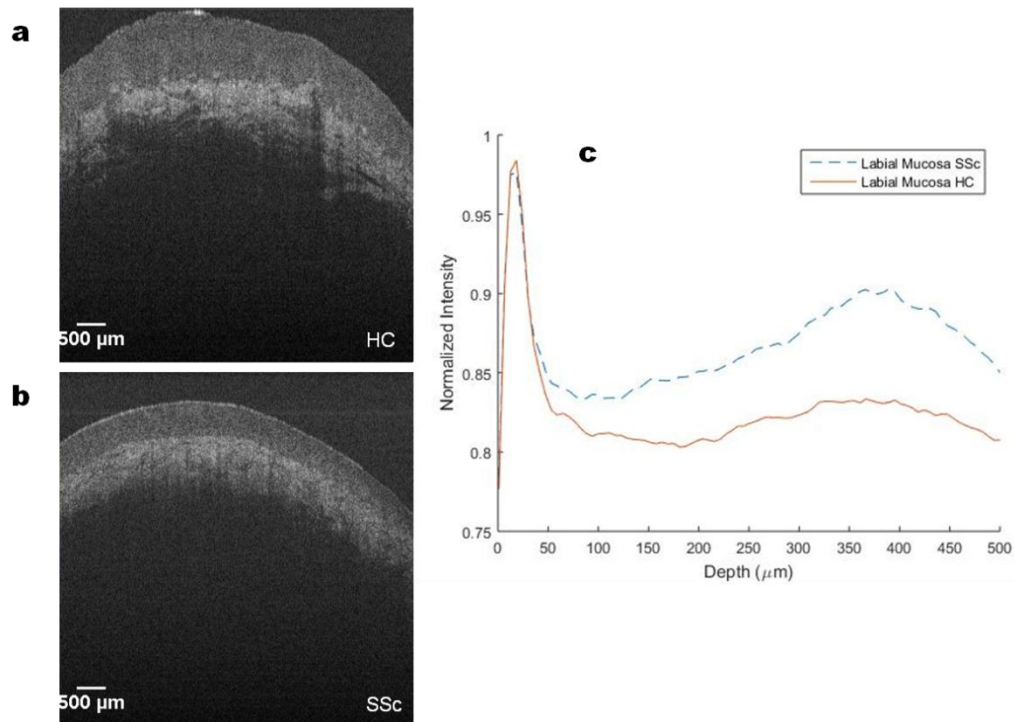


Figure 3 - Qualitative analysis of the labial mucosa by OCT. a) illustrative image of the healthy control (HC); b) illustrative image of the patient with scleroderma (SSc); c) graphical representation of the optical density mean in HC e SSc.

Quantitative analysis of the labial mucosa

In the quantitative analysis, it was observed that the optical density at 300 µm depth (OD300) was higher in patients with SSc when compared to the control group (0.87 and 0.82, respectively) (Figure 4a), suggesting a marked density of the region analyzed in the SSc group.

The thickness of the labial mucosa epithelium in SSc and HC was 290.90 µm and 442.63 µm, respectively, and the number of pixels found in the shade 96 of the outer layer was 315.79 pixels (SSc) and 576.71 pixels (HC) and the total layer, 764.27 pixels (SSc) and 1013.14 pixels (HC) (Figure 4b, 4c, 4d, respectively). In all of them, the measure was statistically lower in SSc.

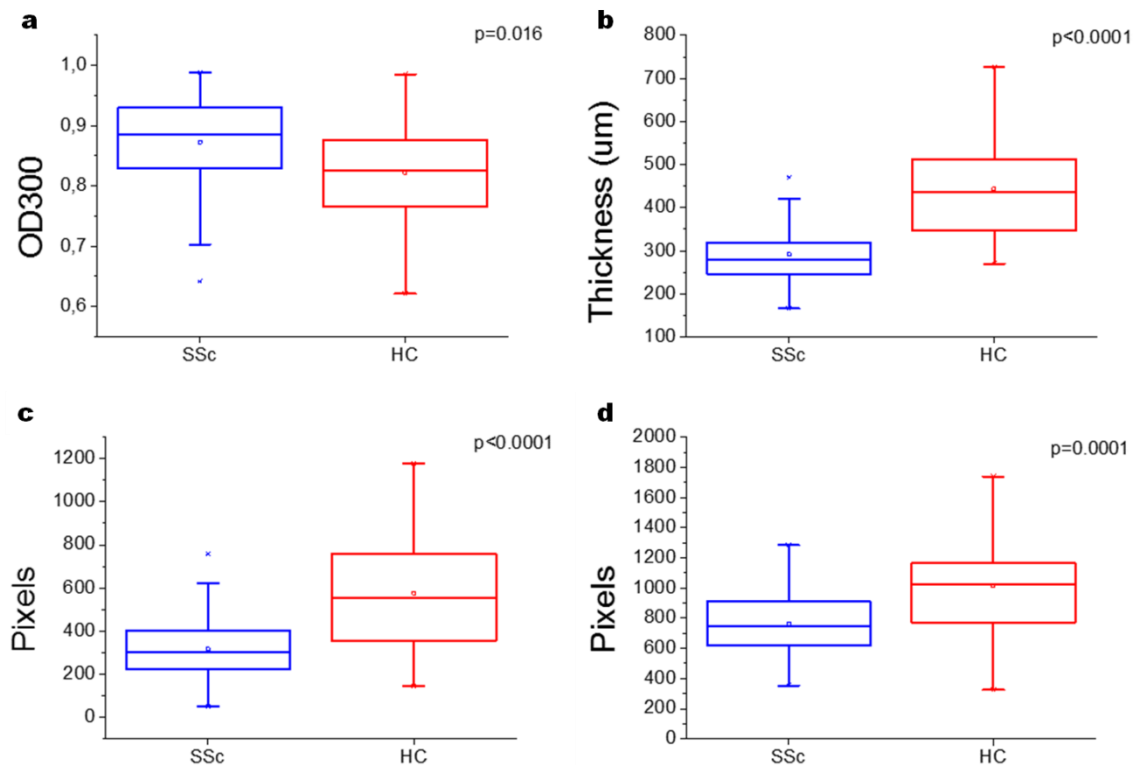


Figure 4 - Graphical representation of the average of analyzes made in labial mucosa: a) optical density in 300 µm depth (OD300); b) linear thickness of the epithelium in µm; c) e d) amount of pixel in grayscale 96 (P96) of the outer layer and full layer, respectively.

Association of the labial mucosa thickness with clinical parameters

The analysis of the mean labial mucosa epithelium thickness between the limited early (291 µm) and the limited established forms (286 µm) did not present a statistically significant difference ($p=0.9$), as well as between diffuse early (330 µm) and diffuse established (285 µm) at $p=0.4$.

Comparisons were also made between thickness and other clinical parameters such as disease time ($p=0.85$), modified Rodnan score ($p=0.51$), clinical form ($p=0.83$), Raynaud phenomenon ($p=0.86$), presence of digital ulcers ($p=0.21$), interstitial lung disease ($p=0.44$), pulmonary arterial hypertension ($p=0.90$), esophageal dysfunction ($p=0.54$) and musculoskeletal involvement ($p=0.31$), where none of them presented significant statistical difference.

DISCUSSION

Optical Coherence Tomography (OCT) was initially used in ophthalmology and research has been developed to make its use increasingly routine in various health areas such as otorhinolaryngology, dermatology, rheumatology and dentistry, as well as several non-medical areas (octnews.org).

Studies in the area of dentistry have shown that OCT presents applications in the analysis of soft tissues of the oral cavity, such as the ability to monitor periodontal disease activity before significant tissue loss occurs, to investigate and identify periodontal structures and to perform quantitative measurements of histological gingival sulcus.[20,25-28]

In dermatological diseases, the OCT is capable of detecting *in vivo* specific features of thin and thick skin. Real time OCT imaging can provide information not only on the structure, but also on some specific features in the functional state of tissues.[29]

The OCT is a technological tool that produces images of the skin and mucosa like those obtained by a cross-section of tissue surgical biopsy, with a resolution approaching light microscopy.[21,29-31] It has the potential to serve as a quantitative and non-invasive method to detect changes in the collagen levels of the skin, an important feature in patients with sclerosis systemic (SSc) and it could help to early diagnosis and track responses for treatment.[32]

Qualitative analysis of the images obtained by OCT of the labial mucosa of the SSc patients, verified that the thickness of the layers of this mucosa is thinner than in the healthy individuals. The evaluation of the optical density plot shows that the SSc images have a higher intensity. This behavior can be attributed to the fact that this region does not have the keratin layer, showing the backscatter in deeper regions, where lies the highest concentration of collagen, aspect possibly related to SSc.

In this study, for quantitative evaluation, average attenuation of the intensity decay of the optical light of all images were implemented, and their values compared for 300 μ m depth(OD300). There were significant statistical differences between patients with systemic sclerosis (SSc) and healthy control (HC). The thickness of the mucosa epithelium measured in μ m was lower in the SSc, as well as the measurements of pixel quantification in the outer and total layers of this area. These changes have not yet been described in the literature. Further studies need to be developed to prove and compare our findings in SSc, since the OCT undoubtedly showed that the labial mucosa of the patients in this study presented important structural characteristics different from those of HC.

When the mean thickness of the labial mucosa epithelium was compared, taking into account the early stage (up to 03 years) with the stage established within the clinical diffuse cutaneous form, there was no significant statistical difference ($p=0.4$). The same occurred when the early phase (up to 05 years) was compared with that established in the limited cutaneous form ($p=0.9$). With this, it can be inferred that, even in the early stage, regardless of the clinical form, patients already present alterations in the thickening epithelium, similar with the established diagnostic phases. On the other hand, the analysis of the labial mucosa through OCT did not allow us to separate diffuse and limited cutaneous clinical forms. This information also could not be compared with the literature, due to the lack of them.

Given the importance of early diagnosis of SSc, would the labial mucosa be a site of initial impairment? In being, could OCT be used as a complementary method to identify thickening of the labial mucosa epithelium in these patients? In the present case, unlike the assessment of skin thickening where the modified Rodnan score is the tool used, we would not be able to identify and quantify structural changes in the region by clinical examination. Therefore, imaging by OCT is potentially an appropriate method.

It was also evaluated the thickening of the labial mucosa epithelium with parameters of diagnostic and prognostic importance, with no correlation with disease time, modified Rodnan score, clinical form, Raynaud phenomenon, presence of digital ulcers, interstitial lung disease, pulmonary arterial hypertension, esophageal dysfunction and musculoskeletal involvement. These findings did not behave similarly to what is already described in the literature in relation to skin thickening, where it correlates with systemic involvements determinants of the disease prognosis.[33]

Imaging modalities are increasingly being used to measure cutaneous involvement related to ES. Abignano et al.[21] evaluated 458 OCT's scans of the hands and forearms of 21 patients with SSc and compared them with histological images on three skin biopsies, as well as with the Rodnan score for skin thickening. The authors suggested that this imaging technique is able to visualize the first millimeters below the surface of the skin with high definition, proposing it as a potential sensitive image biomarker to evaluate and quantify skin fibrosis in ES.

As a pilot study, we performed the OCT in 33 patients with SSc evaluating the thickening of the fingers, hands, forearms and face regions, also using the modified Rodnan score, corroborating the findings found by Abignano et al.[21] (data to be published elsewhere).

For this study, we highlight as limitation the sample size when subdivided into diffuse and limited clinical forms, as well as in the early and established stages of SSc disease. In addition, the Polarization Sensitive OCT (PS-OCT) should be employed to develop new studies, since this functional form of the OCT technique has shown great potential to evaluate skin fibrotic states, for identifying regions of birefringent material, measures and displays changes in the polarization state of the backscattered light which is directly related to the

presence of collagen content of the tissue. In skin fibrosis, which has large amounts of collagen, the polarization changes the light state and has a high light lag phase.[32,34]

The authors believe that in analogy with the use of the modified Rodnan score to determine skin thickening in early diagnosis and therapeutic response, identification of involvement of the labial mucosa may be a complementary method with equal importance. More research is needed to demonstrate the reliability of OCT as a universally accepted method for clinical evaluation of SSc, complementing existing methods.

Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest related to this study.

REFERENCES

- 1 Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360:1989–2003.
- 2 Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, et al. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Reviews* 2003;2(3):152–7.
- 3 Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004;140:37–50.
- 4 Fischer DJ, Patton LL. Scleroderma: oral manifestations and treatment challenges. *Spec Care Dentist* 2000;20(6):240–4.
- 5 Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2013 Nov;65(11):2737–47.
- 6 SteenVD, MedsgerTA. Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheumatol* 2001;44:2828–35.
- 7 Albilio JB, Lam DK, Blanas N, et al. Small Mouths... Big Problems? A Review of Scleroderma and its Oral Health Implications. *J Can Dent Assoc* 2007 Nov;73(9):831–6.
- 8 Nagy G, Kovács J, Zeher M, Czirják L. Analysis of the oral manifestations of systemic sclerosis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pat* 1994;77(2):141–6.
- 9 Vincent C, Agard C, Barbarot S, et al. Orofacial manifestations of systemic sclerosis: a study of 30 consecutive patients. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2010;111:128–34.
- 10 Baron M, Hudson M, Tatibouet S, et al. The Canadian systemic sclerosis oral health study: orofacial manifestations and oral health-related quality of life in

- systemic sclerosis compared with the general population. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:1386-1394.
- 11 Leung WK, Chu CH, Mok MY, et al. Periodontal status of adults with systemic sclerosis: case-control study. *J Periodontol* 2011;82(8):1140-45.
 - 12 Co HT, Block JA, Sequeira W. Scleroderma lung: pathogenesis, evaluation, and current therapy. *Am J Ther* 2000;7:321-4.
 - 13 Tolle SL. Scleroderma: considerations for dental hygienists. *Int J Dent Hygiene* 2008;6:77-83.
 - 14 Kowal-Bielecka O. Targeting vascular disease in systemic sclerosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006;6(4):401-7.
 - 15 Shelton RL, Jung W, Sayegh SI, McCormick DT, Kim J, Boppart SA. Optical coherence tomography for advanced screening in the primary care office. *JBiophotonics* 2013. DOI 10.1002/jbio.201200243
 - 16 Boppart SA, Richards-Kortum R. Point-of-care and point-of-procedure optical imaging technologies for primary care and global health. *Sci Transl Med* 2014 Sep;6:1-12.
 - 17 Costa RA, Skaf M, Melo LAS, et al. Retinal assessment using optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res* 2006 May;25(3):325-53.
 - 18 Hsieh Y, Ho Y, Lee S, et al. Dental Optical Coherence Tomography. *Sensors* 2013;13:8928-49.
 - 19 Fercher AF, Drexler W, Hitzenberger CK, Lasser T. Optical coherence tomography - principles and applications. *Rep Prog Phys* 2003;66:239-303.
 - 20 Otis LL, Everett MJ, Sathyam US, Colston BW Jr. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. *J Am Dent Assoc* 2000;131(4):511-4.
 - 21 Abignano G, Aydin SZ, Castillo-Gallego C, et al. Virtual skin biopsy by optical coherence tomography: the first quantitative imaging biomarker for scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1845-1851.
 - 22 Masi AT, Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee (1980), Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis and Rheumatism* 1980;23:581-90.
 - 23 Dantas AT, Gonçalves SM, Pereira MC, et al. Increased IL-35 serum levels in systemic sclerosis and association with pulmonary interstitial involvement. *Clin Rheumatol* 2015 Sep;34(9):1621-5.
 - 24 Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995 Jul;22(7):1281-5.
 - 25 Maia AMA, Freitas AZ, Campello SL, Gomes ASL, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics* 2016;9(6):596-602.
 - 26 Fernandes LO, Mota CCBO, Melo LSA, Soares MUSC, Feitosa DS, Gomes ASL. In vivo assessment of periodontal structures and measurement of gingival sulcus with Optical Coherence Tomography: a pilot study. *J Biophotonics* 2016. DOI 10.1002/jbio.201600082.

- 27 Baek JH. Optical approach to the periodontal ligament under orthodontic tooth movement: a preliminary study with optical coherence tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135(2):252-9.
- 28 Xiang X, Sowa MG, Iacopino AM, et al. An update on novel non-invasive approaches for periodontal diagnosis. *J Periodontol* 2010;81(2):186-198.
- 29 Gladkova ND, Petrova GA, Nikulin NK, et al. In vivo optical coherence tomography imaging of human skin: norm and pathology. *Skin Research and Technology* 2000;6:6–16.
- 30 Lee CK, Tsai MT, Lee HC, et al. Diagnosis of oral submucous fibrosis with optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics* 2009;14(5).
- 31 Adegun OK, Tomlins PH, Hagi-Pavli E, et al. Quantitative analysis of optical coherence tomography and histopathology images of normal and dysplastic oral mucosal tissues. *Lasers Med Sci* 2012;27:795–804.
- 32 Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J. Optical coherence tomography (OCT) of collagen in normal skin and skin fibrosis. *Arch Dermatol Res* 2014;306:1–9.
- 33 Clements PJ, Hurwitz EL, Wong WK, et al. Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis: high-dose versus low-dose penicillamine trial. *Arthritis Rheum.* 2000 Nov;43(11):2445-54.
- 34 Pierce MC, Sheridan RL, Park BH, et al. Collagen denaturation can be quantified in burned human skin using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Burns* 2004;30(6):511–517.

APÊNDICE B - Instrumento de coleta de dados

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

Data: _____

Nº: _____

Reg: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Sexo: () M () F Idade: _____ Telefone: _____

Estado civil: () solteiro () casado/união estável () divorciado () viúvo

Profissão/ocupação: _____

Renda familiar (quantidade de salários mínimos): _____

ANAMNESE

1. Gestante? () Nega () Afirma () NA
2. Fumante? () Nega () Afirma () Ex-Tabagista. Tempo _____
nunca fumou atual (colocar anos ou meses)
3. Você tem alguma doença sistêmica? () Nega () Afirma. Qual? _____
(Diabete, hipertensão, asma, hipo ou hipertireoidismo...)
4. Toma algum remédio?

MEDICAÇÕES (especificar a dose)				
1. Sim- atual 2. Não- parou há < 30 dias 3. Não- parou há > 30 dias 4. Nunca usou 5. Não sabe informar				
BCC () Nifedipina () Diltiazem () Anlodipina () Verapamil	IECA () Captopril () Enalapril	BRA () Losartan () Valsartan	AAS	
Pentoxifilina	Sildenafil	Bosentana	Corticoide () Prednisona () Prednisolona	
Metotrexato	111. Azatioprina	Micofenolato	Ciclofosfamida VO	
Ciclofosfamida EV Data da última aplicação: ____/____/____		IBP () Omeprazol () Pantoprazol	Procinético () Bromoprida () Domperidona	
AINE	OUTROS (Especificar):			

5. Você tem alguma doença reumatológica?
() Sim () Não
6. Se sim, qual?
 () artrite reumatoide (excluir) () esclerodermia
 () lúpus (excluir)() outras: _____

AVALIAÇÃO CLÍNICA REUMATOLÓGICA

CrITÉrios para Esclerose Sistêmica

ACR, 1980		
CRITÉRIOS MAIORES ☐ Espessamento cutâneo proximal às MCF ou MTF	CRITÉRIOS MENORES ☐ Esclerodactilia ☐ Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos ☐ Fibrose pulmonar bibasal	
1 maior OU 2 menores		
ESCLEROSE SISTÊMICA PRECOCE		
☐ Fenômeno de Raynaud <u>objetivo</u> + ☐ Capilaroscopia anormal OU ☐ Autoanticorpos específicos	☐ Fenômeno de Raynaud <u>subjetivo</u> + ☐ Capilaroscopia anormal E ☐ Autoanticorpos específicos	
CRITÉRIOS EULAR		
☐ Espessamento da pele dos dedos proximal às MCF		09
☐ Espessamento da pele dos dedos	☐ <i>Puffy fingers</i>	02
	☐ Esclerodactilia (distal às MCF mas proximal às IFPs)	04
☐ Lesão de polpa digital	☐ Úlceras digitais	02
	☐ Pitting scars	03
☐ Telangiectasia		02
☐ Capilaroscopia alterada		02
☐ HAP ou DPI	☐ HAP	02
	☐ Doença pulmonar intersticial	02
☐ Fenômeno de Raynaud		03
☐ Autoanticorpos	☐ Anticentrômero	03
	☐ Anti-SCI70	
	☐ Anti-RNA polimerase III	
TOTAL		
Esclerose Sistêmica se ≥ 9		

Classificação da doença

Forma Clínica 1. Cutânea Limitada 3. SineEscleroderma (excluir) 2. Cutânea Difusa 4. Overlap (excluir) 5. Localizada (excluir)		Tempo de Doença (meses/anos)
Comprometimento Sistemas 1. Pele 2. Raynaud 3. Úlceras 4. Doença pulmonar intersticial 5. Hipertensão arterial pulmonar 6. Musculo-esquelético 7. Comprometimento esofageano 8. Renal		

Comprometimento Cutâneo (Todos os participantes)

	DIREITO				ESQUERDO			
	0	1	2	3	0	1	2	3
Dedos								
Dorso das mãos								
Antebraço								
Braço								
Face								
Tórax anterior								
Abdome								
Coxa								
Perna								
Dorso dos pés								

ESCORE DE RODNAN:

	DIREITO		ESQUERDA	
	R	S/N	R	S/N
Dedo Médio				
Dedo Anelar				
Dorso da mão				
Dorso Antebraço				
Ventre Antebraço				
Face (Malar)				

R = escala de Rodnan no sítio proposto pela pesquisa

S/N = apresenta ou não comprometimento cutâneo

ANEXO

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP

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: Aplicação da Tomografia por Coerência Óptica na avaliação do comprometimento cutâneo e oral da esclerose sistêmica

Pesquisador: Luana Osório Fernandes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54101316.1.0000 5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.488.464

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, sob orientação do dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes.

Objetivo da Pesquisa:

Esse trabalho propõe um estudo clínico observacional com 60 indivíduos, 30 com diagnóstico de esclerose sistêmica (ES) e 30 saudáveis, para avaliar a aplicação da tomografia por coerência óptica (OCT). O OCT é uma técnica de aquisição de imagens de alta resolução baseada na interferência de um campo óptico de baixa coerência próximo ao infravermelho.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A OCT é uma técnica inovadora, de penetração de 3mm, com maior resolução que o ultrassom, não-invasiva e sem contra-indicações. Os riscos para os participantes é apenas o do constrangimento no momento da entrevista. Como benefícios estão avanços científicos na área da OCT e da ES. Para o participante, ele receberá um diagnóstico sobre possíveis irregularidades na estrutura tegumentar da pele e região bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que propõe o uso de uma técnica física não-invasiva aplicada de forma inédita à odontologia.

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

E-mail: cepccs@ufpe.br



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



Continuação do Parecer: 1.488.464

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão presentes.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12)

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

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)2126-8580

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

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



Continuação do Parecer: 1.488.464

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_670038.pdf	12/03/2016 23:17:36		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_670038.pdf	12/03/2016 23:13:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	12/03/2016 23:12:21	Luana Osório Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEanexoA.pdf	12/03/2016 23:11:37	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	AnuenciaAnexoC.pdf	10/03/2016 19:46:34	Luana Osório Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	07/03/2016 11:11:16	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	AnuenciaAnexoD.jpeg	02/03/2016 21:04:30	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvterezadiaz.pdf	02/03/2016 17:21:01	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvpatriciacassimiro.pdf	02/03/2016 17:20:40	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvnataliamachado.pdf	02/03/2016 17:20:24	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvlucianamelo.pdf	02/03/2016 17:20:06	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvluanafernandes.pdf	02/03/2016 17:19:46	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvemerylins.pdf	02/03/2016 17:19:29	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvdanielafeitoso.pdf	02/03/2016 17:19:09	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvclaudiamota.pdf	02/03/2016 17:18:34	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvangeladuarte.pdf	02/03/2016 17:17:35	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvandreaquantas.pdf	02/03/2016 17:17:13	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	cvandersongomes.pdf	02/03/2016 17:16:53	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	AnuenciaAnexoB.jpeg	02/03/2016 17:11:54	Luana Osório Fernandes	Aceito
Outros	FicnaApendiceA.pdf	02/03/2016 17:11:23	Luana Osório Fernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

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

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



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



Continuação do Parecer 1 488 454

Não

RECIFE, 12 de Abril de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(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

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B - Normas da Revista

Editorial policies

Annals of the Rheumatic Diseases seeks to publish significant scientific advances which are likely to impact on clinical practice within the medium term. Articles illustrating basic mechanisms and their application to clinical material will be welcomed. The journal aims to cover all areas of rheumatology and has two main sections for original research articles - one for clinical and epidemiological research and one for basic and translational research. The priorities are originality and excellence. We aim to ensure a fair and independent peer review system and to publish articles which follow the highest ethical standards concerning research conduct.

There are several international editions of Annals of the Rheumatic Diseases produced by local publishers in specific countries. If accepted for publication, authors should be aware that their paper may be selected for inclusion in one or more international editions of the journal, either in English or translated into another language.

Original research articles - Extended reports

These represent a substantial body of laboratory or clinical work. Extended reports should not exceed 3000 words; articles that exceed this word limit may be returned for revision before peer review. Additional data may be presented as supplementary information, which will be published online only should the article be accepted (this can be in any format: text, tables, images, videos, etc.). Extended reports should be presented in the following sections:

Abstract

No more than 250 words, summarising the problem being considered, how the study was performed, the salient results and the principal conclusions under subheadings 'Objectives', 'Methods', 'Results', and 'Conclusions'.

Keywords

No more than 5. These should be given beneath the Abstract and in the box provided in the online submission process.

Introduction

Brief description of the background that led to the study (current results and conclusions should not be included).

Methods

Details relevant to the conduct of the study. Wherever possible give numbers of

subjects studied (not percentages alone). Statistical methods should be clearly explained at the end of this section.

Results

Work should be reported in SI units. Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on validity and significance of results is appropriate but broader discussion of their implication is restricted to the next section. Subheadings that aid clarity of presentation within this and the previous section are encouraged.

Discussion

The nature and findings of the study are placed in context of other relevant published data. Caveats to the study should be discussed. Avoid undue extrapolation from the study topic.

Acknowledgments and affiliations

Individuals with direct involvement in the study but not meeting the criteria for full authorship may be acknowledged. The source of financial support and industry affiliations of all those involved must be stated.

References

No formal limit, but usually below 50. Please see References for further style guidance.

Tables and figures

Maximum 6 tables and/or figures. Please see general guidance above and Figures/illustrations for further information.

Preparing your manuscript

All material submitted is assumed to be submitted exclusively to the journal unless otherwise stated. Submissions may be returned to the author for amendment if presented in the incorrect format.

Manuscript documents are deleted from our systems 6 months after completion of the peer review process.

Cover letter

Your cover letter should inform the Editor of any special considerations regarding your submission, including but not limited to:

- Details of related papers by the same author(s) already published or under consideration for publication.
- Details of previous reviews of the submitted article.

Copies of related papers, previous Editors' and reviewers' comments, and responses to those comments can be submitted using the File Designation "Supplementary file for Editors only". Editors encourage authors to submit previous communications as doing so is likely to expedite the review process.

NIH Employees

Manuscripts authored or co-authored by one or more NIH employees must be submitted with a completed and signed NIH Publishing Agreement and Manuscript Cover Sheet according to NIH's Employee Procedures.

Title page

This excludes the journal BMJ Quality and Safety which has triple-blind peer review.

The title page must contain the following information:

- Title of the article.
- Full name, postal address, e-mail and telephone number of the corresponding author.
- Full name, department, institution, city and country of all co-authors.
- Word count, excluding title page, abstract, references, figures and tables.

Keywords

Authors can usually opt to (or are required to) choose keywords relevant to the content of the manuscript during the submission process. This assists in the identification of the most suitable reviewers for the manuscript. Keywords should also be included in the abstract itself.

Manuscript format

The manuscript must be submitted as a Word document. PDF is not accepted.

The manuscript should be presented in the following order:

- Titlepage.
- Abstract, or a summary for case reports (Note: references should not be included in abstracts or summaries).
- Main text separated under appropriate headings and subheadings using the following hierarchy: BOLD CAPS, bold lower case, Plain text, Italics.
- Tables should be in Word format and placed in the main text where the table is first cited.
- Tables must be cited in the main text in numerical order.
- Acknowledgments, Competing Interests, Funding and all other required statements. Reference list.

Images must be uploaded as separate files (view further details under the Figures/illustrations section). All images must be cited within the main text in numerical order and legends should be provided at the end of the manuscript.

Appendices should be uploaded using the File Designation "Supplementary File" and cited in the main text.

Please remove any hidden text headers or footers from your file before submission.

Style

Abbreviations and symbols must be standard. SI units should be used throughout, except for blood pressure values which should be reported in mm Hg.

Whenever possible, drugs should be given their approved generic name. Where a proprietary (brand) name is used, it should begin with a capital letter. Acronyms should be used sparingly and fully explained when first used.

Figures/illustrations

Images must be uploaded as separate files. All images must be cited within the main text in numerical order and legends must be provided (ideally at the end of the manuscript).

Colour images and charges

For certain journals, authors of unsolicited manuscripts that wish to publish colour figures in print will be charged a fee to cover the cost of printing. Refer to the specific journal's instructions for authors for more information.

Alternatively, authors are encouraged to supply colour illustrations for online publication and black and white versions for print publication. Colour publication online is offered at no charge, but the figure legend must not refer to the use of colours.

File types

Figures should be submitted in TIFF or EPS format. JPEG files are acceptable in some cases. A minimum resolution of 300 dpi is required, except for line art which should be 1200 dpi. Histograms should be presented in a simple, two-dimensional format, with no background grid.

During submission, ensure that the figure files are labelled with the correct File Designation of "Mono Image" for black and white figures and "Colour Image" for colour figures.

Figures are checked using automated quality control and if they are below the minimum standard you will be alerted and asked to resupply them.

Please ensure that any specific patient/hospital details are removed or blacked out (e.g. X-rays, MRI scans, etc). Figures that use a black bar to obscure a patient's identity are NOT accepted.

Tables

Tables should be in Word format and placed in the main text where the table is first cited. Tables must be cited in the main text in numerical order. Please note that tables embedded as Excel files within the manuscript are NOT accepted. Tables in Excel should be copied and pasted into the manuscript Word file.

Tables should be self-explanatory and the data they contain must not be duplicated in the text or figures. Any tables submitted that are longer/larger than 2 pages will be published as online only supplementary material.

Multimedia files

You may submit multimedia files to enhance your article. Video files are preferred in .WMF or .AVI formats, but can also be supplied as .FLV, .Mov, and .MP4. When

submitting, please ensure you upload them using the File Designation "Supplementary File - Video".

References

Authors are responsible for the accuracy of cited references and these should be checked before the manuscript is submitted.

- **Citing in the text**

References must be numbered sequentially as they appear in the text. References cited in figures or tables (or in their legends and footnotes) should be numbered according to the place in the text where that table or figure is first cited. Reference numbers in the text should be inserted immediately after punctuation (with no word spacing)—for example,[6] not [6].

Where more than one reference is cited, these should be separated by a comma, for example,[1, 4, 39]. For sequences of consecutive numbers, give the first and last number of the sequence separated by a hyphen, for example,[22-25]. References provided in this format are translated during the production process to superscript type, and act as hyperlinks from the text to the quoted references in electronic forms of the article.

Please note that if references are not cited in order the manuscript may be returned for amendment before it is passed on to the Editor for review.

- **Preparing the reference list**

References must be numbered consecutively in the order in which they are mentioned in the text.

Only papers published or in press should be included in the reference list. Personal communications or unpublished data must be cited in parentheses in the text with the name(s) of the source(s) and the year. Authors should request permission from the source to cite unpublished data.

Journals from BMJ use a slightly modified version of Vancouver referencing style (see example below). The style template is available via Endnote. Note that The BMJ uses a different style.

- **BMJ reference style**

List the names and initials of all authors if there are 3 or fewer; otherwise list the first 3 and add 'et al.' (The exception is the Journal of Medical Genetics, which lists all authors). Use one space only between words up to the year and then no spaces. The journal title should be in italic and abbreviated according to the style of Medline. If the journal is not listed in Medline then it should be written out in full.

Example references

- **Journal article**

13 Koziol-McLain J, Brand D, Morgan D, et al. Measuring injury risk factors: question reliability in a statewide sample. *InjPrev* 2000;6:148–50.

- **Chapter in book**

14 Nagin D. General deterrence: a review of the empirical evidence. In: Blumstein A, Cohen J, Nagin D, eds. *Deterrence and Incapacitation: Estimating the Effects of Criminal Sanctions on Crime Rates*. Washington, DC: NationalAcademyofSciences 1978:95–139.

- **Book**

15 Howland J. *Preventing Automobile Injury: New Findings From Evaluative Research*. Dover, MA: AuburnHousePublishingCompany 1988:163–96.

- **Abstract/supplement**

16 Roxburgh J, Cooke RA, Deverall P, et al. Haemodynamic function of the carbomedicsbileaflet prosthesis [abstract]. *Br Heart J* 1995;73(Suppl 2):P37.

- **Electronic citations**

Websites are referenced with their URL and access date, and as much other information as is available. Access date is important as websites can be updated and URLs change. The "date accessed" can be later than the acceptance date of the paper, and it can be just the month accessed.

- **Electronic journal articles**

Morse SS. Factors in the emergency of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995 Jan-Mar;1(1). www.cdc.gov/nciod/EID/vol1no1/morse.htm (accessed 5 Jun 1998).

- **Electronic letters**

Bloggs J. Title of letter. *Journal name* Online [eLetter] Date of publication. url: Krishnamoorthy KM, Dash PK. Novel approach to transseptal puncture. *Heart* Online [eLetter] 18 September 2001. <http://heart.bmj.com/cgi/eletters/86/5/e11#EL1>

- **Digital Object Identifier (DOI)**

A DOI is a unique string created to identify a piece of intellectual property in an online environment and is particularly useful for articles that are published online before appearing in print (and therefore have not yet been assigned the traditional volume, issue and page number references). The DOI is a permanent identifier of all versions of an article, whether raw manuscript or edited proof, online or in print. Thus the DOI should ideally be included in the citation even if you want to cite a print version of an article.

- **How to cite articles with a DOI before they have appeared in print**

1. Alwick K, Vronken M, de Mos T, et al. Cardiac risk factors: prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* Published Online First: 5 February 2004. doi:10.1136/ard.2003.001234

- **How to cite articles with a DOI once they have appeared in print**

1. Vole P, Smith H, Brown N, et al. Treatments for malaria: randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2003;327:765–8 doi:10.1136/ard.2003.001234 [published Online First: 5 February 2002].

PLEASE NOTE: RESPONSIBILITY FOR THE ACCURACY AND COMPLETENESS OF REFERENCES RESTS ENTIRELY WITH THE AUTHOR.

Permissions

If you are using any material e.g. figures, tables or videos that have already been published elsewhere, you must obtain permission to reuse them from the copyright holder (this may be the publisher rather than the author) and include any required permission statements in the figure legends. This includes your own previously published material, if you are not the copyright holder.

It is the author's responsibility to secure all permissions prior to publication.

Online only supplementary material

Additional figures and tables, methodology, raw data, etc may be published online only as supplementary material. If your paper exceeds the word count you should consider if any parts of the article could be published online only. Please note that these files will not be copyedited or typeset and will be published as supplied, therefore PDF files are preferred.

All supplementary files should be uploaded using the File Designation "Supplementary File". Please ensure that any supplementary files are cited within the main text of the article.

Some journals also encourage authors to submit translated versions of their abstracts in their local language, which are published online only alongside the English version. These should be uploaded using the File Designation "Abstract in local language".

Statistics

Statistical analyses must explain the methods used.

Research reporting guidelines

Authors are encouraged to use the relevant research reporting guidelines for the study type provided by the EQUATOR Network. This will ensure that you provide enough information for editors, peer reviewers and readers to understand how the research was performed and to judge whether the findings are likely to be reliable.

The key reporting guidelines are:

- Randomised controlled trials (RCTs): CONSORT guidelines
- Systematic reviews and meta-analyses: PRISMA guidelines and MOOSE guidelines
- Observational studies in epidemiology: STROBE guidelines and MOOSE guidelines
- Diagnostic accuracy studies: STARD guidelines
- Quality improvement studies: SQUIRE guidelines

Research checklists should be uploaded using the File Designation “Research Checklist”.

Pre-submission checklist

In order to reduce the chance of your manuscript being returned to you, please check:

- **Author information:** Have you provided details of all of your co-authors? Is the information that you have entered into Scholar One the same as the information on the manuscript title page?
- **Manuscript length and formatting:** Have you checked that your manuscript doesn't exceed the requirements for word count, number of tables and/or figures, and number of references? Have you provided your abstract in the correct format? Have you supplied any required additional information for your article type, such as key messages?
- **Tables:** Have you embedded any tables into the main text? Have they been cited in the text? Have you provided appropriate table legends? Have you uploaded any lengthy tables as supplementary files for online publication?
- **Figures:** Have you uploaded any figures separately from the text? Have they been supplied in an acceptable format and are they of sufficient quality? Are they suitable for black and white reproduction (unless you intend to pay any required fees for colour printing)? Have the files been labelled appropriately? Have the figures been cited in the text? Have you provided appropriate figure legends?
- **References:** Have all of the references been cited in the text?
- **Supplementary files and appendices:** Have you supplied these in an acceptable format? Have they been cited in the main text?
- **Statements:** Have you included the necessary statements relating to contributor ship, competing interests, data sharing and ethical approval?
- **Research reporting checklists:** Have you either provided the appropriate statement for your study type, or explained why a checklist isn't required?
- **Permissions:** Have you obtained from the copyright holder to re-use any previously published material? Has the source been acknowledged?
- **Reviewers:** Have you provided the names of any preferred and non-preferred reviewers?

- **Revised manuscripts:** Have you supplied both a marked copy and a clean copy of your manuscript? Have you provided a point by point response to the reviewer and editor comments?

Information required for all authors submitting a manuscript to any BMJ journal:

- Manuscript files in the appropriate format, including a cover letter and title page
- Details of any co-authors (name, institution, city, country and email address)
- Details of preferred reviewers (name and email address)
- Word count, number of figures, number of tables, number of references and number of supplementary files for online only publication
- Competing interest statement
- Contributorship statement

Additional information that can be provided or may be required when submitting certain article types to certain journals:

- Name of the research funder(s)
- ORCID number(s) for all authors
- Names of any collaborators
- Details of non-preferred reviewers (name and email address)
- Clinical trial registration number
- Patient consent form
- Details of ethical approval
- Research reporting checklist (or a reason why one has not been provided)
- Data sharing statement
- Permission from the copyright holder to re-use previously published material
- Title of an alternate BMJ journal to which your manuscript can be automatically submitted if rejected from your first choice journal

Please check the specific journal's instructions for authors prior to submitting your manuscript.