

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

**A LEUCOPLASIA PILOSA ORAL COMO UM POSSÍVEL MARCADOR DE  
COMPROMETIMENTO IMUNE – ESTUDO CITOPATOLÓGICO EM PACIENTES  
SUBMETIDOS À TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA**

Aracaju/SE  
Fevereiro/2014

**DIEGO DA CRUZ COELHO**

**A LEUCOPLASIA PILOSA ORAL COMO UM POSSÍVEL MARCADOR DE  
COMPROMETIMENTO IMUNE – ESTUDO CITOPATOLÓGICO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS À TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da  
Silva.

Aracaju/SE  
Fevereiro/2014

**DIEGO DA CRUZ COELHO**

**A LEUCOPLASIA PILOSA ORAL COMO UM POSSÍVEL MARCADOR DE  
COMPROMETIMENTO IMUNE – ESTUDO CITOPATOLÓGICO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS À TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da  
Silva.

Data de Aprovação: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora (Defesa):

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva

---

Prof. Dr. Paulo Almeida Júnior

---

Profa. Dra. Débora dos Santos Tavares

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha avó Ilda, cujo amor sempre  
estará presente em meus dias*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Zilma e Joselito, e minha irmã, Mariana, que sempre me deram apoio e suporte emocional para conclusão de mais esta etapa.

À Universidade Federal de Sergipe, por ser essa instituição digna e respeitada, que me proporcionou além da graduação, o retorno ao Departamento de Odontologia, agora como pós-graduando.

Ao meu orientador Luiz Carlos, por toda paciência, ajuda e compreensão devido aos problemas encontrados para realização deste trabalho e pelas palavras firmes quando se fizeram necessárias.

Às professoras Marta Piva e Débora Tavares que me apresentaram este tema de estudo, que sempre me ajudaram quanto às dúvidas relacionadas à patologia oral, fazendo despertar uma paixão esquecida pela patologia oral.

Ao professor Wilton Takeshita que se demonstrou altamente solícito e disposto a ajudar na preparação dos dados estatístico para realização deste trabalho.

A todos os professores da pós-graduação (PRODONTO), que com seus conhecimentos, buscaram burilar os nossos, e nos incentivaram a crescer profissionalmente.

Aos amigos Charles Vinícius, vulgo Miguxo, por todo apoio, ajuda e resgate para o mundo jovem selvagem nos momentos críticos, e João Vitor, vulgo Babão, que sempre esteve presente, quando necessário, durante esta jornada.

Aos companheiros da banda Bom Apetite pela compreensão das ausências e por me darem o prazer da fuga ao mundo musical.

A todos os colegas de turma pelas experiências divididas, trabalhos em grupo, críticas após os seminários, com certeza tudo isso fez diferença. Em

especial gostaria de agradecer a Gabi, Vanessa, Liliane, Michele, Breno, que me aturaram todo esse tempo, me deram sua amizade, mesmo eu sendo um tanto antissocial, sobretudo, a Gabi que trilha esta jornada comigo desde os tempos de graduação sempre com muito carinho e apoio.

A Dr. Caetano Marceira, Eutênia e Isabela por toda a ajuda e presença durante a realização deste estudo.

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para dedicação ao mestrado.

A todos que contribuíram e torceram por mim de alguma forma e, por fim, a Deus que proporcionou vivenciar toda esta experiência, colocando as pessoas certas, todos os citados, em meu caminho.

## Epígrafe

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis. É preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

A leucoplasia pilosa oral (LPO) é uma lesão epitelial não maligna que ocorre normalmente nas bordas laterais da língua, causada pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Esta patologia é quase que exclusivamente vista em pacientes imunocomprometidos, particularmente em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Contudo, a LPO está relacionada com imunossupressão em geral, sendo descrita em pacientes que receberam terapia imunossupressora. O diagnóstico da LPO, na sua forma clínica ou subclínica, pode ser feito através da detecção dos efeitos citopáticos do EBV nas células epiteliais. Assim, a proposição deste estudo foi avaliar a leucoplasia pilosa oral como um possível marcador de comprometimento imune, através de um estudo citopatológico em pacientes submetidos à terapia imunossupressora. Foram avaliados 40 pacientes portadores de doenças autoimunes, sob tratamento imunossupressor, recrutados a partir de demanda espontânea de uma população de pacientes regularmente atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Foram realizados anamnese e exame físico intraoral e, logo após, foram realizadas duas raspagens de borda lateral da língua, uma para cada lado, seguida da confecção de dois esfregaços em lâminas de vidro convencionais para serem corados pela técnica de Papanicolaou. Posteriormente, consultado prontuário médico a fim de colher dados referentes ao diagnóstico da doença de base, tempo de diagnóstico, tipo e tempo de terapia imunossupressora e contagem leucocitária. Os esfregaços corados por Papanicolaou foram avaliados quanto às alterações nucleares representativas do efeito citopático do EBV, que representam o critério de diagnóstico citopatológico da leucoplasia pilosa oral. A maioria dos pacientes examinados pertencia ao gênero feminino (70%) e a média geral de idade encontrada foi de  $40,5 \pm 16,1$  anos. A LPO subclínica foi observada em 52,5% dos pacientes. Assim, sugere-se a utilização do raspado bilateral da língua para diagnóstico citopatológico de LPO subclínica como ferramenta de acompanhamento clínico-laboratorial de pacientes imunossuprimidos, a fim de, em última instância, minimizar a ocorrência de doenças oportunistas através da modulação da terapia empregada.

Descritores: LEUCOPLASIA PILOSA, VÍRUS EPSTEIN-BARR, IMUNOSSUPRESSÃO.

## ABSTRACT

The oral hairy leukoplakia (OHL) is a non-malignant epithelial lesions that usually occurs along the side edges of the tongue caused by the Epstein -Barr virus (EBV). This disease is almost exclusively seen in immunocompromised patients, particularly in individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV). However, the OHL is related to immunosuppression in general, been described in patients receiving immunosuppressive therapy. The diagnosis of OHL in its clinical or subclinical form, can be done through the detection of EBV cytopathic effects in epithelial cells. Thus, the proposition of this study was to evaluate the oral hairy leukoplakia as a possible marker of immune impairment, through a cytological study in patients undergoing immunosuppressive therapy. 40 patients with autoimmune diseases were evaluated under immunosuppressive treatment, recruited from spontaneous demand of a population of patients regularly treated at the Department of Rheumatology, University Hospital, Federal University of Sergipe. Intraoral history and physical examination were performed, and soon after, two sweeps lateral border of the tongue, one for each side, then the construct two smears on conventional glass slides to be stained by the Papanicolaou technique were performed. Subsequently consulted medical records in order to collect data regarding the diagnosis of the underlying disease, time since diagnosis, type and duration of immunosuppressive therapy and WBC count. Stained by Papanicolaou smears were evaluated for representative nuclear changes cytopathic effect of EBV, which represent the criterion of cytological diagnosis of oral hairy leukoplakia. Most of the examined patients were females (70%) and the overall mean age was  $40.5 \pm 16.1$  years. Subclinical LPO was observed in 52.5% of patients. Thus, the use of shaved bilateral language for cytological diagnosis of subclinical LPO as clinical and laboratory monitoring tool immunosuppressed patients, in order, ultimately, minimize the occurrence of opportunistic diseases through modulation of therapy used is suggested.

Key-words: HAIRY LEUKOPLAKIA, EPSTEIN-BARR VIRUS, IMMUNOSUPPRESSION

# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b>	xi
<b>Lista de Figuras</b>	xii
<b>Lista de Tabelas</b>	xiv
<b>1 Introdução</b>	15
<b>2 Revisão da Literatura</b>	17
2.1 Vírus Epstein-Barr	17
2.2 Leucoplasia Pilosa Oral	19
2.3 Leucoplasia Pilosa Oral Subclínica	21
2.4 Citologia Esfoliativa Oral	23
2.5 Leucoplasia Pilosa Oral em pacientes soronegativos para o HIV	27
2.6 Imunossupressão	30
<b>3 Proposição</b>	33
<b>4 Materiais e Método</b>	34
4.1 Desenho do estudo	34
4.2 Casuística	34
4.3 Anamnese e exame físico	35
4.4 Coleta e processamento do material	35
4.4.1 Bordas laterais da língua	35
4.4.2 Citopatologia	35

4.5 Análise estatística	36
<b>5 Resultados</b>	<b>37</b>
5.1 Características gerais da amostra	37
5.1.1 Dados demográficos	37
5.1.2 Perfil clínico e imunológico	37
5.2 Análise citopatológica	40
5.3 Características dos pacientes portadores de leucoplasia pilosa oral subclínica	42
5.3.1 Dados demográficos	42
5.3.2 Perfil clínico e imunológico	42
5.5 Relação da leucoplasia pilosa oral subclínica com tipo de imunossupressor e tempo de terapia	44
<b>6 Discussão</b>	<b>46</b>
<b>7 Conclusão</b>	<b>49</b>
<b>Referências</b>	<b>50</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

LPO	Leucoplasia pilosa oral
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
EBV	Vírus Epstein-Barr
NK	<i>Natural Killer</i>
EBNAs	Antígenos nucleares do EBV
NC	Núcleo em colar
CA	Cowdry A
VF	Vidro fosco
DM	Diabetes mellitus
PCR	Reação em cadeia polimerase
HSV	Vírus do herpes simples
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
Anti-TNF	Anti-Fator de necrose tumoral
Anti-IL6	Anti-interleucina 6
TNF	Fator de necrose tumoral
HU-UFS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico de distribuição geral quanto ao diagnóstico de base.	38
Figura 2	Gráfico de distribuição geral quanto ao tipo de imunossupressor.	39
Figura 3	Gráfico de distribuição geral quanto à condição leucocitária.	39
Figura 4	Gráfico de distribuição quanto ao diagnóstico de leucoplasia pilosa oral subclínica.	40
Figura 5	Gráfico de distribuição quanto ao tipo de alteração nuclear.	40
Figura 6	A - Inclusão tipo Cowdry A, coloração Papanicolau (400x); B - Inclusão tipo Cowdry A, coloração Papanicolau (400x); C - Inclusão tipo vidro fosco e Cowdry A, coloração Papanicolau (400x); D - Inclusão tipo vidro fosco, coloração Papanicolau (400x); E - Inclusão tipo núcleo em colar, coloração Papanicolau (400x); F - Inclusão tipo núcleo em colar, coloração Papanicolau (400x).	41
Figura 7	Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica quanto ao diagnóstico de base.	43
Figura 8	Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica quanto ao tipo de imunossupressor.	43
Figura 9	Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO	44

subclínica quanto à condição leucocitária.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos pacientes com terapia imunossupressora e teste qui-quadrado.	38
Tabela 2	Distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica e teste qui-quadrado.	42
Tabela 3	Tipo de imunossupressor e LPO subclínica	45
Tabela 4	Tempo de terapia X LPO subclínica	45

## 1 INTRODUÇÃO

A leucoplasia pilosa oral (LPO) é uma das muitas entidades patológicas que ganharam notoriedade após a epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Triantos, Porter *et al.*, 1997). É uma lesão não maligna, associada ao vírus Epstein Barr (EBV), que se apresenta clinicamente como uma lesão branca, assintomática, não removível à raspagem, ocorrendo mais comumente em bordo lateral de língua ou superfície ventral. As lesões raramente se estendem por toda superfície lateral de língua e dificilmente envolvem a mucosa bucal (Walling, Flaitz *et al.*, 2003; Dias, Israel *et al.*, 2006; Lewis, 2011).

A LPO foi inicialmente descrita como sendo exclusiva em pacientes com AIDS, porém, mais tarde, foi diagnosticada em pacientes imunossuprimidos soronegativos para o HIV (Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008). Esta lesão pode manifestar-se tanto na forma clínica quanto na forma subclínica, a qual foi descrita após detecção do EBV em línguas clinicamente saudáveis (Dias, Rocha *et al.*, 2000).

Devido suas características clínicas, o diagnóstico diferencial deve ser realizado excluindo lesões clinicamente semelhantes, tais como candidíase hiperplásica, líquen plano, entre outras (Komatsu, Rivero *et al.*, 2005). As características histológicas não são exclusivas para esta lesão (Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008), podendo esta ser diagnosticada por meio de citologia esfoliativa (Epstein, Fatahzadeh *et al.*, 1995).

A citologia esfoliativa é um procedimento simples e não invasivo, utilizada como ferramenta diagnóstica para várias doenças da cavidade oral (Acha, Ruesga *et al.*, 2005), que se demonstrou eficaz para o diagnóstico da LPO, onde é possível identificar alterações nucleares específicas resultantes do efeito citopático do EBV nos queratinócitos (Migliorati, Jones *et al.*, 1993).

Devido ao fato da LPO estar associada à imunossupressão em geral, não necessariamente apenas ao HIV, o diagnóstico precoce e de forma não invasiva desta patologia representa um forte aliado para o controle terapêutico de patologias

relacionadas ao sistema imune, evitando-se infecções oportunistas e, conseqüentemente, trazendo melhor qualidade de vida aos pacientes.

Assim, os objetivos deste estudo foram: avaliar a prevalência de leucoplasia pilosa oral, subclínica, em uma população de pacientes atendidos no Serviço de Reumatologia da Universidade Federal de Sergipe; descrever o perfil epidemiológico da amostra (idade e sexo); descrever o perfil clínico e imunológico da amostra (uso de drogas imunossupressoras: tipo e tempo de uso do imunossupressor); determinar qual alteração nuclear pelo efeito citopático do EBV foi mais frequente; correlacionar a presença de LPO com o tempo de terapia imunossupressora; correlacionar a presença de LPO com o tipo de terapia imunossupressora; verificar a importância da utilização do exame citopatológico da língua no acompanhamento de pacientes submetidos à terapia imunossupressora; avaliar o papel da leucoplasia pilosa oral subclínica como possível marcador de comprometimento imune.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr é um herpes-vírus humano, pertencente à família Herpesviridae, subfamília gama, gênero Lymphocryptovirus (Slots, Saygun *et al.*, 2006; Gonzalez, Correnti *et al.*, 2010). Sua descoberta ocorreu em 1964, quando Epstein, Barr e Achong determinaram um herpes-vírus, até então desconhecido, como agente causador do linfoma de Burkitt. Quatro anos mais tarde, em 1968, foi demonstrado que o EBV é o principal agente etiológico da mononucleose infecciosa (Cohen, 2000; Slots, Saygun *et al.*, 2006).

O virion do EBV é composto por uma cadeia linear e dupla de DNA em um nucleocápside icosaédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro, rodeado por um tegumento proteico e um envelope de bicamada lipídica, derivado da membrana nuclear interna da célula hospedeira (Slots, Saygun *et al.*, 2006).

O EBV infecta entre 90% e 95% da população e, além das doenças citadas anteriormente, está associado ao linfoma imunoblástico, linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma de células escamosas (Walling, Flaitz *et al.*, 2003; Walling, Flaitz *et al.*, 2004; Tugizov, Herrera *et al.*, 2007; Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008). Entretanto, na maioria dos indivíduos imunocompetentes o EBV permanece na forma latente e não provoca nenhuma doença significativa (Tugizov, Herrera *et al.*, 2007).

Os seres humanos são o único reservatório conhecido do EBV (Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008). A transmissão do vírus ocorre geralmente pela saliva, através do contato íntimo oral ou, possivelmente, por resíduos de saliva deixados em objetos ou alimentos (Cohen, 2000; Slots, Saygun *et al.*, 2006; Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008). Após a inoculação inicial, o vírus infecta as células epiteliais da oro e nasofaringe e provoca lise celular através da liberação de novas partículas virais que podem se disseminar para outras estruturas, como células dos ductos das glândulas salivares e tecidos linfoides da orofaringe (Mendoza, Diamantis *et al.*,

2008). Indivíduos imunocomprometidos rotineiramente apresentam alto nível de liberação do EBV via oral. No entanto, em uma pequena amostra de 9 indivíduos saudáveis, Walling et al. (2003) encontraram exemplares de altos níveis salivares de EBV, com até 5 genótipos diferentes. Os autores afirmaram que a grande diferença do comportamento do EBV entre indivíduos imunocomprometidos e saudáveis sugere que o estado de imunocomprometimento simplesmente desmascara ou exagera aspectos intrínsecos ao relacionamento normal entre EBV e hospedeiro. Assim, reativações mais frequentes e maiores níveis de replicação viral em indivíduos imunocomprometidos permitem que infecções preexistentes do EBV sejam detectadas mais facilmente.

Embora alguns estudos indiquem que a replicação do EBV ocorra nas células epiteliais da orofaringe, outros apontam que as células B, subsequentemente infectadas, possam ser o principal local de replicação viral (Cohen, 2000; Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008) onde o vírus pode permanecer de forma latente por toda vida (Walling, Flaitz *et al.*, 2003). O EBV apresenta um tropismo elevado para as células B devido a sua capacidade de ligar-se à molécula de superfície CD21 específica de linfócitos B (Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008). Após a infecção das células B, o genoma linear do EBV torna-se circular permanecendo latente. A replicação viral espontânea é ativada apenas em uma pequena porcentagem das células B (Cohen, 2000). O EBV também é capaz de infectar células T, células *natural killer* (NK), células do músculo liso, células endoteliais, macrófagos e monócitos (Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008). Um estudo de Tugizov et al., 2007, sugeriu que, assim como os linfócitos B, monócitos e macrófagos teciduais circulantes podem servir como reservatório para a infecção pelo EBV. Uma vez que monócitos circulantes podem migrar para sítios teciduais, incluindo a mucosa oral, os monócitos infectados pelo EBV podem servir como um veículo para a transmissão do vírus entre sangue e mucosa bucal (Tugizov, Herrera *et al.*, 2007). A entrada de EBV em células epiteliais não polarizadas não requer a endocitose de viriões, e este processo é provavelmente iniciado por fusão direta das membranas virais e celulares (Tugizov, Herrera *et al.*, 2013).

Durante a infecção primária, tanto a imunidade humoral quanto a celular são ativadas. O controle celular da proliferação viral fica a cargo das células NK e das

células T CD4+ e CD8+ citotóxicas. Depois da recuperação da infecção aguda, a resposta humoral estimula a produção de anticorpos dirigidos proteínas virais, particularmente os antígenos nucleares do EBV (EBNAs) (Cohen, 2000; Mendoza, Diamantis *et al.*, 2008). Contudo, a persistência do EBV, apesar das potentes respostas imunes contra ele, indica que o vírus tem evoluído desenvolvendo estratégias, como codificação de citocinas e receptores de citocinas, que podem modular o sistema imune e permitir a infecção persistente (Cohen, 2000).

## 2.2 Leucoplasia Pilosa Oral

A leucoplasia pilosa oral (LPO) é uma doença epitelial não maligna que ocorre normalmente nas bordas laterais da língua (Walling, Flaitz *et al.*, 2003). Foi primeiramente relatada por Greenspan, no ano de 1984, em homossexuais masculinos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e foi pensado ser patognomônico para infecção por HIV (Greenspan, Greenspan *et al.*, 1984). Clinicamente, a LPO é caracterizada por uma lesão branca assintomática, não removível à raspagem, com aparência ondulada ou semelhante a pelos que ocorrem verticalmente em bordo lateral de língua (Felix, Watret *et al.*, 1992; Epstein, Sherlock *et al.*, 1993; Komatsu, Rivero *et al.*, 2005; Slots, Saygun *et al.*, 2006; Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008). A LPO segue um curso autolimitado, com resolução espontânea dentro de alguns meses em pessoas imunocompensadas. No entanto, as lesões podem reaparecer repetidamente (Milagres, Dias *et al.*, 2007).

Esta patologia é quase que exclusivamente vista em pacientes imunocomprometidos, particularmente em indivíduos infectados pelo HIV, onde a LPO pode servir como um indicador de progressão para a AIDS. Contudo, a LPO está relacionada com imunossupressão em geral, sendo descrita em pacientes que receberam terapia imunossupressora para leucemia aguda, para pacientes no pós-transplante de órgãos sólidos e de medula óssea (Epstein, Fatahzadeh *et al.*, 1995; Komatsu, Rivero *et al.*, 2005; Slots, Saygun *et al.*, 2006; Gonzalez, Correnti *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que, apesar de ser um evento raro, casos de LPO em pacientes não imunossuprimidos e HIV-negativos são descritos na literatura (Itin,

1990; Piperi, Omlie *et al.*, 2010; Graboyes, Allen *et al.*, 2013). Devido às suas características, a LPO pode ser confundida com outras lesões brancas que acometem a cavidade oral, tais como candidíase crônica hiperplásica, ceratose friccional, leucoplasia idiopática, leucoplasia associada ao tabaco, lesões galvânicas, língua geográfica, nevo branco esponjoso e líquen plano (Komatsu, Rivero *et al.*, 2005).

A etiologia da LPO está relacionada com a infecção das células epiteliais da mucosa bucal pelo vírus Espstein-Barr (EBV) (Slots, Saygun *et al.*, 2006; Milagres, Dias *et al.*, 2007; Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008; Gonzalez, Correnti *et al.*, 2010; Lewis, 2011; Braz-Silva, Santos *et al.*, 2013). Seu diagnóstico geralmente é feito clinicamente e pode ser confirmado por biópsia, embora as características histopatológicas não sejam específicas para esta doença. Histologicamente, a LPO pode apresentar hiperqueratose/hiperparaqueratose, hiperplasia epitelial, degeneração hidrópica, acantose e infiltrado inflamatório de leve a moderado no tecido conjuntivo (Epstein, Sherlock *et al.*, 1993; Walling, Flaitz *et al.*, 2003; Dias, Israel *et al.*, 2006; Slots, Saygun *et al.*, 2006; Milagres, Dias *et al.*, 2007; Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008; Braz-Silva, Santos *et al.*, 2013). Estudos anteriores sugeriram que a análise das características clínicas, associadas aos achados histopatológicos, eram suficientes para estabelecer um diagnóstico. Contudo, atualmente se aceita que a confirmação da presença do EBV no tecido é necessária para o diagnóstico definitivo (Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008; Gonzalez, Correnti *et al.*, 2010).

O EBV pode ser detectado através de várias técnicas, tais como a reação em cadeia da polimerase, a hibridização *in situ*, imuno-histoquímica, imunocitoquímica, e microscopia electrónica (Braz-Silva, De Rezende *et al.*, 2008). Braz-Silva *et al.*, (2013), afirmaram que, até agora, o padrão-ouro para detecção do EBV e diagnóstico da LPO ainda é a hibridização *in situ*. Entretanto, Milagres *et al.*, em 2007, afirmaram que as alterações nucleares, que representam o efeito citopático do EBV nos queratinócitos (inclusão tipo Cowdry A, núcleo em “vidro fosco” e núcleo “em colar”), observadas em citopatologia, são específicas e suficientes para o diagnóstico definitivo da LPO, independente da identificação do vírus (Milagres, Dias *et al.*, 2007). Esta característica única e específica da LPO, núcleo em colar (NC),

revelando uma condensação, fragmentação e marginação de agregados nodulares da cromatina celular, representa a multiplicação nuclear do EBV. A inclusão tipo Cowdry A (CA), inclusão eosinofílica circundada por halo claro intranuclear, resulta em homogeneização da superfície nuclear e marginação periférica da cromatina. No núcleo em vidro fosco (VF), inclusões eosinofílicas ou basofílicas conferem um padrão homogêneo da superfície nuclear e marginação periférica da cromatina (Tavares, 2008). Dias et al., 2001, verificando a constituição molecular dessas alterações nucleares, observaram que as alterações nucleares tipo CA e VF correspondem ao DNA do EBV, já os fragmentos esféricos e marginais, tão característicos do NC, correspondem à fragmentação da cromatina humana (Dias, Spyrides *et al.*, 2001).

### **2.3 Leucoplasia Pilosa Oral Subclínica**

A LPO subclínica foi descrita pela primeira em 1995 por Mabruk et al, no qual relataram que 2 de 15 línguas de pacientes soropositivos para o vírus HIV que sofreram autópsia foram positivos para o EBV, apesar da aparência clinicamente normal (Dias, Israel *et al.*, 2006).

Em 2000, Dias et al., investigaram, por meio de histopatologia, a presença das características nucleares indicativas de infecção pelo EBV em bordas laterais de línguas, clinicamente normais, recuperadas na necropsia de 8 pacientes que morreram de doenças relacionadas com a AIDS; e investigaram, por citopatologia, essas alterações em 50 pacientes HIV-positivos. Quatro das oito amostras, investigada histopatologicamente, apresentaram as três características nucleares: inclusão Cowdry A, vidro fosco e núcleo em colar. No grupo avaliado citopatologicamente, os autores observaram essas alterações em 24% dos pacientes, em ambos lados da língua.

Realizando um estudo retrospectivo com 6 casos de LPO na fase subclínica de seu estudo anterior, Dias et al. (2001) avaliaram quantitativamente as alterações nucleares distribuídas pelas diferentes camadas epiteliais. Eles observaram que as

inclusões tipo Cowdry A foram as mais frequentes e observadas nas camadas intermediária e superficial. Os núcleos em “vidro fosco” predominaram nas camadas superficial e intermediária e os núcleos “em colar” foram ocasionais e restritos aos esparsos focos de ceratinização e/ou na camada superficial. Em 2006, esses autores investigaram a prevalência de LPO em 120 pacientes pediátricos portadores do HIV, por meio de estudo citopatológico, com amostras obtidas das bordas laterais de língua, onde foi constatada LPO subclínica em 16,7% dos casos(Dias, Israel *et al.*, 2006).

Robaina et al., em 2008, com o objetivo de verificar o genótipo do EBV, avaliaram 53 raspados de borda lateral de língua de pacientes soropositivos para o HIV, onde detectaram, através de PCR, a presença do EBV em 28,3% das amostras.

Também em 2008, Tavares realizou um estudo onde avaliou 60 pacientes transplantados renais sob imunossupressão. Destes, quatro casos foram diagnosticados com LPO através de análise citopatológica, dos quais três casos foram de pacientes que haviam realizado o transplante com um período de até 120 dias (período imediato) e um caso de paciente com mais de 121 dias (período mediato) de transplante. Cinquenta e seis casos não apresentaram LPO (18 casos no período imediato e 38 no período mediato). Assim, foi observado evidência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de que a proporção de pacientes que apresentaram LPO no período imediato (14,3% de 21 casos) foi superior à dos pacientes que apresentaram LPO no período mediato (2,6% de 39 casos). Além disso, foi observado que apenas 18% destes pacientes apresentaram contagem leucocitária fora da faixa de normalidade. Neste estudo também foi feita análise em um grupo controle, composto de 10 pacientes saudáveis, onde não foi diagnosticada leucoplasia pilosa oral.

Reginald & Sivapathasundharam (2010), por meio de estudo citopatológico, avaliaram 50 pacientes HIV-positivos, sem lesão clínica visível, e detectaram alterações nucleares características da infecção pelo EBV em 30% da amostra. Eles observaram que a alteração mais frequente foi a do tipo vidro fosco, com presença em 22% dos casos, seguida pelo tipo núcleo em colar (4%) e o Cowdry A (2%).

## 2.4 Citologia Esfoliativa Oral

A ciência da citologia e citopatologia foi implementada e reconhecida entre os séculos XVIII e XIX. Entretanto, somente no final do século XX que a padronização e o progresso deste ramo da patologia foram completamente fundados, divididos em dois ramos distintos: biópsia aspirativa e esfoliativa (Al-Abadi, 2011).

A citologia esfoliativa, definida como o estudo e interpretação da natureza das células descamadas, natural ou artificialmente, da superfície epitelial de vários órgãos, é uma importante carga de trabalho dos departamentos de patologia diagnóstica (Diniz-Freitas, Garcia-Garcia *et al.*, 2004; Chandra, Cross *et al.*, 2009; Rivera e Nunez-De-Mendoza, 2013). É um método simples, não invasivo, relativamente indolor e bem aceito pelos pacientes, que consiste em observar microscopicamente a morfologia das células epiteliais superficiais após coleta, fixação e coloração (Chandra, Cross *et al.*, 2009). Esta técnica abriu vários meios para trabalhar na área de saúde com resultados favoráveis e foi reforçada com a implementação de alguns programas de tecnologia que permitiram a tabulação e análise das informações de forma fácil e rápida (Rivera e Nunez-De-Mendoza, 2013).

A citologia esfoliativa oral é o estudo das células que foram extraídas ou removidas a partir da mucosa bucal (Chandra, Cross *et al.*, 2009). As amostras orais são obtidas por uma espátula de madeira ou uma escova especial, denominada *cytobrush*, cujo objetivo é obter a maior quantidade possível de amostra celular (Rivera e Nunez-De-Mendoza, 2013).

Desde que Papanicolaou e Traut validaram a citologia para diagnóstico de neoplasias do colo de útero, ela tem sido utilizada na cavidade oral para o diagnóstico das doenças orais (Acha, Ruesga *et al.*, 2005). A literatura odontológica da década de 1960 e 1970 continha numerosos relatórios sobre a utilização da citologia oral como uma abordagem diagnóstica (Cancado, Yurgel *et al.*, 2004).

As células, que serão analisadas após serem espalhadas sobre uma lâmina de vidro, podem ser obtidas por diferentes sistemas físicos de raspado da superfície

da mucosa, sendo a melhor técnica para obtenção de material adequado aquela que o epitélio é separado mecanicamente da mucosa realizando-se um raspado (Acha, Ruesga *et al.*, 2005). Os esfregaços iniciais são geralmente marcadas por uma coloração rápida, tais como coloração Diff Quick. Esse tipo de coloração é feita em lâminas com material após secagem ao ar. O outro conjunto de lâminas é fixado em solução à base de etanol (de preferência etanol 95%) para outro tipo de coloração, a coloração de Papanicolaou (Al-Abbadi, 2011).

Originalmente, este método foi amplamente utilizado para o diagnóstico precoce de câncer oral (Braz-Silva, Magalhaes *et al.*, 2010). No entanto, o diagnóstico de muitas outras condições clínicas da cavidade oral pode ser realizado a partir da citologia esfoliativa de lesões na superfície da mucosa ou epitélio bucal, incluindo doenças infecciosas virais e fúngicas (Endo, Rees *et al.*, 2008; Perez-Sayansm, Somoza-Martin *et al.*, 2009; Braz-Silva, Magalhaes *et al.*, 2010). Além das aplicações mais comuns dos estudos citológicos orais, como a candidíase oral (Loss, Sandrin *et al.*, 2010), outros estudos tem sido realizados com esta técnica, como estudo da infecção pelo vírus Epstein-Barr em leucoplasia pilosa oral (Reginald e Sivapathasundharam, 2010) infecções pelo vírus do herpes simples, paracoccidiodomicose, entre outras (Barrett, Buckley *et al.*, 1986; Endo, Rees *et al.*, 2008; Talhari, De Souza *et al.*, 2008; Talhari, Chrusciak-Talhari *et al.*, 2009; Loss, Sandrin *et al.*, 2010; Muniz, Franco *et al.*, 2012; De Souza Vianna, Pirani Carneiro *et al.*, 2013).

Barrett *et al.* (1986) realizaram análise citológica em 20 pacientes em imunossupressão intensa, que realizaram transplantes de medula óssea ou que estavam recebendo intensa quimioterapia, a fim de confirmar suspeitas clínicas de infecção pelo vírus do herpes simples (HSV). Foram obtidas amostras celulares a partir da base das lesões orais, realizado esfregaços em lâmina de vidro, fixado em álcool 95%, corado com solução Papanicolaou e examinado microscopicamente. A partir desta análise, em 19 dos 20 pacientes foi confirmada a infecção pelo HSV, levando os autores a concluir que a citologia esfoliativa convencional aparenta ser o método mais simples e viável para confirmar uma suspeita de infecção na mucosa oral causada por HSV, tendo um grande valor, particularmente, em pacientes com imunossupressão intensa.

Mishra et al.(2005) realizaram um estudo multicêntrico, com duração de 2 anos, onde avaliaram 2920 pacientes com leucoplasia oral idiopática através de citologia esfoliativa para verificar seu potencial diagnóstico e detectar a malignidade das leucoplasias orais. Ao final do estudo, eles observaram que leucoplasia persistente tem potencial de transformação maligna e que a citologia esfoliativa pode ser um método simples para detecção precoce de alterações displásicas ou malignas.

Talhari et al.(2008), descreveram um caso de um paciente de 47 anos de idade da região amazônica (Brasil) com um histórico de lesão oral com dor intensa durante 3 meses. Também foi relatado dificuldade de alimentação e perda de peso. Ao exame físico, ambos os lábios apresentaram-se edematosos. Em lábio inferior houve comprometimento grave com ulceração e pontos hemorrágicos semelhante à amora. Exames de rotina de sangue e urina mostraram resultados normais. Teste sorológico para HIV e sífilis foram negativos. Foi realizada a citologia esfoliativa, sem qualquer coloração especial, sendo assim diagnosticado como paracoccidiodomicose. Assim, os autores destacaram que a citologia esfoliativa é um método simples, de baixo custo, indolor, não invasivo e rápido para o diagnóstico da paracoccidiodomicose.

Jajarm et al.(2008) decidiram avaliar, de forma quantitativa e qualitativa, as alterações celulares do epitélio oral de pacientes portadores de diabetes tipo II utilizando o método da citologia esfoliativa. Em 30 pacientes com diabetes tipo II e 30 indivíduos controle, foram obtidos esfregaços de dois distintos sítios orais: a mucosa bucal e o dorso da língua. Os esfregaços foram corados pelo método de Papanicolaou. As lâminas obtidas foram submetidas à análise quantitativa e qualitativa, onde, em cada lâmina, 50 células foram avaliadas microscopicamente e fotografias foram submetidas à análise morfométrica computadorizada. Foi observado que as áreas citoplasmáticas e nucleares no grupo diabetes foram significativamente maiores quando comparadas ao grupo controle; a razão núcleo/citoplasma foi menor no grupo controle e, em ambos os sítios, a proporção de células com alterações nucleares foi maior no grupo diabetes. Dessa forma, eles concluíram que a diabetes mellitus podem causar alterações no epitélio oral que são detectáveis com o método da citologia esfoliativa e que este pode ser um método

viável para avaliação desta doença. Alguns anos depois, Rivera & Núñez-de-Mendoza (2013), realizaram um estudo semelhante, cujos resultados se aproximaram aos da pesquisa de Jarjam et al.

Um estudo realizado por Loss et al. (2010) teve como objetivo visualizar as células epiteliais orais da mucosa oral infectada por *Candida*. Neste estudo, foi realizada citologia esfoliativa em mucosa, aparentemente normal, em 60 indivíduos (30 infectados com *Candida* e 30 saudáveis) para análise celular morfológica e citomorfométrica. Os resultados demonstraram que, morfológicamente, as células epiteliais infectadas apresentaram aumento nuclear, anéis perinucleares e vacúolos citoplasmáticos. A análise citomorfométrica demonstrou que houve diminuição da área do citoplasma em pacientes infectados e que houve aumento na área nuclear, revelando que a mucosa bucal de pacientes infectados por *Candida* exibem alterações significativas no tamanho e forma das células epiteliais bucais.

Alguns pesquisadores também lançam mão da citologia esfoliativa oral para analisar e monitorar a evolução de algumas situações clínicas e doenças sistêmicas, como é o caso de Keles et al.(2011) que realizaram um estudo para investigar alterações citológicas quantitativas em esfregaços da mucosa oral de pacientes transplantados renais. Esfregaços foram obtidos através de citologia esfoliativa da mucosa bucal clinicamente saudável e assoalho bucal de pacientes transplantados e voluntários saudáveis e corados pelo método de Papanicolaou. Após análise, os resultados sugeriram alterações em células epiteliais bucais, detectável por microscopia e citomorfometria em pacientes transplantados renais.

Muniz et al.(2012) descreveram um caso de um paciente de 47 anos de idade que compareceu a um serviço odontológico de emergência relatando dor intensa na boca, com evolução de 2 meses e tratamento empírico com amoxicilina sem resolução. Foi relatada perda de peso, cansaço, febre branda e tosse seca, porém negado lesões em outras partes do corpo. Ao exame físico oral, observaram úlcera granulomatosa, de aproximadamente 2,5 cm, em comissura labial esquerda, pápulas esbranquiçadas em rebordo alveolar superior e palato eritematoso. Foi realizada a citologia esfoliativa das regiões e corado com solução Papanicolaou, onde observou-se células epiteliais e inflamatórias com aspecto regular. A natureza infecciosa da lesão foi confirmada pelo *periodic acid-Schiff* (PAS) e Grocott que revelaram células

fúngicas com características de brotamento, bem como cadeias celulares semelhantes à pseudohifas, interpretado como *Histoplasma capsulatum var capsulatum*. As lesões do palato e rebordo alveolar também mostraram muitos filamentos de hifas compatíveis com *Candida sp.*

Em 2012, Sumanthi et al., realizaram um estudo com pacientes portadores de anemia ferropriva com objetivo de verificar quantitativamente as alterações de diâmetro nuclear, diâmetro citoplasmático e razão núcleo/citoplasma através de citologia esfoliativa oral, comparando com indivíduos saudáveis. Os grupos do estudo consistiram em 40 indivíduos saudáveis e 40 portadores de anemia ferropriva, confirmados através de investigação hematológica e nível sérico de ferro. Foram obtidos esfregaços e corados com solução Papanicolaou. Como resultados eles observaram um aumento significativo no diâmetro nuclear e na razão núcleo citoplasma no grupo com anemia quando comparado ao grupo controle. Quanto ao diâmetro citoplasmático, não foi observado diferença estatística. Contudo, eles concluíram que a técnica de citologia esfoliativa oral pode possivelmente ser uma ferramenta diagnóstica alternativa não invasiva para a anemia ferropriva.

De Souza Vianna, et al.(2013) descreveram 4 casos de paracoccidioidomicose com envolvimento intraoral simulando carcinoma de células escamosas, onde esfregaços citológicos, corados com método de Papanicolaou mostraram processos inflamatórios granulomatosos, com estruturas de tamanho variável refratáveis, com paredes duplas e espessas, contornos semelhantes a vacúolos inflamatórios localizados em citoplasma da célula. Os aspectos positivos PAS e coloração de Gomori-Grocott confirmaram esses vacúolos eram esporos ou blastósporos fúngicas.

## **2.5 Leucoplasia Pilosa Oral em pacientes soronegativos para o HIV**

Felix et al.(1992), relataram um caso de um homem saudável, de 79 anos de idade, que apresentou manchas brancas bilaterais nas superfícies laterais e ventral da língua. A aparência era consistente com LPO, e por conta do possível significado

de tal diagnóstico, foi realizado biópsia incisional para exame histológico. O exame mostrou epitélio acantótico com superfície irregular e descamação hiperparaqueratinizada. Foram identificados um grande número de células vacuolizadas com halos perinucleares e núcleos picnóticos na camada espinhosa. Estas características foram consistentes para um diagnóstico de LPO, a qual foi confirmada por demonstração da presença do EBV no interior da lesão pela técnica de hibridização *in situ*. Revisão da história médica não revelou aumento de suscetibilidade a infecções de longa data ou imunodeficiência celular, e não havia histórico de terapia imunossupressora. Testes sorológicos para HIV foram realizados e deram negativos.

Epstein et al.(1993) avaliaram histologicamente 10 pacientes submetidos a transplante de medula óssea que apresentaram lesões clínicas sugestiva de LPO. Os exames foram realizados em um período de 90 a 100 dias após o transplante. Nesse estudo também foi realizado hibridização *in situ*, para confirmação do EBV, e a contagem leucocitária para avaliação imunológica. A hibridização *in situ* para confirmou a presença do EBV em 2 casos. A contagem leucocitária esteve fora da faixa de normalidade em 3 casos, porém não foi possível uma associação entre esses achados. Entretanto eles sugeriram que a imunossupressão severa pode resultar no desenvolvimento da LPO.

Em 1994, Lozada-Nur et al. relataram quatro casos de pacientes soronegativos para o HIV que foram diagnosticados com LPO. Nos quatro casos foram observadas lesões brancas em bordo lateral de língua, assintomática e não removível. Em dois casos havia histórico de uso prolongado de corticoide tópico, 3 e 5 anos, devido à presença de lesões penfigoides na cavidade oral. Nos outros casos não houve histórico de imunossupressão medicamentosa. Em todos os casos, a presença do EBV foi confirmada através de biópsia e hibridização *in situ* e os testes para anticorpos anti-HIV foram negativos.

Schiodt et al.(1995) relataram um caso de uma mulher, 47 anos, que foi encaminhada para avaliação por apresentar lesões brancas da mucosa oral. Ela tinha síndrome de Behçet desde 1977 com úlceras orais, genitais e anais recorrentes, bem como lesões na pele. Estas manifestações foram satisfatoriamente controladas por terapia imunossupressora e antibióticos intermitentes. No momento

da admissão, ela estava recebendo prednisona 20 mg por dia e fucidine 500 mg três vezes ao dia. O exame oral revelou afta única na língua, placas brancas removíveis na mucosa bucal bilateralmente, e placas brancas onduladas não removíveis nas margens e superfície inferior da língua, bilateralmente. As lesões da mucosa bucal foram diagnosticadas como candidíase oral pseudomembranosa, devido à presença de hifas em esfregaço citológico. Através do método de hibridização *in situ* para o EBV, foi evidenciada a presença deste vírus nos núcleos das células da camada espinhosa. Exame sorológico para anticorpos anti-HIV foi realizado e repetido com intervalos de 3 meses e deram negativos. Assim, os autores concluíram que a paciente tinha leucoplasia pilosa oral na língua e candidíase pseudomembranosa oral na mucosa bucal.

Em um estudo realizado por Milagres et al.(2007), foi investigado a prevalência de LPO e presença de DNA-EBV nas bordas laterais de língua a partir de 90 mulheres grávidas, 90 pacientes com diabetes mellitus (DM), 30 indivíduos saudáveis (grupo negativo) e 30 pacientes HIV + com LPO (grupo positivo). Foram realizados esfregaços e analisados por citopatologia e reação em cadeia polimerase (PCR). Eles observaram um caso de LPO subclínica e candidíase em um paciente com DM pela análise citopatológica. Os resultados da PCR demonstraram o DNA do EBV em 65% das gestantes, em 35% dos pacientes com DM, e em 20% dos indivíduos saudáveis. Assim, os autores concluíram que pacientes com DM podem desenvolver LPO com baixa prevalência. Além disso, a prevalência do EBV na borda lateral da língua é maior em mulheres grávidas do que em indivíduos saudáveis.

Piperi et al.(2010), relataram dez casos de leucoplasia pilosa oral em pacientes HIV-negativos. Oito dos 10 pacientes estavam em tratamento com corticoides para doença pulmonar obstrutiva crônica, um paciente estava em uso de prednisona como parte de um regime terapêutico para tumor gastrointestinal, e um paciente não tinha nenhum histórico de imunossupressão. Havia 5 homens e 5 mulheres, com idades entre 32-79 anos, sendo a média de 61,8 anos. Em nove pacientes, as lesões foram localizadas unilateralmente sobre a língua, enquanto uma lesão estava localizada na junção do palato duro e mole. Todas as lesões foram descritas como placas brancas onduladas, não removíveis e indolores. As características histológicas foram condizentes com as alterações associadas ao

vírus Epstein-Barr, o qual foi confirmado através de hibridização *in situ* em todos os casos. O histórico médico de 9 dos 10 pacientes foi significativo para o uso de corticosteroides, sendo o uso de corticoides realizado por inalação (7 casos), prednisona sistêmica (1 caso), ou ambos (1 caso). Oito dos pacientes estavam em tratamento com corticoides por causa de doença pulmonar obstrutiva crônica, e um paciente foi tratado para a metástase pulmonar por causa de tumor gastrointestinal. A duração do tratamento com corticoides não era conhecido. Um paciente era uma mulher aparentemente saudável, sem causa aparente de imunossupressão sistêmica ou local. Assim eles concluíram que a LPO não acomete somente pacientes HIV-positivos e pacientes HIV-negativos que sofreram transplante de órgãos, mas também pacientes que receberam o tratamento com corticoides e que certas características clínicas e histológicas deve levantar a suspeita de tal diagnóstico, mesmo sem conhecimento prévio de imunossupressão.

## **2.6 Imunossupressão**

Imunossupressão é o ato de reduzir deliberadamente a atividade ou eficiência do sistema imunológico. A imunossupressão é realizada, usualmente, para coibir a rejeição em transplantes de órgãos ou para o tratamento de doenças (Bressan, Silva *et al.*, 2010; Rezende, 2011). Para fazê-la, recorre-se normalmente a medicamentos, mas também podem ser utilizados outros métodos, como plasmaferese ou radiação. Com o sistema imunológico praticamente desativado, o indivíduo imunossuprimido fica vulnerável a infecções oportunistas (Rezende, 2011).

No âmbito da Reumatologia, diversas doenças, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reativa, artrite psoriática, espondilite anquilosante, entre outras, requerem, com frequência, para o tratamento, o uso de imunossupressores. Assim, drogas como corticoides, metotrexato, ciclofosfamida, azatioprina, leflunomida, ciclosporina, micofenolato de mofetil são frequentemente prescritas aos pacientes portadores de doenças reumáticas. Mais recentemente, foram incluídos os chamados agentes modificadores de resposta biológica, tais como os anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF), infliximabe, etarnecept e

adalimumabe, drogas anti-linfócito B, rituximabe e ocrelizumabe, anti-moléculas de co-estimulação, abatacepte, além de anti-interleucina 6 (anti-IL6), tocilizumabe, para tratamento de afecções diversas, sobretudo artrite reumatoide grave (Mota, Oliveira *et al.*, 2009).

Os biológicos são drogas à base de proteínas derivadas de organismos vivos projetadas para inibir ou aumentar um componente específico do sistema imunológico (Taylor, 2001). As ações dos agentes inibidores de TNF podem ser dividida em duas categorias: 1. antagonistas, que atuam bloqueando as funções celulares mediadas por receptores TNF (TNFRs). Estas funções incluem a ativação e proliferação celular, produção de citocinas, quimiocinas, bem como, as consequências dessas funções. Assim, ocorre a inibição do recrutamento celular, da inflamação imune, da angiogênese, da regulação e da degradação da matriz extracelular; 2. agonistas, que atuam revertendo a sinalização sobre a proteína transmembrana TNF (tmTNF). Estes efeitos incluem apoptose, supressão de citocinas e citotoxicidade de células transportadora de tmTNF através de mecanismos que incluem anticorpos e citotoxicidade dependente de complemento (Caminero, Comabella *et al.*, 2011). Uma série de agentes biológicos direcionados para TNF- $\alpha$  foram introduzidos desde 1988 (Caminero, Comabella *et al.*, 2011). Os principais inibidores de TNF disponíveis são etanercept, adalimumabe e infliximabe (Chen, Jobanputra *et al.*, 2006).

O uso de drogas imunossupressoras tem sido implicado no desenvolvimento de infecções oportunistas e esta preocupação também deve incluir os agentes anti-TNF (Mangini e Melo, 2003). Inibidores de TNF podem causar uma variedade de efeitos adversos (Chen, Jobanputra *et al.*, 2006). Observa-se, como efeito adverso nos pacientes tratados com anti-TNFs, que há um maior risco de infecções, quando se considera que o TNF atua, como parte integrante, no papel central da resposta do hospedeiro à infecção inicial. Muitos tipos diferentes de infecções têm sido relatados, incluindo tuberculose, infecções bacterianas graves, infecções micobacterianas atípicas, pneumonia, entre outras. É difícil atribuir essas infecções plenamente às terapias com anti-TNF. Entretanto, devido ao importante papel que o TNF desempenha na imunidade contra patógenos invasores, é biologicamente plausível que a inibição do TNF iria provocar um aumento na incidência de infecção (Connor,

2011). É descrito que o risco de infecções graves seja maior nos primeiros 6 a 12 meses de terapia (Thompson, Rieder *et al.*, 2011).

A cavidade oral é um sítio anatômico comum de infecções bacterianas, onde os sintomas iniciais de imunodeficiência podem ser observados. Essas lesões orais são muitas vezes inespecíficas e podem ser localizadas ou parte de uma doença disseminada. Infecções orais em pacientes imunocomprometidos tendem a ser recorrentes e progressivas e, às vezes, são resistentes ao tratamento local e sistêmico (Meyer, Kleinheinz *et al.*, 2000).

Até o presente momento, não foram observados na literatura estudos que tenham verificado a prevalência de leucoplasia pilosa oral subclínica em pacientes portadores de doenças autoimunes sob terapia imunossupressora através de citologia esfoliativa.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar a leucoplasia pilosa oral como um possível marcador de comprometimento imune, através de um estudo citopatológico em pacientes submetidos à terapia imunossupressora. Para isso foi realizado um estudo descritivo, de corte transversal, com abordagem prospectiva de uma série de casos de pacientes regularmente atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, para pesquisa de leucoplasia pilosa oral subclínica e clínica.

## **4 METODOLOGIA**

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética, sob o número 07435212.6.0000.0058, e os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), podendo desistir de participar em qualquer etapa da pesquisa.

### **4.1 Desenho do estudo**

A presente pesquisa trata-se de um estudo descritivo, de corte transversal, com abordagem prospectiva de uma série de casos de pacientes regularmente atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, para pesquisa de leucoplasia pilosa oral subclínica.

### **4.2 Casuística**

A amostra deste estudo foi composta de 40 pacientes portadores de doenças autoimunes, sob tratamento imunossupressor, recrutada a partir de demanda espontânea de uma população de pacientes regularmente atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Para inclusão no estudo, todos os indivíduos tinham que estar sob regime de terapia imunossupressora, independente do tipo e período dessa terapia, e apresentarem sorologia negativa para o HIV.

Foram excluídos do estudo apenas os indivíduos que estavam iniciando a terapia imunossupressora no dia da avaliação.

### **4.3 Anamnese e exame físico**

Os pacientes eram abordados durante consulta médica de rotina no ambulatório da reumatologia ou durante o período de infusão medicamentosa no setor de pulsoterapia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS), convidados a participar da pesquisa e, depois da devida explicação da mesma, assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram realizados anamnese e exame físico intraoral e, posteriormente, consultado prontuário médico a fim de colher dados referentes ao diagnóstico da doença de base, tempo de diagnóstico, tipo e tempo de terapia imunossupressora e contagem leucocitária. A contagem leucocitária considerada para este estudo foi aquela realizada num intervalo de tempo de até 2 meses, para mais ou para menos, da data de avaliação do paciente

### **4.4 Coleta e processamento do material**

#### **4.4.1 Bordas laterais da língua**

Logo após a anamnese e exame físico intraoral, foram realizadas duas raspagens de borda lateral da língua, uma para cada lado, utilizando uma escova endocervical ginecológica (Absorve®) para cada borda, com luvas de procedimento individual. Em seguida, foram realizados dois esfregaços em lâminas de vidro convencionais, as quais foram acondicionadas em frascos plásticos próprios, contendo álcool 96° (Santa Cruz®) para fixação e, por fim, enviadas ao laboratório de patologia do HU-UFS para serem coradas pela técnica de Papanicolaou.

#### **4.4.2 Citopatologia**

Os esfregaços corados por Papanicolaou foram avaliados em microscópio óptico (Nikon E600®) a um aumento de 400x, quanto à celularidade e alterações nucleares representativas do efeito citopático do EBV, que representam o critério de diagnóstico citopatológico da leucoplasia pilosa oral.

#### **4.5 Análise estatística**

O tratamento descritivo dos dados foi feito através da distribuição de frequências (absoluta e relativa), medidas de tendência central (média), de dispersão (desvio padrão), sendo realizada a construção de tabelas e gráficos para a sua apresentação. Foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson para avaliar a diferença entre proporções, com nível de significância de 5%, e o teste odds ratio para verificar a razão de chance da ocorrência de leucoplasia pilosa oral quanto ao tipo de imunossupressor, classificados como biológicos e não biológicos. Quanto ao tempo de terapia imunossupressora, os pacientes foram agrupados em escalas de 0 a 60 meses, de 61 a 120 meses e maior que 120 meses. O software utilizado para os testes foi o MedCalc®.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características gerais da amostra**

#### **5.1.1 Dados demográficos**

Foram avaliados 40 pacientes em tratamento com imunossupressores. A maioria dos pacientes examinados pertencia ao gênero feminino (70%) e a média geral de idade encontrada foi de  $40,5 \pm 16,1$  anos (Tabela 1).

#### **5.1.2 Perfil clínico e imunológico**

Quanto ao diagnóstico de base, foi observada a ocorrência de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, espondilite anquilosante, artrite reumatoide juvenil e psoríase (Figura 1). O tempo médio de diagnóstico, em meses, foi de  $127,4 \pm 82$ . Quanto à terapia imunossupressora, foi observada maior prevalência de tratamento com imunossupressores biológicos anti-TNFs (52,5%), com tempo de tratamento médio de  $69,1 \pm 67,4$  meses (Figura 2). Foi observado que esta foi normal (4.000 a 10.000 céls./mm<sup>3</sup>) em 65% dos pacientes. A Figura 3 ilustra a distribuição de frequência da contagem leucocitária geral. Não foram encontradas lesões orais, incluindo a leucoplasia pilosa oral clínica.

Tabela 1- Distribuição dos pacientes com terapia imunossupressora e teste qui-quadrado

	N	%	Valor de p
MASCULINO	12	30%	<0.001*
FEMININO	28	70%	

\*p<0,05 diferença estatística significante.

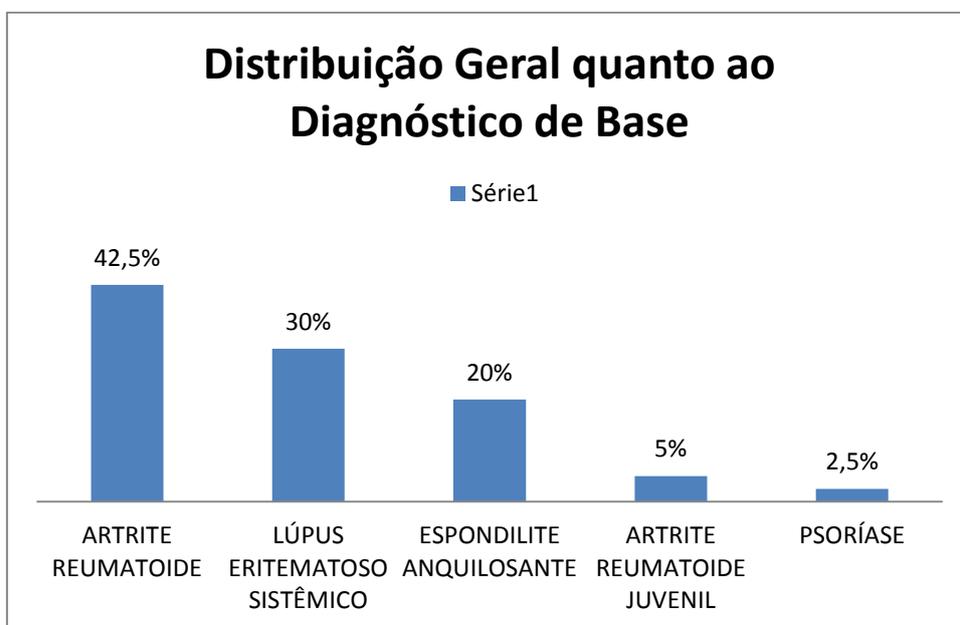


Figura 1 – Gráfico de distribuição geral quanto ao diagnóstico de base.

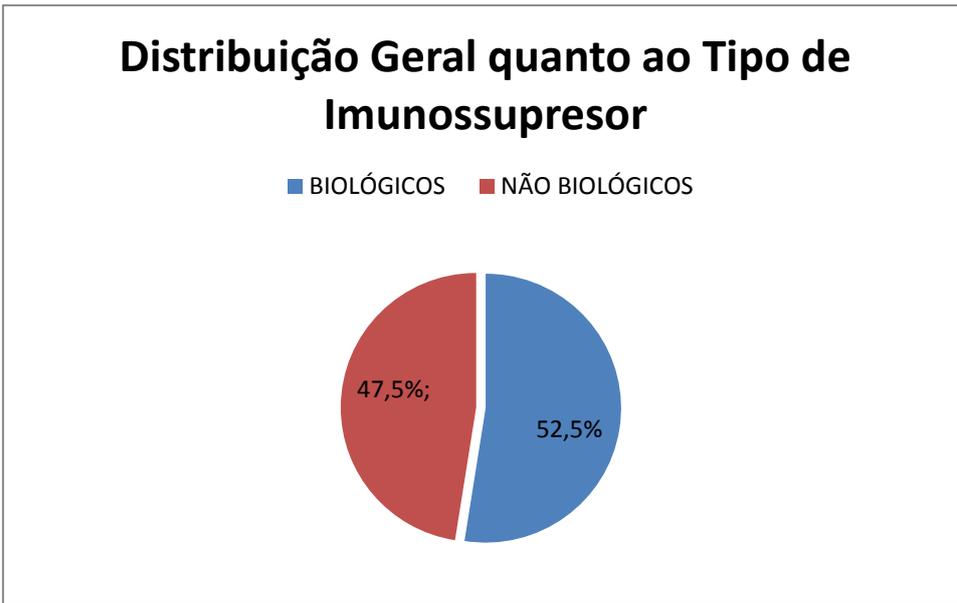


Figura 2 – Gráfico de distribuição geral quanto ao tipo de imunossupresor.

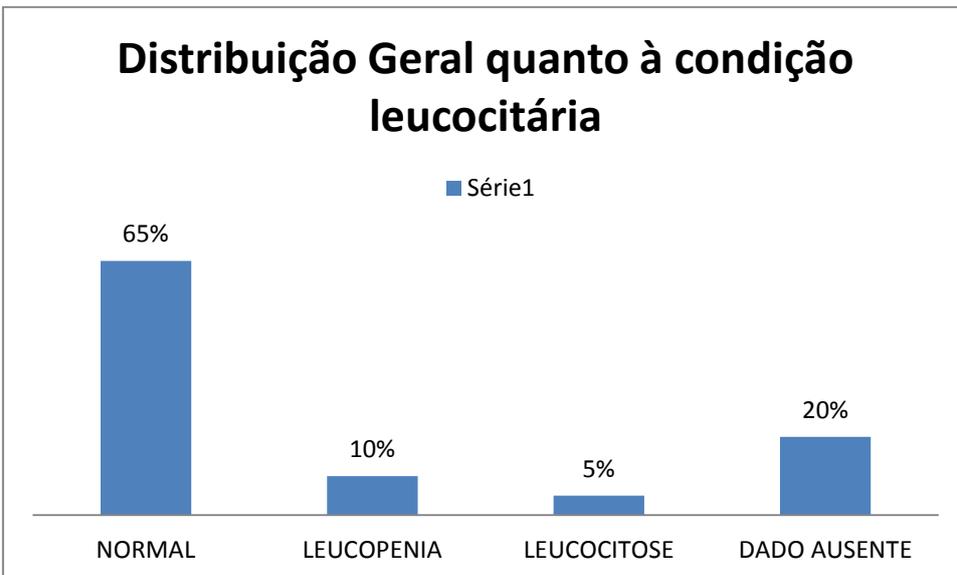


Figura 3 – Gráfico de distribuição geral quanto à condição leucocitária.

## 5.2 Análise citopatológica

A análise citopatológica foi realizada sobre 80 lâminas (uma de cada borda lateral da língua) dos 40 pacientes. As lâminas mostraram aparência semelhante, apresentando celularidade suficiente para a análise.

A leucoplasia pilosa oral subclínica foi diagnosticada em 21 (52,5%) dos casos (Figura 4). As alterações nucleares foram encontradas em ambos os lados da língua sendo a inclusão tipo Cowdry A mais frequente (Figura 5 e 6).

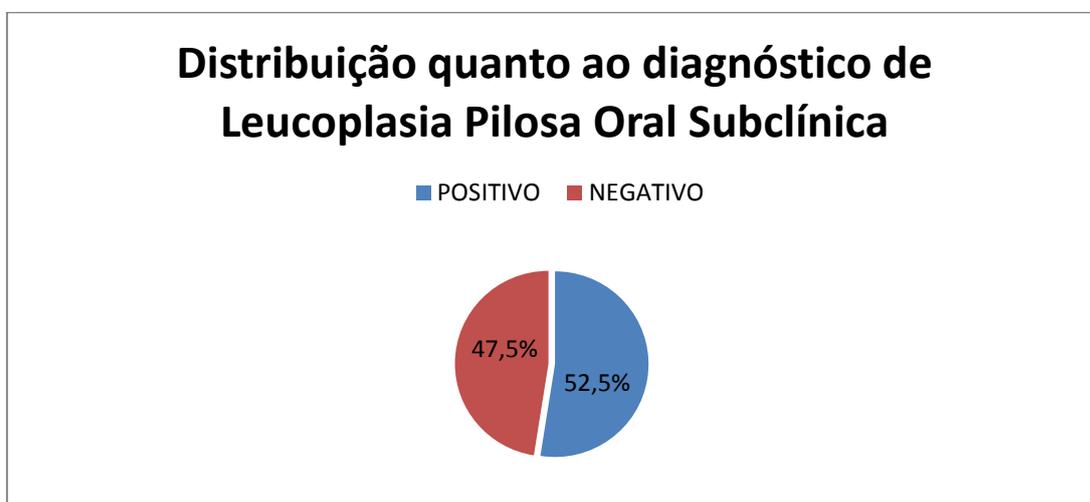


Figura 4 – Gráfico de distribuição quanto ao diagnóstico de leucoplasia pilosa oral subclínica.

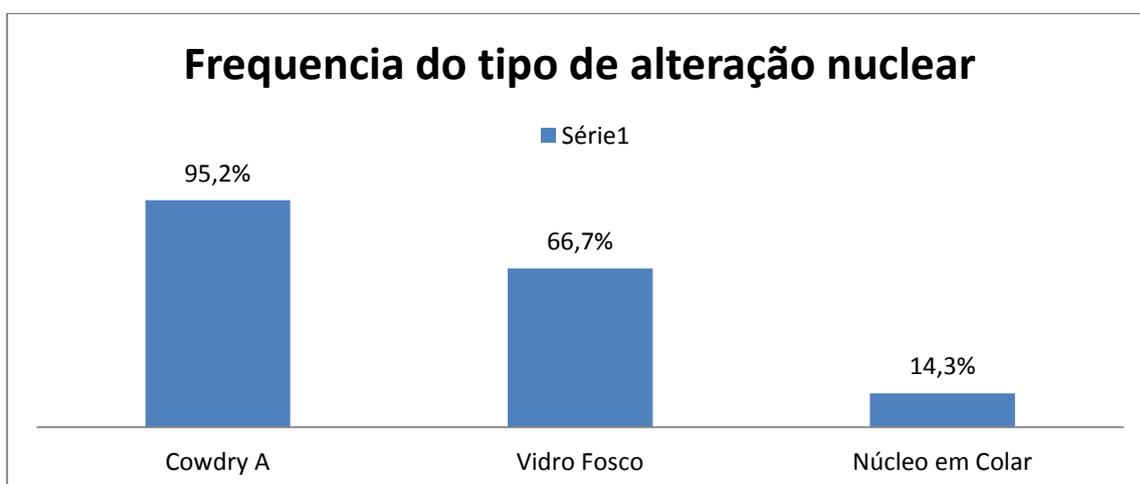


Figura 5 – Gráfico de distribuição quanto ao tipo de alteração nuclear.

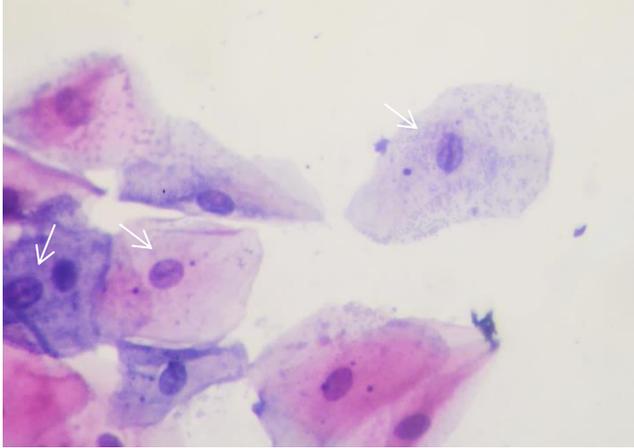


Figura 6A – Inclusão tipo Cowdry A, coloração Papanicolaou (400x)

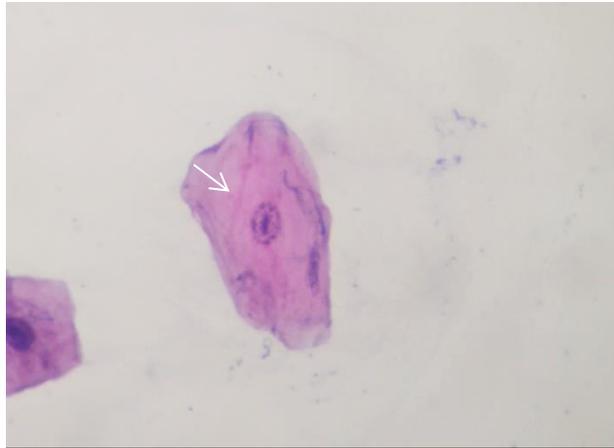


Figura 6B – Inclusão tipo Cowdry A, coloração Papanicolaou (400x)

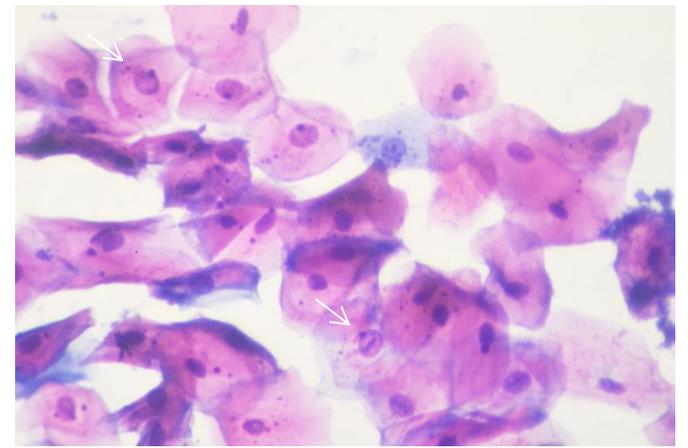


Figura 6C – Inclusão tipo vidro fosco e Cowdry A , coloração Papanicolaou (400x)

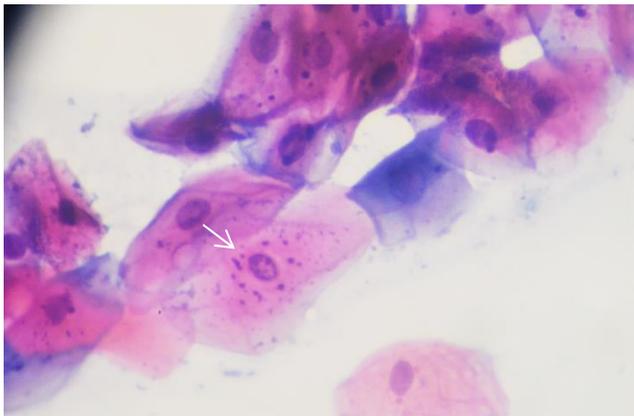


Figura 6D – Inclusão tipo vidro fosco, coloração Papanicolaou (400x)

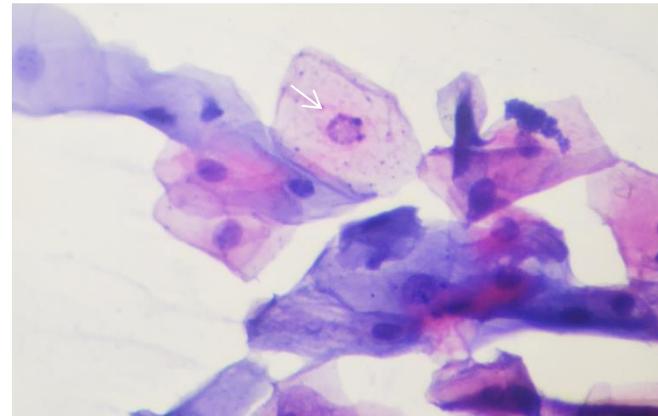


Figura 6E – Inclusão tipo núcleo em colar, coloração Papanicolaou (400x)

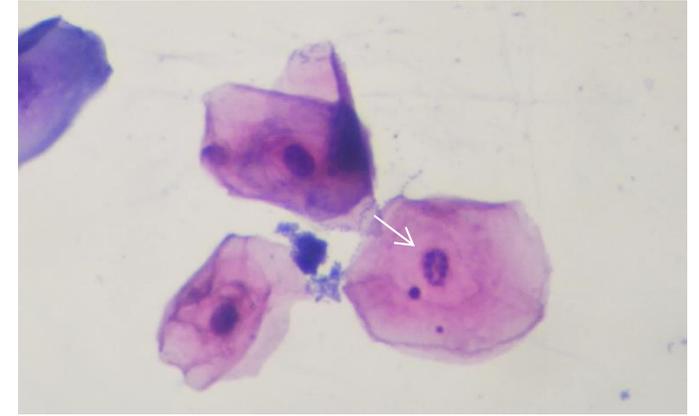


Figura 6F – Inclusão tipo núcleo em colar, coloração Papanicolaou (400x)

### 5.3 Características dos pacientes portadores de leucoplasia pilosa oral subclínica

#### 5.3.1 Dados demográficos

Dos 21 pacientes diagnosticados com LPO subclínica, a maioria destes pertencia ao gênero feminino (76,2%) e a média geral de idade foi de  $43,6 \pm 15,5$  anos. Entre os pacientes do mesmo gênero, esta patologia esteve presente em 57,1% do feminino e em 41,7% do masculino (Tabela 2).

#### 5.3.2 Perfil clínico e imunológico

Foi observada maior ocorrência de pacientes portadores de artrite reumatoide, seguida de lúpus eritematoso sistêmico e espondilite anquilosante, com tempo médio de diagnóstico de  $132,8 \pm 69,2$  meses (Figura 7). Quanto aos imunossupressores em uso, houve maior prevalência de uso de imunossupressores não biológico (52,4%) (Figura 8). No referente ao tempo de terapia, a média em meses para os imunossupressores não biológicos ( $136,4 \pm 72,4$ ) foi maior que os imunossupressores biológicos ( $36,9 \pm 36,2$ ). A contagem leucocitária foi normal em 81% dos pacientes (Figura 9). Em pacientes que não desenvolveram a LPO subclínica, a contagem leucocitária foi normal na maioria dos pacientes (47,4%), seguido de leucopenia (15,8%) e leucocitose (5,3%). Em 31,6% dos casos, este dado foi ausente.

Tabela 2- Distribuição dos portadores da LPO subclínica e teste qui-quadrado.

Gênero	Sim	Não	Valor de p
Masculino	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0,414
Feminino	16 (57,1%)	12 (42,9%)	0,414

\* $p < 0,05$  diferença estatística significante.

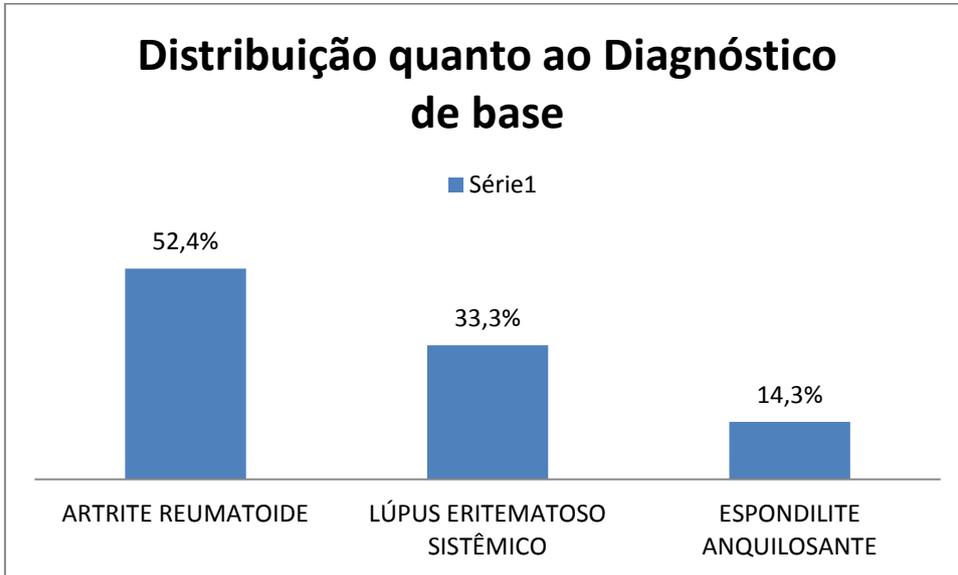


Figura 7 – Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica quanto ao diagnóstico de base.

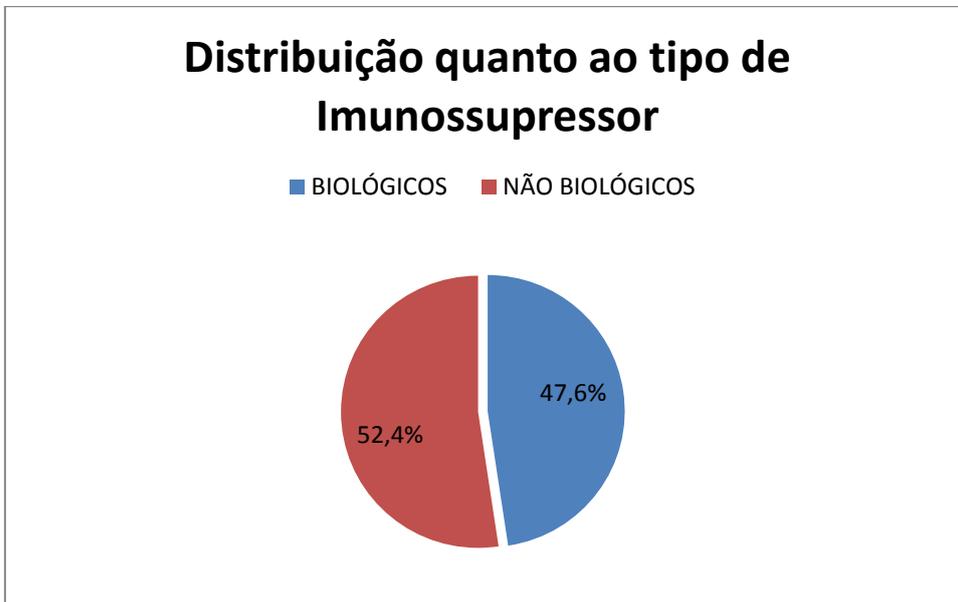


Figura 8 – Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica quanto ao tipo de imunossupressor.

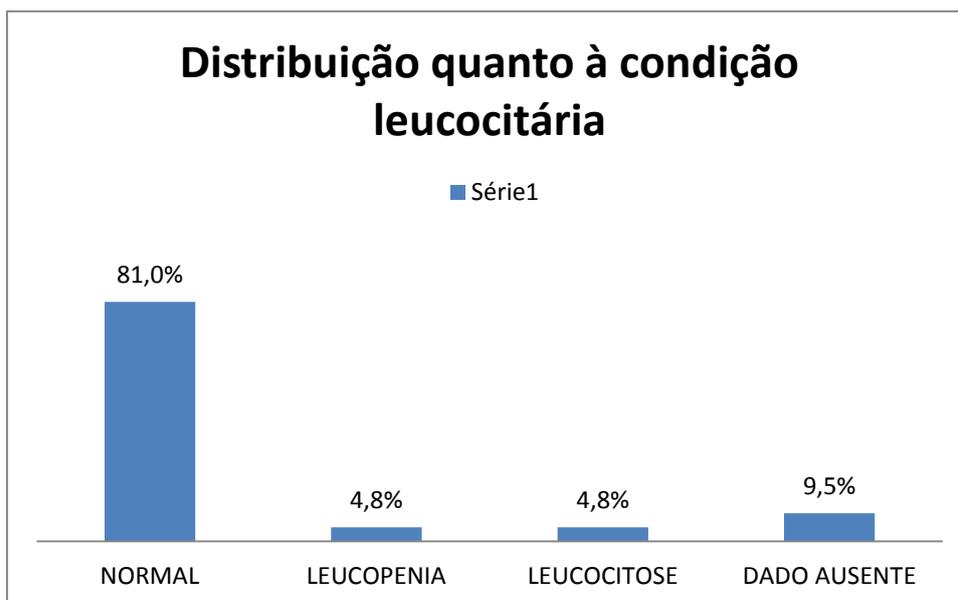


Figura 9 – Gráfico de distribuição de pacientes portadores de LPO subclínica quanto à condição leucocitária.

### 5.5 Relação da leucoplasia pilosa oral subclínica com tipo de imunossupressor e tempo de terapia

Os pacientes foram agrupados quanto à presença ou não de leucoplasia pilosa oral e distribuídos quanto tipo de imunossupressor (Tabela 3) e quanto ao tempo de terapia (Tabela 4) para se avaliar a relação entre estes dados. A tabela 3 evidencia a razão de chance encontrada para o acometimento pela LPO subclínica em relação ao tipo de imunossupressor utilizado, biológicos ou não biológicos. A tabela 4 exhibe a distribuição dos pacientes de acordo com escalas de tempo de terapia imunossupressora em meses, onde é possível observar que no período de 61 à 120 meses de terapia, a diferença entre os pacientes diagnosticados com LPO subclínica e os não diagnosticados foi estatisticamente significativa.

Tabela 3 – Tipo de imunossupressor e LPO

IMUNOSSUPRESSOR	Leucoplasia Pilosa Oral Subclínica		Odds ratio	95 % CI
	SIM	NÃO		
BIOLÓGICOS	10	11	0,6612	0,1894 to 2,3080
NÃO BIOLÓGICOS	11	8		

Tabela 4 – Tabela do Tempo de terapia X LPO

TEMPO DE TERAPIA (MESES)	Leucoplasia Pilosa Oral Subclínica		Chi-square
	SIM	NÃO	Valor de p
0 - 60	10	15	0,157
61 - 120	6	2	*0,046
> 120	5	2	0,109

\*p<0,05 diferença estatística significante.

## 6 DISCUSSÃO

A LPO foi inicialmente descrita em pacientes portadores de HIV e pensada ser patognomônica para este tipo de infecção (Greenspan, Greenspan *et al.*, 1984), podendo servir como indicador da progressão para a AIDS (Epstein, Fatahzadeh *et al.*, 1995; Komatsu, Rivero *et al.*, 2005). Contudo foi observado que esta lesão acomete pacientes não portadores do HIV sob regime terapêutico imunossupressor, estando assim a LPO relacionada com a imunossupressão em geral (Slots, Saygun *et al.*, 2006; Gonzalez, Correnti *et al.*, 2010).

De acordo com o nosso conhecimento, não há estudos na literatura que tenham utilizado a prevalência de LPO subclínica como marcador de comprometimento imune em pacientes portadores de doenças reumatológicas sob terapia imunossupressora, sendo este um estudo de caráter inédito.

Mais da metade da amostra deste estudo (52,5%) foi diagnosticada com LPO subclínica. Na literatura, no que se refere à LPO em pacientes sob terapia imunossupressora, observa-se principalmente relatos de casos isolados onde não fica claro o período exato de uso de imunossupressores. Em alguns relatos os pacientes desenvolveram LPO após um período de 3 a 5 anos de uso de imunossupressor (Lozada-Nur, Robinson *et al.*, 1994; Schiodt, Norgaard *et al.*, 1995; Piperi, Omlie *et al.*, 2010). Estudos que avaliaram a presença de LPO em pacientes transplantados de medula óssea (Epstein, Sherlock *et al.*, 1993) e transplantados renais (Tavares, 2008) sob imunossupressão, obtiveram a prevalência de 20% e 7%, respectivamente. Contudo, nestes estudos, os pacientes apresentaram um tempo de terapia imunossupressora de 90 a 100 dias, para os transplantados de medula óssea, e tempo médio de  $7,4 \pm 6,6$  meses para os transplantados renais. No presente estudo, foi possível observar que a maioria dos pacientes diagnosticados com LPO subclínica encontravam-se com um período de terapia imunossupressora maior que 60 meses (52,4%), sendo que no período de 61 à 120 meses houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com LPO subclínica (75%) e os que não foram acometidos por esta lesão (25%). Essa diferença entre período de terapia

imunossupressora do presente estudo em comparação aos estudos da literatura talvez justifique a grande discrepância da prevalência de LPO encontrada.

Em relação ao gênero, não foi observada evidência estatisticamente significativa na proporção de casos de LPO no gênero feminino (57,1%), nem no gênero masculino (41,7%), semelhante ao observado no estudo de Tavares (2008).

No referente ao tipo de imunossupressor, biológicos e não biológicos, não se observou maior chance de risco para desenvolvimento da lesão. Devido a inibição do TNF pelos agentes biológicos, o risco de infecções oportunistas com este tipo de imunossupressor poderia ser maior, uma vez que o TNF desempenha imunidade contra os patógenos invasores (Connor, 2011). Contudo, não foi possível observar esta diferença.

Quanto a contagem leucocitária, foi observado que apenas 9,6% dos pacientes diagnosticados com LPO apresentaram níveis fora da faixa de normalidade, não havendo relação com a presença da lesão, assim como o observado na literatura (Tavares, 2008). Destes pacientes, o que apresentou leucopenia era do gênero feminino, portadora de artrite reumatoide há 240 meses e em uso de agente biológico (etanercept) há 12. No outro caso era um paciente do gênero masculino, portador de artrite reumatoide há 132 meses e em uso de agente biológico (infiximabe) há 24, que apresentou leucocitose. Apesar de nos dois casos ter sido diagnosticado a LPO subclínica e haver uso de uma mesma classe de imunossupressor, encontrou-se tipos diferentes de alteração quanto à contagem leucocitária, sendo que no segundo caso, onde o tempo de terapia foi maior, houve leucocitose. Isso leva a pensar que a contagem leucocitária total não serve como parâmetro confiável para designar nível de imunossupressão nestes pacientes. Assim, sugere-se a realização de estudos mais detalhados quanto a avaliação da série branca sanguínea para encontrar uma possível correlação entre o desenvolvimento de LPO subclínica e alterações nessa série sanguínea.

Das alterações nucleares representativas do efeito citopático do EBV, observamos dados semelhantes ao estudo de Dias et al., 2001 (Dias, Spyrides *et al.*, 2001), quanto a frequência dessas alterações, onde houve maior prevalência das inclusões tipo Cowdry A (95,2%), seguidas do tipo vidro fosco (66,7%) e núcleo em

colar (4,8%). O que se difere do estudo de Reginald & Sivapathasundharam, 2010, onde a alteração tipo vidro fosco foi mais prevalente, seguida pelo tipo núcleo em colar e Cowdry A. Importante ressaltar que os tipo Cowdry A e vidro fosco representam a presença do DNA viral, ou seja, onde está havendo sua replicação, enquanto o tipo núcleo em colar já é a cromatina nuclear humana fragmentada pela ação do vírus, levando a pensar que esta última pode representar a ação do EBV em um organismo mais desprotegido imunologicamente. Como foi observado que a maioria das alterações nucleares encontradas representa a replicação viral (Cowdry A e vidro fosco) e não a fragmentação da cromatina humana (núcleo em colar) e que não houve nenhum caso de LPO clínica, que é muito utilizada como indicador de progressão de AIDS e imunossupressão, acredita-se que a LPO subclínica representa um marcador do comprometimento imunológico destes pacientes, entretanto à um nível inicial de imunossupressão mais intensa, onde o sistema imune ainda apresenta atividade satisfatória.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia aplicada pode-se concluir que:

1. Obteve-se uma alta prevalência de LPO subclínica, observada em mais da metade da amostra avaliada, a qual foi composta por 28 pacientes do gênero feminino e 12 pacientes do gênero masculino, com idade média de  $40,5 \pm 16,1$  anos.
2. Houve maior uso de imunossuppressores biológicos e o tempo médio de uso foi de  $33,4 \pm 108,6$  meses.
3. A alteração nuclear representativa do efeito citopático do EBV mais frequente foi a do tipo Cowdry A.
4. Houve relação estatisticamente significativa entre a presença de LPO subclínica e o tempo de terapia imunossupressora apenas no intervalo de 61 à 120 meses, porém não foi observado quanto ao tipo de imunossupressor, conforme a classificação proposta neste trabalho.

Assim, sugere-se a utilização do raspado bilateral da língua para diagnóstico citopatológico de LPO subclínica como ferramenta de acompanhamento clínico-laboratorial de pacientes imunossuprimidos, a fim de, em última instância, minimizar a ocorrência de doenças oportunistas através da modulação da terapia empregada.

## REFERÊNCIAS

- Acha, A., M. T. Ruesga, *et al.* Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, v.10, n.2, Mar-Apr, p.95-102. 2005.
- Al-Abbadi, M. A. Basics of cytology. Avicenna J Med, v.1, n.1, Jul, p.18-28. 2011.
- Barrett, A. P., D. J. Buckley, *et al.* The value of exfoliative cytology in the diagnosis of oral herpes simplex infection in immunosuppressed patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.62, n.2, Aug, p.175-8. 1986.
- Braz-Silva, P. H., N. P. De Rezende, *et al.* Detection of the Epstein-Barr virus (EBV) by in situ hybridization as definitive diagnosis of hairy leukoplakia. Head Neck Pathol, v.2, n.1, Mar, p.19-24. 2008.
- Braz-Silva, P. H., M. H. Magalhaes, *et al.* Useful of oral cytopathology in the diagnosis of infectious diseases. Cytopathology, v.21, n.5, Oct, p.285-99. 2010.
- Braz-Silva, P. H., R. T. Santos, *et al.* Oral hairy leukoplakia diagnosis by Epstein-Barr virus in situ hybridization in liquid-based cytology. Cytopathology, Feb 28. 2013.
- Bressan, A. L., R. S. D. Silva, *et al.* Imunossupressores na Dermatologia. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.85, Jan./Feb., p.9-22. 2010.
- Caminero, A., M. Comabella, *et al.* Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: An ongoing story. J Neuroimmunol, Apr 5. 2011.
- Cancado, R. P., L. S. Yurgel, *et al.* Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers' normal buccal mucosa. Tob Induc Dis, v.2, n.1, p.43-9. 2004.
- Chandra, A., P. Cross, *et al.* The BSCC code of practice--exfoliative cytopathology (excluding gynaecological cytopathology). Cytopathology, v.20, n.4, Aug, p.211-23. 2009.
- Chen, Y. F., P. Jobanputra, *et al.* A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. Health Technol Assess, v.10, n.42, Nov, p.iii-iv, xi-xiii, 1-229. 2006.
- Cohen, J. I. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med, v.343, n.7, Aug 17, p.481-92. 2000.
- Connor, V. Anti-TNF therapies: a comprehensive analysis of adverse effects associated with immunosuppression. Rheumatol Int, v.31, n.3, Mar, p.327-37. 2011.

De Souza Vianna, L. M., F. Pirani Carneiro, *et al.* Cytological diagnosis of paracoccidioidomycosis: a report of four cases. Diagn Cytopathol, v.41, n.4, Apr, p.374-6. 2013.

Dias, E. P., M. S. Israel, *et al.* Prevalence of oral hairy leukoplakia in 120 pediatric patients infected with HIV-1. Braz Oral Res, v.20, n.2, Apr-Jun, p.103-7. 2006.

Dias, E. P., M. L. Rocha, *et al.* Oral hairy leukoplakia. Histopathologic and cytopathologic features of a subclinical phase. Am J Clin Pathol, v.114, n.3, Sep, p.395-401. 2000.

Dias, E. P., K. S. Spyrides, *et al.* [Oral hairy leukoplakia: histopathologic features of subclinical stage]. Pesqui Odontol Bras, v.15, n.2, Apr-Jun, p.104-11. 2001.

Diniz-Freitas, M., A. Garcia-Garcia, *et al.* Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. Med Oral, v.9, n.4, Aug-Oct, p.355-61. 2004.

Endo, H., T. D. Rees, *et al.* Use of oral exfoliative cytology to diagnose desquamative gingivitis: a pilot study. Quintessence Int, v.39, n.4, Apr, p.e152-61. 2008.

Epstein, J. B., M. Fatahzadeh, *et al.* Exfoliative cytology and electron microscopy in the diagnosis of hairy leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.79, n.5, May, p.564-9. 1995.

Epstein, J. B., C. H. Sherlock, *et al.* Hairy leukoplakia after bone marrow transplantation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.75, n.6, Jun, p.690-5. 1993.

Felix, D. H., K. Watret, *et al.* Hairy leukoplakia in an HIV-negative, nonimmunosuppressed patient. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.74, n.5, Nov, p.563-6. 1992.

Gonzalez, X., M. Correnti, *et al.* Epstein Barr Virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV+ Venezuelan patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, v.15, n.2, Mar, p.e297-302. 2010.

Graboyes, E. M., C. T. Allen, *et al.* Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative patient. Ear Nose Throat J, v.92, n.6, Jun, p.E12. 2013.

Greenspan, D., J. S. Greenspan, *et al.* Oral "hairy" leukoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpes-group virus. Lancet, v.2, n.8407, Oct 13, p.831-4. 1984.

Itin, P. Oral hairy leukoplakia in HIV-negative immunosuppressed patients. J Am Acad Dermatol, v.23, n.5 Pt 1, Nov, p.957-8. 1990.

Jajarm, H. H., N. Mohtasham, *et al.* Evaluation of oral mucosa epithelium in type II diabetic patients by an exfoliative cytology method. J Oral Sci, v.50, n.3, Sep, p.335-40. 2008.

- Keles, M., U. Tozoglu, *et al.* Exfoliative cytology of oral mucosa in kidney transplant patients: a cytomorphometric study. Transplant Proc, v.43, n.3, Apr, p.871-5. 2011.
- Komatsu, T. L., E. R. Rivero, *et al.* Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia scrapes: identification by PCR. Braz Oral Res, v.19, n.4, Oct-Dec, p.317-21. 2005.
- Lewis, D. M. Oral hairy leukoplakia. J Okla Dent Assoc, v.102, n.7, Oct, p.38-9. 2011.
- Loss, R., R. Sandrin, *et al.* Cytological analysis of the epithelial cells in patients with oral candidiasis. Mycoses, v.54, n.4, Jul, p.e130-5. 2010.
- Lozada-Nur, F., J. Robinson, *et al.* Oral hairy leukoplakia in nonimmunosuppressed patients. Report of four cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.78, n.5, Nov, p.599-602. 1994.
- Mangini, C. e F. A. F. D. Melo. Artrite reumatóide, terapia imunossupressora e tuberculose. Revista Brasileira de Reumatologia, v.43, Nov./Dec., p.XI-XV. 2003.
- Mendoza, N., M. Diamantis, *et al.* Mucocutaneous manifestations of Epstein-Barr virus infection. Am J Clin Dermatol, v.9, n.5, p.295-305. 2008.
- Meyer, U., J. Kleinheinz, *et al.* Oral findings in three different groups of immunocompromised patients. J Oral Pathol Med, v.29, n.4, Apr, p.153-8. 2000.
- Migliorati, C. A., A. C. Jones, *et al.* Use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral hairy leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.76, n.6, Dec, p.704-10. 1993.
- Milagres, A., E. P. Dias, *et al.* Prevalence of oral hairy leukoplakia and epithelial infection by Epstein-Barr virus in pregnant women and diabetes mellitus patients--cytopathologic and molecular study. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102, n.2, May, p.159-64. 2007.
- Mishra, M., J. Mohanty, *et al.* Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. Indian J Dermatol Venereol Leprol, v.71, n.3, May-Jun, p.161-5. 2005.
- Mota, L. M. H. D., A. C. V. Oliveira, *et al.* Vacinação contra febre amarela em pacientes com diagnósticos de doenças reumáticas, em uso de imunossupressores. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, p.23-27. 2009.
- Muniz, L. B., T. Franco, *et al.* Oral exfoliative cytology in the diagnosis of histoplasmosis. Cytopathology, v.23, n.3, Jun, p.204-5. 2012.
- Perez-Sayansm, M., J. M. Somoza-Martin, *et al.* Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. Biotech Histochem, v.85, n.3, Apr 28, p.177-87. 2009.
- Piperi, E., J. Omlie, *et al.* Oral hairy leukoplakia in HIV-negative patients: report of 10 cases. Int J Surg Pathol, v.18, n.3, Jun, p.177-83. 2010.
- Reginald, A. e B. Sivapathasundharam. Oral hairy leukoplakia: An exfoliative cytology study. Contemp Clin Dent, v.1, n.1, Jan, p.10-3. 2010.

Rezende, J. Imunodepressão, imunossupressão. Revista de Patologia Tropical, v.40, n.2, abr.-jun., p.199-201. 2011.

Rivera, C. e C. Nunez-De-Mendoza. Exfoliative cytology of oral epithelial cells from patients with type 2 diabetes: cytomorphometric analysis. Int J Clin Exp Med, v.6, n.8, p.667-76. 2013.

Robaina, T. F., C. P. Valladares, *et al.* Polymerase chain reaction genotyping of Epstein-Barr virus in scraping samples of the tongue lateral border in HIV-1 seropositive patients. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.103, n.4, Jun, p.326-31. 2008.

Schiodt, M., T. Norgaard, *et al.* Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative woman with Behcet's syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.79, n.1, Jan, p.53-6. 1995.

Slots, J., I. Saygun, *et al.* Epstein-Barr virus in oral diseases. J Periodontal Res, v.41, n.4, Aug, p.235-44. 2006.

Sumanthi, J., G. S. Reddy, *et al.* A study on cytomorphometric analysis of exfoliative buccal cells in iron deficiency anemic patients. Contemp Clin Dent, v.3, n.Suppl 2, Sep, p.S156-9. 2012.

Talhari, C., A. Chrusciak-Talhari, *et al.* Exfoliative cytology as a rapid diagnostic tool for lobomycosis. Mycoses, v.52, n.2, Mar, p.187-9. 2009.

Talhari, C., J. V. De Souza, *et al.* Oral exfoliative cytology as a rapid diagnostic tool for paracoccidioidomycosis. Mycoses, v.51, n.2, Mar, p.177-8. 2008.

Tavares, D. S. Avaliação da infecção oral pelo vírus Epstein-Barr em candidatos a transplante e em transplantados - estudo citopatológico e molecular. Programa de pós-graduação em patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008. 160 p.

Taylor, P. C. Anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Mol Biotechnol, v.19, n.2, Oct, p.153-68. 2001.

Thompson, A. E., S. W. Rieder, *et al.* TNF therapy and the risk of serious infection and malignancy in patients with early rheumatoid arthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. Arthritis Rheum, Feb 25. 2011.

Triantos, D., S. R. Porter, *et al.* Oral hairy leukoplakia: clinicopathologic features, pathogenesis, diagnosis, and clinical significance. Clin Infect Dis, v.25, n.6, Dec, p.1392-6. 1997.

Tugizov, S., R. Herrera, *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. J Virol, v.81, n.11, Jun, p.5484-96. 2007.

Tugizov, S. M., R. Herrera, *et al.* Epstein-Barr virus transcytosis through polarized oral epithelial cells. J Virol, v.87, n.14, Jul, p.8179-94. 2013.

Walling, D. M., A. L. Brown, *et al.* Multiple Epstein-Barr virus infections in healthy individuals. J Virol, v.77, n.11, Jun, p.6546-50. 2003.

Walling, D. M., C. M. Flaitz, *et al.* A non-invasive technique for studying oral epithelial Epstein-Barr virus infection and disease. Oral Oncol, v.39, n.5, Jul, p.436-44. 2003.

Walling, D. M., C. M. Flaitz, *et al.* Effect of Epstein-Barr virus replication on Langerhans cells in pathogenesis of oral hairy leukoplakia. J Infect Dis, v.189, n.9, May 1, p.1656-63. 2004.