

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

FREQUÊNCIA DO HCV-RNA EM AMOSTRAS DE SORO E SALIVA DE
PACIENTES ANTI-HCV POSITIVOS

CRISTIANE ARAÚJO SIMÕES

Recife – PE

2012

CRISTIANE ARAÚJO SIMÕES

Frequência do HCV-RNA em amostras de soro e saliva de
pacientes anti-HCV positivos

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Recife – PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Gláucia Cândida, CRB4-1662

S593f Simões, Cristiane Araújo.
 Frequência do HCV-RNA em amostras de soro e saliva de pacientes
 Anti-ACV positivos / Cristiane Araújo Simões. – Recife: O autor, 2012.
 48 folhas : il. ; 30 cm.

 Orientador: Jurema Freire Lisboa de Castro.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2012.
 Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

 1. Hepatite C. 2. Saliva. 3. Anticorpos Anti-Hepatite C. I. Castro,
 Jurema Freire Lisboa de (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-187)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

COLEGIADO

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Prof^a. Dr^a. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof^a. Dr^a. Liriane Baratela Evêncio

Prof^a. Dr^a. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

FREQUÊNCIA DO HCV-RNA EM AMOSTRAS DE SORO E
SALIVA DE PACIENTES ANTI-HCV POSITIVOS

CRISTIANE ARAÚJO SIMÕES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 02 DE MAIO DE 2012

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof^a. Dr^a. Ana Cecília Cavalcanti Albuquerque

Prof^a Dr^a. Cláudia Cazal Lira

RECIFE-PE

2012

Ata da 117ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 02 de maio de 2012.

Às 14:00(Quatorze horas) do dia 02(dois) do mês de maio do ano de dois mil e doze, reuniram-se no auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, atuando como presidente, Profa. Dra. ANA CECÍLIA CAVALCANTI ALBUQUERQUE, atuando como primeiro examinador. Profa. Dra. CLAUDIA CAZAL LIRA, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“FREQUÊNCIA DO HCV-RNA EM AMOSTRA DE SORO E SALIVA DE PACIENTES ANTI-HCV POSITIVOS ”**, da CD. CRISTIANE ARAÚJO SIMÕES, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO e Co-orientação da Profa. Dra. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO. Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a candidata para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se à disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Profa. Dra. ANA CECÍLIA CAVALCANTI ALBUQUERQUE, **(APROVADA)**, Profa. Dra. CLAUDIA CAZAL LIRA **(APROVADA)** Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, **(APROVADA)**, a candidata recebeu três conceitos **(APROVADA)** é considerada **(APROVADA)**, devendo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do Curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, O Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE. CRISTIANE ARAÚJO SIMÕES.

Recife, 02 de maio de 2012.

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Presidente

Profa. Dra. ANA CECÍLIA CAVALCANTI ALBUQUERQUE

1º Examinador

Profa. Dra. CLAUDIA CAZAL LIRA

2º Examinador

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe ***Maria Cleonice Araújo Simões***, maior exemplo de perseverança na busca do conhecimento e que apesar das dificuldades, soube transmitir toda sua sabedoria e apoio constante.

EPÍGRAFE

“ A felicidade aparece para aqueles que choram

Para aqueles que se machucam

Para aqueles que buscam e tentam sempre

E para aqueles que reconhecem a importância

das pessoas que passam por suas vidas.”

Clarice Lispector

Agradecimentos especiais

A Deus, que em todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir.

À minha família, pela paciência, incentivo e amor incondicional.

À minha orientadora, professora Jurema Freire Lisboa de Castro, por todos os ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades e pela amizade que me cativaram desde a época da minha graduação.

À minha co-orientadora, professora Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho, pela disponibilidade, atenção e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram e me apoiaram nessa jornada.

A todos os professores da Pós-Graduação em Odontologia que contribuíram para minha formação.

À equipe do Laboratório de Virologia da LIKA, pela disposição em ajudar e transmitir conhecimentos tão importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de curso, pela companhia diária.

Às funcionárias da secretaria, pela competência no suporte de nossas necessidades acadêmicas.

RESUMO

A pesquisa do vírus da Hepatite C (HCV) em outros fluidos corporais além do sangue é importante quando se avalia a existência de outras possíveis vias de transmissão, afinal cerca de 40% dos pacientes contaminados não apresentam história de exposição por via parenteral. A presença do RNA do HCV (RNA-HCV) na saliva de indivíduos infectados foi observada em alguns trabalhos e esta vem sendo sugerida como uma possível via de transmissão. No entanto, o papel dos fluidos orais na transmissão do HCV permanece controverso. O objetivo deste trabalho foi identificar o HCV-RNA na saliva e no soro de pacientes anti-HCV positivos. Foi realizado um estudo transversal com uma amostra de conveniência composta por 50 pacientes atendidos no Setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-UFPE) no período de junho a setembro de 2011. Amostras de sangue e saliva foram coletadas e processadas. O HCV-RNA foi extraído e uma alíquota utilizada na RT-PCR. O HCV-RNA foi detectado em 82% (41/50) das amostras de soro e em 0% das amostras de saliva. Pela metodologia empregada neste trabalho, não houve presença do HCV-RNA em saliva.

Palavras-chave: Hepatite C, Saliva, RT-PCR, Anticorpos Anti-Hepatite C

ABSTRACT

The research of hepatitis C virus (HCV) in other body fluids than blood is important when evaluating the existence of other possible ways of transmission, at last about 40% of infected patients have no history of exposure parenterally. The presence of RNA of HCV (HCV-RNA) in the saliva of infected individuals was observed in some studies, and this has been suggested as a possible way of transmission. However, the part of the oral fluid in the transmission of HCV remains controversial. This study researched the presence of HCV-RNA in saliva and serum of patients with seropositive for the virus (anti-HCV positive). A cross-sectional study was conducted with a convenience sample comprised 50 patients treated at the Gastroenterology sector at Hospital das Clínicas in Pernambuco (HC-UFPE) during June-September 2011. Samples of serum and saliva were collected and processed. Extraction was performed and an aliquot used in RT-PCR. The HCV-RNA was detected in 82% (41/50) serum samples and in 0% saliva samples. For the methodology used in this study, there was no presence of HCV-RNA in saliva.

Key-words: Hepatitis C, Saliva, RT-PCR, Antibodies Anti-Hepatitis C

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
EPÍGRAFE	vii
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
SUMÁRIO	xi
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
ARTIGO	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAIS E MÉTODOS	18
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO	26
AGRADECIMENTOS	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
APÊNDICES	
APÊNDICE A: Tabela	34
APÊNDICE B: Questionário da Pesquisa	35
APÊNDICE C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	36
ANEXOS	
ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFPE	38
ANEXO B: Normas da Revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases	39
ANEXO C: Artigo completo publicado	47
ANEXO D: Artigo enviado para publicação	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas reações de RT-PCR **32**

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com anti-HCV positivos segundo **32**
comportamento e suscetibilidade à infecção

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HCV	Vírus da Hepatite C
HCV-RNA	Ácido Ribonucleico do Vírus da Hepatite C
Anti-HCV	Anticorpo Anti-Hepatite C
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase através da Transcriptase Reversa
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
RIBA	Ensaio Immunoblot Recombinante

TITLE: Frequency of HCV-RNA in serum and saliva anti-HCV positive patients

RUNNING TITLE: Presence of HCV-RNA in saliva

Key words: Hepatitis C, saliva, RT-PCR, Hepatitis C Antibodies

Cristiane Araújo Simões¹

Andreza Lira Correia²

Viviane Martha Santos de Moraes³

Jéfferson Luis de Almeida Silva⁴

Rosângela Maria Duarte Coelho⁵

Jurema Freire Lisboa de Castro⁶

- 1- Mestranda em Odontologia - Universidade Federal de Pernambuco.
- 2- Doutoranda em Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco.
- 3- Mestranda em Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco.
- 4- Doutorando em Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco.
- 5- DDS, MSc, PhD. Setor de Virologia do LIKA. Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.
- 6- DDS, MSc, PhD. Serviço de Patologia Oral. Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, Universidade Federal de Pernambuco.

Corresponding Author:

Jurema Freire Lisboa de Castro

Av. Professor Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE/Brazil

CEP: 50670-90. Fone/Fax: +55 81 2126-8817

URL: www.ufpe.br/ppgodonto

email: jlisboa72@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA da família *Flaviviridae*, identificado em 1989¹ e hoje reconhecido como uma das principais causas de doença hepática no mundo. A infecção causada pelo HCV representa um grave problema de saúde pública, devido o longo período de infecção assintomática, que faz com que o indivíduo não tome conhecimento da doença e, assim, não procure atenção especializada precocemente. Além disso, a sua capacidade de tornar-se crônica em até 85% dos infectados, aumenta o risco de desenvolvimento de complicações graves, como cirrose, carcinoma hepatocelular e falência hepática podendo levar o indivíduo a óbito².

As estimativas apontam para prevalência global em torno de 2% a 3%, ou seja, entre 123 e 170 milhões de pessoas infectadas pelo HCV em todo o mundo³. Apesar da hepatite C ser considerada endemia mundial, existe um elevado grau de variação geográfica de sua distribuição. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que 1,5% da população seja portadora do vírus⁴.

A exposição ao HCV ocorre geralmente em idades mais avançadas⁴. Esta maior prevalência, observada após os 50 anos de idade sugere infecção em um passado distante, com tendência de a maioria dos casos se concentrarem entre os idosos. Ainda não existe vacina devido a quantidade de genótipos diferentes^{5,6}. A terapia empregada, além de causar diversos efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes, nem sempre é capaz de erradicar o vírus, sendo a melhor alternativa evitar comportamentos de risco⁷.

O diagnóstico da hepatite C é feito através de testes sorológicos que detectam anticorpos virais⁸ e testes de biologia molecular. Existem três tipos de testes no mercado: o ELISA (ensaio imunoenzimático), que detecta anticorpos anti-HCV; o RIBA (ensaio imunoblot recombinante), que forma reações de antígeno-anticorpo quando o sangue do paciente é colocado em contato com peptídeos recombinantes virais; e a PCR (reação em cadeia da polimerase), método molecular que detecta o HCV-RNA⁵ e é considerado o padrão ouro de diagnóstico⁹.

A transmissão do vírus ocorre classicamente através da via parenteral, sendo considerados grupos de risco indivíduos que receberam transfusão sanguínea ou hemoderivados, usuários de drogas intravenosas, tatuados, pacientes em hemodiálise ou os que foram submetidos a outras exposições percutâneas. O compartilhamento de lâminas de barbear e de escovas dentais também tem sido sugerido como capazes de transmitir o vírus⁷.

Apesar da transmissão do HCV através da exposição parenteral estar bem documentada na literatura, cerca de 40%¹² dos pacientes contaminados não apresentam história de exposição por esta via. Diante destes fatos, vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de estabelecer outras possíveis vias de transmissão.

De acordo com Chen *et al.*¹³, o HCV-RNA está presente na saliva de pelo menos 25% dos indivíduos infectados, com carga viral plasmática sendo o único fator preditivo conhecido¹⁴. Questões como o mecanismo através do qual o vírus entra na saliva, o significado clínico deste achado e a possível transmissão do HCV através da exposição a este fluido corporal, permanecem incertos¹². Observações clínicas sobre a transmissão do vírus C através de

mordidas humanas, com produção de ferida, foram relatadas na literatura, assim como a associação de patologias bucais e a presença do HCV na saliva⁸. Abe¹⁵, em estudo experimental, testou esta via de transmissão através da inoculação de saliva contaminada por HCV em chimpanzés e confirmou a transmissão viral aos animais receptores.

Estudos têm sugerido que a replicação deste vírus ocorre também nas células mononucleares sanguíneas periféricas¹⁶, nas glândulas submandibulares e em células epiteliais da mucosa oral¹⁷ tornando-o presente na secreção salivar dos infectados¹⁸. Entretanto, outras fontes possíveis de HCV na cavidade oral podem incluir o fluido do sulco gengival e a migração de células mononucleares da inflamação periodontal na interface dentogengival¹⁹.

Divergentes resultados encontrados na literatura acerca da presença de HCV-RNA na saliva podem ser explicados pelas diferentes técnicas utilizadas para coleta, estoque, manuseio das amostras, métodos diagnósticos e especialmente pela separação de células da saliva²⁰, refletindo a necessidade da realização de mais estudos que possam contribuir para a determinação do real papel da saliva na transmissão do HCV²¹. Além disto, se tal vírus é consistentemente detectado na saliva, e os níveis em fluidos orais correlacionam-se com os do sangue, a coleta de saliva proporcionaria um meio simples, barato e não-invasivo de detectar⁹ e monitorar a hepatite C. Diante disto, nosso objetivo foi pesquisar a presença do HCV-RNA no soro e na saliva de pacientes anti- HCV positivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº117/10) e todos os pacientes assinaram termos de consentimentos livres e esclarecidos desenvolvidos para este fim.

O trabalho consistiu em um estudo transversal. A amostra de conveniência foi composta por 54 pacientes atendidos no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco no período de junho a setembro de 2011.

Para ser incluído no estudo o paciente deveria apresentar sorologia positiva (anti-HCV) previamente realizada no serviço onde estava em acompanhamento e não estar fazendo uso de drogas antivirais há pelo menos 1 ano. Foram excluídos do estudo aqueles co-infectados com HBV ou HIV uma vez que a co-infecção diminui os níveis séricos virais²², os que faziam uso de medicamentos que alteram o fluxo salivar normal.

Foi realizada coleta de dados dos prontuários dos pacientes, tais como genótipo (daqueles que já apresentavam tal resultado), sexo, idade, complicações decorrentes da virose e comportamentos de risco e suscetibilidade.

A coleta de sangue e saliva foi realizada baseada no protocolo descrito por Gonçalves et al²³. Cada paciente foi submetido a punção venosa para coleta de 5 a 10 mL de sangue, em tubos de Vacutainer seco. Para a coleta da saliva o paciente deveria estar sem beber, comer ou fumar por um período mínimo de 60 minutos. Sentado em uma cadeira comum foram instruídos a

mastigar um fragmento de borracha macia (usada para garrote braquial, com 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento e estéril) durante dois a três minutos após os quais a saliva foi coletada em um funil de 10 cm de diâmetro colocado sobre um tubo de ensaio. Inspeção visual da cavidade oral foi realizada previamente, no intuito de identificar lesões ou alterações que sangrassem. Em nenhuma amostra foi identificada presença de sangue. Após a coleta, as amostras de sangue e saliva foram encaminhadas ao setor de virologia do laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami (LIKA-UFPE). As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600 rpm por 15 minutos, em um período de no máximo duas horas após a coleta, para separação do soro. As de saliva foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e as células desprezadas. Os soros e os sobrenadantes da saliva foram então armazenados a -80°C . O prazo máximo entre a coleta e o armazenamento das amostras foi de 2 horas .

O RNA foi extraído seguindo as instruções do Qiampr viral RNA isolation kit (Qiagen). Foi utilizada a técnica de RT-PCR aninhado como descrito por Chan e colaboradores²³, com modificações.

Síntese do DNA complementar. A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada com 4 μL da amostra do RNA extraído, utilizando-se 1 μL de transcriptase reversa (10.000 U, Promega, Madison wi USA), 4 μL de tampão 5x, 1 μL (10 pmol/ μL) do “primer” **209** (ATACTCGAGGTGCAGGGTCTACGAGACCT), 1 μL (10 mM) de cada nucleotídeo trifosforilado, 0,5 μL (2.500U) do inibidor de RNase (RNAsin, Promega, Madison wi USA). Com volume final (VF) de 20 μL . Com termociclagem de 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 10 minutos.

As amplificações pela PCR. A técnica utilizada foi a Nested-PCR que confere melhor eficiência e especificidade à reação e a região amplificada a 5NCR. A primeira amplificação foi feita tomando-se 2 μ l do cDNA o qual foi colocado em uma mistura contendo 5 μ l do tampão 5x, 5 μ l (25mM) de $MgCl_2$, 0,5 μ l (10 mM) de cada nucleotídeo trifosforilado, 1 μ l (10 pmol/ μ l) dos “primers” **939** (CTGTGAGGAACTACTGTCTT) e **209** e 0,35 μ l (500U) da Taq DNA polimerase (Promega, Madison wi USA). Com VF de 25 μ l. A mistura foi ciclada em um termociclador (Axygen, Maxigene Gradient) a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 50° C por 1 minuto , 72° C por 1 minuto; 1 ciclo a 72° C por 10 minutos .

A segunda amplificação pela PCR e termociclagem foram realizadas de modo semelhante ao descrito acima, mas usando como iniciadores os “primers” **940** (TTCACGCAGAAAGCGTCTAG) e **211** (CACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT).

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (2%), em aparelho Major Science, Minis 300 VS, corados com blue Green, visualizados através de transluminador UV e as imagens foram capturadas em um digitalizador de imagens (Fotodocumentador, Lab Trade) .

RESULTADOS

A população estudada foi composta por 54% de pessoas do sexo feminino, com idade média de 56 anos, a maioria na sexta década de vida (34%). Entre os fatores relatados que conferem maior suscetibilidade à infecção pelo HCV, a transfusão sanguínea foi a mais observada (38% dos casos). Entretanto, 22%(Tabela 2) não relataram histórico de exposição por via parenteral. Em 8 casos já haviam complicações decorrentes da virose, tais como fibrose hepática (4 casos), varizes hemorrágicas (3 casos) e cirrose (1 caso). Dos 50 pacientes anti-HCV positivos, 82% (41/50) foram HCV-RNA positivos e destes 29 já haviam sido genotipados no serviço onde estavam em acompanhamento, sendo 21 do genótipo 1 e 8 do genótipo 3. Em todos os casos de complicações os pacientes apresentavam o genótipo 1. Em relação à saliva, o HCV-RNA não foi identificado em nenhuma amostra.

DISCUSSÃO

A principal fonte de aquisição do HCV relatada em nosso estudo foi a transfusão sanguínea realizada antes do ano de 1993 (38%), época em que testes sorológicos para o vírus não eram realizados em doadores. Este achado foi semelhante ao reportado na literatura. Schmidt,²⁴ em estudo realizado em 1997 observou que 42% dos infectados pertenciam a este mesmo grupo de risco, assim como Bürgel²⁵, que em trabalho mais atual publicado em 2011 observou uma frequência de 37%. No entanto, para 22% dos pacientes a fonte de infecção era desconhecida, nenhum histórico de exposição por via parenteral foi relatado, uma frequência inferior à indicada em outros estudos, geralmente em torno de 40%²⁵.

Nem todos os indivíduos que se expõem ao HCV e apresentam o anti-HCV positivo desenvolvem a infecção, identificada por uma PCR positiva. A detecção da infecção por este vírus no presente estudo foi baseada na amplificação por RT-PCR de fragmentos a partir do 5NCR, a região mais conservada no seu genoma viral^{26,27,28}. A frequência do HCV-RNA no soro foi de 82% (41/50), confirmando que a infecção ativa pelo HCV desenvolve-se em uma grande proporção dos pacientes expostos. Esta frequência observada foi similar à reportada em outros estudos no país. Silva et al.²⁹, utilizando a mesma técnica aqui utilizada, detectaram o HCV-RNA em 65,4% das suas amostras. Gonçalves et al.²³, em estudo semelhante, porém utilizando amostras de plasma, observaram uma frequência de 82%. No entanto, a positividade para o HCV-RNA não pode ser excluída pela metodologia aqui utilizada. Estudos recentes têm sugerido que a detecção do HCV no soro ou no plasma é subestimada, e o uso de outras amostras, incluindo amostras total de sangue e

do tecido do fígado têm sido recomendados para aumentar a sensibilidade de detecção^{29,30}.

Já foi observado que o teste para RNA do HCV na saliva é menos sensível do que o teste no soro³¹ e uma grande variabilidade na frequência de detecção do HCV-RNA na saliva é reportada na literatura, com resultados variando de 0 a 100%³².

Estudos anteriores demonstraram a presença de HCV-RNA em leucócitos e células epiteliais presentes na saliva de pacientes com hepatite C²³. Takamatsu et al.¹⁸, Wang et al.³³, Harle et al.³⁴, Biasi et al.³⁵, Arrieta et al.¹⁷ e Lins et al.³⁶ relataram em seus estudos uma frequência de 100% na detecção de HCV-RNA na saliva de pacientes soropositivos para o HCV utilizando amostras de saliva total (sem centrifugação). Porém, nestes estudos amostras muito pequenas foram utilizadas (entre 1 e 9 casos) o que impossibilita uma extrapolação desses resultados para a população. vanDoornum³⁷ utilizando amostras de saliva total de 102 indivíduos não observou nenhum caso positivo. Além disto, este tipo de metodologia revelou em alguns estudos, casos de falso-positivos por motivos ainda obscuros³⁶.

Em nosso estudo, amostras de saliva livre de células foram utilizadas no intuito de excluir a possibilidade de falso-positivos. Não foi encontrada nenhuma amostra positiva para o HCV-RNA, corroborando com os achados de Hsu³⁸, e Fried³¹ que também não detectaram a presença do HCV-RNA em amostras semelhantes. Por outro lado, Gonçalves et al.²³ em estudo empregando a mesma metodologia aqui utilizada, observou uma frequência de HCV-RNA de 25%, resultado idêntico ao reportado por Chen¹⁴ em 1995.

Diversos estudos têm comparado a presença do HCV-RNA na saliva à carga viral, encontrando associações positivas entre estes fatores³⁹⁻⁴¹ e também associações negativas^{42,43}. Pastore et al.²⁶ detectaram o RNA do HCV em quase 40% das amostras de saliva de indivíduos cronicamente infectados e observou que a presença do HCV-RNA na saliva foi significativamente relacionado com os níveis de viremia no soro e o genótipo. Hermida et al.⁴¹ em um estudo similar utilizando nested RT-PCR para detectar o RNA do HCV em amostras de saliva de 61 pacientes infectados encontraram uma relação estatisticamente significativa entre a carga viral do HCV no plasma e na saliva ($P < 0,001$). Em estudo realizado em um sujeito com infecção aguda por HCV detectou-se a presença do HCV-RNA na saliva durante o curso clínico da infecção somente quando sua carga viral encontrava-se elevada no soro, após uma diminuição rápida a excreção pela saliva não foi observada, demonstrando que a presença do HCV-RNA na saliva é um processo dinâmico⁴⁴. Tal fato, explicaria a discrepância nos achados das diversas pesquisas. Porém, neste trabalho a carga viral não foi avaliada.

Desde a identificação do HCV por Choo¹ e colaboradores mais de 80 genótipos diferentes foram identificados. A distribuição varia de acordo com a localização geográfica e os genótipos 1,2 e 3 e seus subtipos são distribuídos por todo o mundo²⁹. Em nosso estudo foi observado um predomínio do genótipo 1 (21/29) seguido do genótipo 3 (8/29) resultado semelhante ao já descrito em outros estudos no país^{30,32}. Pesquisas sugerem que as características clínicas da doença no fígado dependem do genótipo do HCV¹⁷⁻²⁰. O genótipo 1 vem sendo associado a doenças de maior gravidade com evolução para cirrose hepática e câncer primário do fígado¹⁹. Entretanto,

observou-se em nosso estudo, que em todos os casos de complicações decorrentes da infecção pelo HCV todos os pacientes pertenciam ao genótipo

1.

CONCLUSÃO

O HCV-RNA foi detectado em 82% das amostras de soro dos pacientes anti-HCV positivos e não foi detectado em nenhuma das amostras de saliva destes indivíduos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Edmundo Lopes, responsável pelo setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-UFPE), ao Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami (LIKA-UFPE) e ao CNPq.

SUPORTE FINANCEIRO

Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq (processo nº 478311/2009-5).

REFERÊNCIAS

01. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* 1989; 244: 359-361.
02. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, et al. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 1995; 15; 132(4): 296-305.
03. Diz Dios P, Castro A, Rodriguez I, et al. HCV clearance patterns in saliva and serum of patients with chronic HCV infection under interferon plus ribavirin therapy. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 308–11.
04. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº34, de 28 de setembro de 2007. In: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2007.
05. Raggam RB, Wagner J, Michelin BD, et al. Reliable detection and quantitation of viral nucleic acids in oral fluid: liquid phase-based sample collection in conjunction with automated and standardized molecular assays. *J Med Virol* 2008; 80: 1684–8.
- 06 .Weiss, K. Hepatitis C: What a dentist should know. *J Can Dent Assoc* 1995; 61(6):537-40.
07. Alavian SM, Behnava B, Tabatabaei SV. Comparative efficacy and overall safety of different doses of consensus interferon for treatment of chronic HCV infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 1071–9.
08. Coates EA, Walsh L, Logan R. The increasing problem of hepatitis C virus infection. *Aust Dent J* 2001; 46(1): 13-7; quiz 53.

09. Slavkin HC. The A, B, C, D and E of viral hepatitis. J Am Dent Assoc 1996; 127(11): 667-70.
10. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. Hepatology 2002;36(5):21-9.
11. Epstein JB, Sherlock CH. Hepatitis C: rapid progress in medicine and implications for dentistry. J Can Dent Assoc 1994; 60(4): 323-9.
12. Larson AM, Carithers RL. Hepatitis C in clinical practice. J Intern Med 2001; 249(2):111-20.
13. Mahboobi N, Porter SR, Karayiannis P, et al. Oral fluid and hepatitis A, B and C: A literature review. J Oral Pathol Med 2011.
14. Chen M, Yun ZB, Sällberg M, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. J Med Virol 1995; 45(2): 223-6.
15. Acikgoz G, Cengiz MI, Keskiner I, et al. Correlation of hepatitis C antibody levels in gingival crevicular fluid and saliva of hepatitis C seropositive hemodialysis patients. Int J Dent 2009; 247-31.
16. Abe, K., and G. Inchauspe. Transmission of hepatitis C by saliva. Lancet 1991; 337:248.
17. Young KC, Chang TT, Liou TC, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. J Med Virol 1993;41:55–60.
18. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, et al. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. 2001. Am. J. Pathol. 158: 259–264.
19. Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, et al. Hepatitis C virus propagates in salivary glands. J Infect Dis 1992;165(5): 973-4.

20. Maticic M, Poljak M, Kramar B, et al. Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. *J Periodontol* 2001; 72(1): 11-6.
21. Kuo MY, Hahn LJ, Hong CY, et al. Low prevalence of hepatitis C virus infection among dentists in Taiwan. *J Med Virol* 1993; 40(1): 10-3.
22. Judd A, Parry J, Hickman M, et al. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J Med Virol* 2003; 71: 49–55.
23. Gonçalves PL, Cunha CB, Busek SCU, et al. Detection of hepatitis C vírus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis* 2005;9:28-34.
24. Schmidt WN, Wu P, Han JQ, et al. Distribution of hepatitis C virus (HCV) RNA in whole blood and blood cell fractions: plasma HCV RNA analysis underestimates circulating virus load. *J Infect Dis* 1997; 176: 20–26.
25. Bürgel B, Friesland M, Koch A, et al. Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells – evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *Journal of Viral Hepatitis*, 2011; 18, 562-570.
26. Pastore L, Fiore JR, Tateo M, et al. Detection of hepatitis C virus-RNA in saliva from chronically HCVinfected patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 217–24.
27. Li JS, Tong SP, Vitvitski L, et al. Single-step nested polymerase chain reaction for detection of different genotypes of hepatitis C virus. *J Med Virol* 1995;45: 151–155.
28. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;89: 4942–4946.

29. Silva LK, Parana R, Souza SP, et al. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. *AmJ Trop Med Hyg* 2000;62:257–260.
30. Kato N, Yokosuka O, Omata M, et al. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1995;86: 1764–1767.
31. Fried M.W., Shindo M., Fong T.L., et al. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992;102:1306-8.
32. Chan S.W., McOmish F., Holmes E.C., et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992;73:1131-41.
33. Bare P., Massud I., Belmonte L., et al. HCV recovery from peripheral blood mononuclear cell culture supernatants derived from HCV-HIV co-infected haemophilic patients with undetectable HCV viraemia. *Haemophilia* 2003;9:598-604.
34. Wang JT, Wang TH, Lin JT, et al. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with post-transfusion hepatitis C infection. *Lancet* 1991;337:48.
35. Harle JR, Swiader L, Disdier P, et al. Identifying hepatitis C virus by the gene amplification technique in the saliva of patients for whom the search is simultaneously negative in their serum: 9 cases. *Rev Med Interne* 1993;14:1005.
36. Lins L, Almeida H, Vitvisk L, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol* 2005; 77: 216–20.

37. van Doornum G.J., Lodder A., Buimer M., et al. Evaluation of hepatitis C antibody testing in saliva specimens collected by two different systems in comparison with HCV antibody and HCV RNA in serum. *J Med Virol* 2001;64:13-20.
38. Hsu H.H., Wright T.L., Luba D., et al. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology* 1991;14:763-7.
39. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010; 14: 1–21.
40. Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, et al. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 1999;27:86–91.
41. Hermida M, Ferreiro MC, Barral R, et al. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J. Virol. Methods* 2002;101:29–35.
42. Numata N, Ohori H, Hayakawa Y, et al. Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol* 1993;41:120–128.
43. Roy KM, Bagg J, Bird GL, et al. Serological and salivary markers compared with biochemical markers for monitoring interferon treatment for hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1995;47:429–434.
44. Rey D, Fritsch S, Schmitt C, et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in saliva and serum of patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 2001; 63:117–119.

APÊNDICES

APÊNDICE A: TABELA

TABELA 1: Sequência dos primers utilizados nas reações de RT-PCR

Primers	Sequência
209	ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT
211	CACTCTCGAGCACCTATCAGGCAGT
939	CTGTGAGGAACTACTGTCTT
940	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG

TABELA 2: Distribuição dos pacientes com anti-HCV positivos segundo comportamento de suscetibilidade à infecção

Comportamento	total de pacientes	% de pacientes
Transusão	19	38
Uso de drogas	8	16
Tatuagem	3	6
Hemodiálise	4	8
Durante atendimento odontológico	2	4
Manicure	2	4
Acidente ocupacional	1	2
Não relatou nenhum dos comportamentos acima	11	22

APÊNDICE B: Questionário da Pesquisa**FICHA CLÍNICA**

Nome: _____

Data: _____ Registro Geral: _____ N° do Paciente: _____

Filiação: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos e ____ meses

Gênero: _____ Estado Civil: _____ Profissão: _____

Identidade: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Médico Responsável: _____

Passado Clínico: _____

Passado Cirúrgico: _____

Histórico Familiar: _____

QP/HDA: _____

APÊNDICE C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – Grupos de Estudo

Título da pesquisa: PESQUISA DA EXCREÇÃO SALIVAR DO VÍRUS DA HEPATITE C ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Orientadora: Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosângela Coelho

Convidamos você para participação na pesquisa realizada pela cirurgiã-dentista Cristiane Araújo Simões, aluna do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, intitulada: Pesquisa da excreção salivar do vírus da hepatite C através da reação em cadeia da polimerase.

Sua participação poderá envolver um pequeno risco de constrangimento durante a coleta da saliva, ou pequena sensação dolorosa durante a coleta do sangue, mas não envolverá nenhum tipo de obrigação, da mesma forma que não interferirá em seu tratamento e atendimento, não haverá qualquer tipo de compensação financeira e você poderá desistir de participar a qualquer momento. A pesquisa só será realizada mediante esclarecimento e assinatura deste termo. Caso não concorde com a mesma, não será realizada.

Esse trabalho tem a finalidade de estudar o vírus da hepatite C e sua possível transmissão através da saliva de pacientes portadores de anticorpos do vírus da hepatite C (anti-HCV). Para fazer isso, a pesquisadora irá realizar uma única coleta de saliva e de sangue que posteriormente serão enviadas para um laboratório, onde será realizada uma análise para identificação do vírus.

Caso seja comprovada a relação entre a presença do vírus da hepatite C no soro e na saliva dos pacientes estudados, medidas preventivas poderão ser utilizadas em pacientes portadores do vírus trazendo como benefício a diminuição da transmissão da doença através de medidas educativas realizadas por meio da entrega de um protocolo contendo todas as formas de minimizar o risco de contaminação. Se algum dos pacientes estudados não apresentado anteriormente como portador da hepatite C apresentar o vírus na saliva, este será encaminhado ao serviço de gastrologia do Hospital das Clínicas da de Pernambuco para acompanhamento.

Poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa ou ensaio clínico através do endereço : Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, ou através do telefone: 2126 8588.

Compreendo que minha identidade será mantida em sigilo e que os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas. Após obter todas as informações sobre esse estudo, explicadas para mim em termos leigos e tendo pleno conhecimento de seu conteúdo, aceito participar voluntariamente.

Recife, _____ de _____ de 20____

Assinatura do Paciente

Assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

Cristiane Araújo Simões

CRO/PE: 8817

Fone: (81) 87838378

Endereço: rua Dr. Sabino Pinho, 143 – Madalena- Recife - PE

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 173/2010 - CEP/CCS Recife, 29 de Julho de 2010

Registro do SISNEP FR – 331431
 CAAE – 0115.0.172.000-10
 Registro CEP/CCS/UFPE Nº 117/10
 Título: "Pesquisa da excreção salivar do vírus da Hepatite C através da reação em cadeia da polimerase"

Pesquisador Responsável: Cristiana Araújo Simões

Senhor(a) Pesquisador(a):

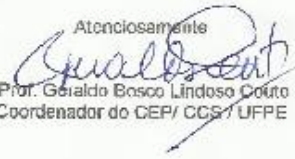
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 29 de Julho de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 08 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
 Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
 Cirurgiã-dentista Cristiane Araújo Simões
 Pós-Graduação em Odontologia- CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Iº andar, Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126-8588. cepccs@ufpe.br

ANEXO B: Normas da Revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Instructions for Authors

Submission

Instructions

The authors should submit their articles via website (www.sgponline.com.br/bjid).

Journal Sections

Manuscripts may be submitted within designated categories of communication, including:

- Original basic or clinical investigation (original papers);
- Brief reports of new methods or observations (brief communications);
- State-of-the-art presentations or reviews (review or mini reviewpapers);
- Case presentation and discussion (case reports);
- Clinical infectious diseases images;
- Letters to the editor concerning previous publications;
- Editor's corner, containing ideas, hypotheses and comments (Editorial).

Original

Papers

It is the most important section of the Journal. Original articles present new data about researches, issues and matters in the field of infectious diseases. These articles should conform strictly to the rules of publication, containing the following sections: abstract, objective or hypothesis, experimental design and methods used (statistical data), essential features of any interventions, main outcome measures, main results of the study, discussion and conclusion. An Original Paper should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- A running title with no more than 60 characters and spaces;
- The text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion, References);
- No more than 50 references;
- Number of authors should not exceed 10;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be an original paper.

Brief Communications

- An abstract of no more than 200 words;
- No more than 4 keywords;
- A running title with no more than 60 characters and spaces;
- Text should not exceed 12 double-spaced typed pages of 23 lines each;
- A maximum of 2 figures or tables (or one of each);
- No more than 20 references;
- The text should not be divided into separate sections;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a brief communication;

- Number of authors should not exceed 5.

Review Article

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- A running title with no more than 60 characters and spaces;
- No more than 80 references;
- The text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a review or mini review article.

Case Reports

Reports of clinical cases must contain a brief introduction about the nature of the case diagnosis, whose focus is the importance of the subject. The case has to be described with data and reports of examinations, treatment and prognosis of the case, discussion about the importance of the findings and presentation of the case in relation to literature. A case report should have a special interest to the clinical research community or it has to be a rare case; or to present a new diagnostic method; or new or modified treatment. A case report article should contain:

- An abstract of no more than 150 words;
- No more than 4 keywords;
- A running title with no more than 60 characters and spaces;
- No more than 20 references;
- The text may be divided into sections: brief introduction with a review of literature; case reports; and conclusion;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a case report article.

Clinical Infectious Diseases Images

- In one double-spaced electronic document, title (no more than eight words in the title; no more than five authors may be listed, including name, highest academic degree, address, e-mail address, telephone and fax number of each author);
- There is no abstract;
- The text should be uniform and contain no more than 300 words;
- It could present a minimum of references (no more than 4);
- Number of authors should not exceed 3.

Letters to the Editor

Letters may be written in response to previous content published in The Brazilian Journal of Infectious Diseases or on any topic of general interest or concern. In the first case, the letter must emphasize the main message of the author of the article, focusing the contribution of that scientific article in the medical practice, drawing attention to the reference and impact it had on the community. The Letter to the Editor should contain:

- In one double-spaced electronic document, title and the text with no more than 23 line pages;
- It could contain references, but no more than 5;
- Number of authors should not exceed 5.

Editorial

The editorial containing the authors' ideas, hypotheses, points of views and comments about a relevant subject. This section is also used to publish tributes or notices of congress and seminars. It should contain:

- In one double-spaced electronic document, title, no more than 3 authors and their affiliations, and the text with no more than 2 double-spaced pages with 23 line pages;
- Number of authors should not exceed 3.

Manuscript Formats

Cover Letter

For all manuscripts, authors must indicate in a cover letter:

- Title of article;
- Name(s) of all author(s);
- Address, telephone number, fax, and e-mail of the corresponding author;
- A statement signed by the corresponding author confirming that the manuscript content represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person;
- The registration number of all randomized controlled trials and clinical trials, in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors;
- In the same case, the corresponding author has to send a statement indicating that written informed consent was obtained from all participants;
- All original articles should indicate the number of the Ethics Committee approval. If the article does not require an approval from the Ethics Committee, the author should write it separately in the article;
- Animal experimentation should be carried out according to institutional guidelines for experimental use of animals;
- The authors should obtain written permission to reproduce figures and tables from other sources;
- If the study was supported by any institution, it has to be indicated in the cover letter.

The cover letter should be in one double-spaced electronic document, title (no more than eight words in the title); no more than five authors may be listed, including name, highest academic degree, address, email address, telephone and fax number of each author; the text should contain no more than 300 words. Supplements to the BJID include articles under a unifying theme, such as those summarizing presentations of symposia or focusing on a specific pathogenic process or antimicrobial agent. These will be added to the regular bi-monthly publication as appropriate, and will be peer reviewed in the same manner as submitted manuscripts.

For each manuscript a registration number will be assigned and the author notified that the manuscript is complete and adequate to start the review process.

Format of Articles and Letters

Contributions should be double-spaced and written in English or Portuguese (see item Translation). All manuscripts are to be typed double-spaced, including text, tables, references and legends; the character should be Times New Roman for all text, including figures, graphics and tables, or Symbol for Greek character; size 12 should be used in all manuscript. All pages are to be numbered, with the order of presentation as follows: title page, abstract, text, acknowledgements, references, tables, figure legends and figures. The manuscripts have to be saved in Word document and the figures should be saved in CorelDraw, JPG or TIF document.

with high resolution - minimum of 300 dpi.

Titles and Subtitles

- Titles should be in bold;
- Subtitles should be in underscore;
- Titles should not have abbreviations or acronyms;
- Titles should not exceed two printed lines;
- Do not exceed 80 characters (inc. spaces).

Author Affiliations

- Complete name of the authors (do not abbreviate);
- Affiliations of all authors, including highest degree and institution(s);
- Name, mailing addresses, phone and fax number, e-mail, state, city and country of the corresponding author;
- Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).

Head Running

- All manuscripts, except Clinical Infectious Diseases Images, Letters and Editorials have to indicate a running title;
- Do not exceed 60 characters (inc. spaces);
- Insert the head running at the top of the page.

Key Words

- Consider the manuscript formats to verify the number of keywords;
- Use capital letter for the first word, the other should be in regular form.

Abstract

- The abstract should briefly contain the objective, data, methods, results and discussion of the study or presentation to ensure the reader's understanding of the manuscript;
- Do not use abbreviations in abstract;
- Do not use references in abstract;
- Consider the manuscript formats to verify the number of words.

Introduction

- In the text of Introduction the authors have to reveal the aim of the study, the purpose of the research, and the basic literature about the subject.

Material and Methods

- This section should be subdivided by short underscore headings referring to methods used;
- This section cannot contain figures or tables;
- The material and methods used must be carefully described to allow the study repetition and to determine if the results were possible and correct;
- Papers with statistical testing should state the name of the test, the name for each analysis, the comparisons of interest, a justification of that test, the alpha level for all tests, whether the tests were over two-tailed, and the actual p-value for each test;
- Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include then for each data set, a clearly labeled measure of centre (such as the mean or median), and a

clearly labeled measure of variability (such as the standard deviation or range).

Results

- The data of the results should be described concisely;
- Tables, graphics and figures have to be inserted in this section;
- The data presented in this section have to be oriented by universal units;
- Tables should be clear enough to the authors do not need the text to understand them;
- Tables should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Tables have to be a short one-line title in bold;
- Tables have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the table;
- More information about the table should be below the symbols and abbreviations;
- If the table is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the Journal.

Figures/Graphics

- Figure legend should be listed one after the other, as a part of the text document, separate from the figure files, with a short one-line title in bold.
- Figures should be submitted in paper or in CDR, TIF, JPG file (300 dpi) or presented in glossy photographs or as highquality laser prints on bond paper;
- Figures should be clear enough that the authors do not need the text to understand them;
- Figures should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Figures have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the figure, as well as any other informations about the figures;
- If the figure is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the Journal.

Discussion

- The discussion presents the results comparing and evaluating them to literature and the existing knowledge. References to other studies should appear in the Discussion to compare the data obtained in the methods and results of the paper.

Conclusion

- In this section the authors confirm or not their interpretation presented in Discussion with the existing literature. In this section the authors recommend if it is important to have more data, if the study is a innovative point of view of a subject, or if the study confirms the knowledge about the subject.

Acknowledgments

- Authors can thank anyone who helped them do the work or study.

Finnancial Support

- The authors must indicate in the cover letter if the study was supported by institutions.

Footnotes

- Footnotes should be numbered consecutively and must appear superscripted and in Arabic number in the text; and their information has to be informed at the bottom of the page they appeared.

Abbreviations and symbols

- All abbreviations have to be explained in the text, figure and table legends when they first appear;
- Include the abbreviation in parenthesis after they first appearance.
- Do not abbreviate units [(5 mL, not 5 milliliters (mL))];
- Do not abbreviate institutions;
- Abbreviations must follow the format of the National Library of Medicine (USA) as in Index Medicus.

Units

- Follow the use of the The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>).

References

- They should go in the final part of the article, according to the quotation order in the text, in which should appear the Arabic numerals superscripted. Please quote all the authors in works with until six authors; after six authors, quote the first three followed by the expression et al. Reference Manager or Endnote programs are strongly recommended for use adopting the "Vancouver" style.

Examples for reference citation are presented below. Authors should consult NLM's Citing Medicine for additional information on the reference formats.

Article

Smith JC, Charles RS. Microbes and water filters. *Journal of Water Purification* 1996; 20:165-70.

Chang ML, Yang CW, Chen JC et al. Disproportional exaggerated aspartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:5553-6.

Book

Taylor DM, Personnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin J eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1994.

Book

Polak JM, Van Noorden S. *An introduction to immunochemistry: current techniques and problems*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1987.

Abstract

Blatt SP, Butzin CA, Lucey DR, Melcher GP, Hendrix CR. Anergy status and CD4 CD29 memory T-cells predict progression to AIDS (abstract PoB 3480). In: *Program and abstracts: VIII International Conference on AIDS (Amsterdam)*. Amsterdam: CONGREX Holland, 1992.

SCOPE AND POLICY

The aim of The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) is to be relevant in the broadest sense to all aspects of Infectious Diseases and its fields. The manuscripts submitted to BJID should develop new concepts or experimental approaches; they have to describe new principles or improvement of an existing method and their results; they have to bring new data about a subject which will be important to physicians; so they could not be a single presentation of known data.

TRANSLATION

The Brazilian Journal of Infectious Diseases was established to provide the Brazilian scientific community with a vehicle for publishing and widely distributing our research. To attain this goal and to make access to publication easier for our contributors, it was decided before we printed the first issue that the BJID would accept papers written in Portuguese, even though the Journal is published in English. During the first two years, the BJID absorbed the financial cost of translating papers submitted in Portuguese into English. Due to the escalating cost of translation, and in order to balance our finances and ensure continued publication, the editorial board recently decided that the Journal can no longer bear the financial burden for translation. We will continue to accept papers written in Portuguese, but translation costs will have to be paid by the authors. After the review process, when the authors are notified that a manuscript is accepted, authors will be asked to arrange for the translation, or if it is done by the BJID, the cost for translation will be billed along with instructions for payment. The BJID will continue to publish papers submitted in English at no additional cost.

PUBLICATION ETHICS

- All the listed authors have to agree on all contents (authors must sign the agreement upon receiving it with the article galley proof) and they are responsible for all informations included in the text.
- The corresponding author is responsible for all communications between the journal and all coauthors, before and after publication.
- The corresponding author has to make a statement confirming that the content of the manuscript represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person.
- Any changes to the author list after submission, such as a change in the order of the authors, or the deletion or addition of authors, needs to be approved by a signed letter from every author.
- The editors of BJID may seek advice about submitted papers not only from technical reviewers but also on any aspect of a paper that raises concerns. These may include, for example, ethical issues or issues of data or materials access.
- The authors warrant that the manuscript is original and contains no matter which is defamatory or is otherwise unlawful or which invades individual privacy or infringes any proprietary right or any statutory copyright.

DUPLICATE PUBLICATION

All manuscripts submitted to BJID must be original and not published or submitted for publication elsewhere.

PLAGIARISM AND FABRICATION

If a case of plagiarism occurs in BJID, a determination of misconduct will lead the BJID to exclude the article from the submission process or, if the article was already published, to exclude from the publication, and the authors will be accountable for the plagiarism.

CONFIDENTIALITY

The journal editors treat the submitted manuscript and all communication with the authors as confidential between themselves and the peer-reviewers. Similarly, authors must treat communication with the journal as confidential.

PAGE CHARGES

There is no charge to publish in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID).

REPRINTS

The Journal can provide reprints to corresponding authors.

PERMISSIONS

Copyright 2010 by The Brazilian Journal of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. All rights reserved. Except as authorized in the accompanying statement, no part of the BJID may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without the publisher's written permission. Authorization to photocopy items for internal or personal use, or the internal or personal use by specific clients is granted by The Brazilian Journal of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. for libraries and other users. This authorization does not extend to other kinds of copying such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works, or for resale.

COPYRIGHT

The authors grant and assign the entire copyright to the BJID and Elsevier Editora Ltda. for its exclusive use. The copyright consists of any and all rights of whatever kind or nature protected by the copyright laws of Brazil and of all foreign countries, in all languages and forms of communication, and the BJID and Elsevier Editora Ltda. shall be the sole proprietors thereof. The author(s) agree(s) to indemnify and hold the BJID and Elsevier Editora Ltda. harmless against any claim to the contrary.

PEER REVIEW

The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) is a peer-review Journal, so all papers (except Letters to the Editor) are evaluated by this system. If the paper follows the scope of the Journal, it will be sent to 2 or 3 independent reviewers, selected by the editors (2 from the editorial board and 1 any other expertise). Authors may suggest appropriate consultants for review of the manuscript, but these suggestions may not be followed.

Timing

The review process will ordinarily require two months.

ANEXO C: Artigo Completo Publicado

Artigo Original
MO Radioinduzida Agravada por *Candida*
Artigo submetido em 29/7/10; aceito para publicação em 24/11/10

***Candida* Oral como Fator Agravante da Mucosite Radioinduzida** *Oral Candida as an Aggravating Factor of Mucositis Induced by Radiotherapy* **Candidiasis Bucal como Factor Agravante de la Mucositis Radioinducida**

Cristiane Araújo Simões¹, Jurema Freire Lisboa de Castro², Claudia Caza³

Resumo

Introdução: O tratamento antineoplásico provoca algumas sequelas indesejáveis no paciente com câncer de cabeça e pescoço. Muitas vezes, o surgimento de manifestações clínicas graves, como as mucosites, obriga a interrupção temporária do tratamento, diminuindo a qualidade de vida do paciente e aumentando os custos do seu internamento. É possível que a mucosite oral induzida pela irradiação e quimioterapia seja agravada por infecções fúngicas oportunistas que a torna mais resistente aos tratamentos convencionais. **Objetivos:** Este trabalho tem como objetivos identificar a presença de espécies de *Candida* e analisar a possibilidade deste fungo atuar como fator agravante da mucosite em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, os quais estejam sendo submetidos ao tratamento antineoplásico. **Método:** Os pacientes foram selecionados de modo consecutivo no Hospital do Câncer de Pernambuco no período compreendido entre outubro de 2008 a abril de 2009. A prevalência de *Candida sp* foi mensurada através da análise de raspados citológicos dos pacientes com mucosite oral. A presença do fungo foi correlacionada com o grau de severidade das lesões de mucosite. **Resultados:** Os resultados mostraram uma associação positiva entre a colonização fúngica e as lesões mais severas (graus III e IV). **Conclusão:** Os resultados apresentados podem contribuir para a resolução de mucosites não convencionais, as quais não respondem ao tratamento usual.

Palavras-chave: Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Terapia; Complicações; Mucosite; *Candida*; Qualidade de Vida

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Professora adjunta do Curso de Odontologia da UFPE.

³Professora substituta do Curso de Odontologia da UFPE.

Endereço para correspondência: Avenida Bernardo Vieira de Melo, 2.946 – apto. 501. Jaboatão dos Guararapes (PE), Brasil. CEP: 54410-010.
E-mail: jlisboa72@hotmail.com

ANEXO D: Artigo enviado para publicação

TÍTULO: Pyogenic granuloma on buccal mucosa-labial commissure interface.

Dear Dr. Correia,

Thank you for submitting your manuscript to *General Dentistry*. As with all of the manuscripts we receive, it will be sent through our peer-review process and then to our Editor for a final decision. Once the Editor has made his decision, we will notify you with the results. **This process can take up to four months.**

Should you have any questions in the meantime, please feel free to contact me using the information below. Again, thank you for submitting your manuscript to *General Dentistry* and for your interest in the AGD.

Sincerely,

Ms. Tiffany Nicole Slade
Editorial Associate | *General Dentistry*
Academy of General Dentistry
211 E. Chicago Ave., Suite 900 | Chicago, IL 60611
P: (312) 440-4092 | F: (312) 440-0559
E: tiffany.slade@agd.org | www.agd.org