



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA

ANA CAROLINA MACHADO LANDGRAF

ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES
HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA COM E SEM
VENTILAÇÃO MECÂNICA

Curitiba
2015

ANA CAROLINA MACHADO LANDGRAF

**ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES
HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA COM E SEM
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza.

**Curitiba
2015**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

L256a
2015 Landgraf, Ana Carolina Machado
Aspectos citopatológicos da mucosa bucal de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva com e sem ventilação mecânica / Ana Carolina Machado Landgraf ; orientador: Paulo Henrique Couto Souza. – 2015.
61 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2015
Bibliografia: f. 25-27

1. Odontologia. 2. Mucosa bucal – Citopatologia. 3. Citologia esfoliativa. 4. Unidade de terapia intensiva. I. Souza, Paulo Henrique Couto. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA MACHADO LANDGRAF

ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA COM E SEM VENTILAÇÃO MECÂNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Estomatologia**.

Orientador(a):



Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Soraya Castro Trindade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UEFS

Curitiba, 06 de março de 2015.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Página título	1
Resumo	2
Introdução	3
Material e Método.....	5
Resultados	8
Discussão.....	10
Conclusão	12
Referências	13
ARTIGO EM INGLÊS	16
Title page.....	16
Abstract	17
Introduction.....	18
Material and Methods.....	19
Results	21
Discussion	23
Conclusion.....	24
Conflict of interest.....	24
References	25
ANEXO.....	28
Parecer de comitê de ética.....	28
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido A.....	31
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido B.....	33
Análise estatística	35
Normas para publicação	50

Dedicatória

Aos meus filhos Arthur, Maria e Laura.

Graças a vocês, tenho a oportunidade de melhorar a cada dia.

Ao meu marido Cleston Celestino Batista Landgraf

Porque a melhor parte de mim reflete o seu amor, o seu companheirismo e a nossa fé em um bem comum.

Este trabalho é uma pequenina parte de nosso projeto de vida. E eu lhe dedico a vocês, com todo o meu amor.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela qual eu fui contemplada com uma bolsa de estudo, permitindo que eu me dedicasse em tempo integral aos estudos. Superei distâncias e retornarei com novos conhecimentos ao Estado de Mato Grosso, carente desta área de conhecimento tão especial e necessária para a Odontologia: a Estomatologia.

À Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, por investir concretamente na qualificação profissional do seu quadro de funcionários, da qual eu me orgulho em fazer parte.

Ao Decano da Escola de Saúde e Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, professor Sérgio Surugi de Siqueira.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da PUCPR, professor Monir Tacla.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR, professor Sérgio Vieira.

Como aluna de graduação da PUCPR, tive o privilégio de contar com a participação desses honrados professores na minha formação profissional e pessoal. O meu crescimento, assim como o de cada aluno desta Universidade, é fruto do exaustivo trabalho e dedicação dos senhores.

Aos professores membros da minha Banca de Defesa de Mestrado:

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. Sua atenção e contribuições muito oportunas foram determinantes na construção desse conhecimento.

Soraya Castro Trindade. Pela sua disponibilidade em fazer parte dessa banca, postura assertiva e coerência nas contribuições.

Também agradeço aos demais professores e funcionários desta família chamada PUCPR. Sentirei muitas saudades!

Agradecimentos especiais

À Deus, pela missão espiritual que me foi confiada.

Ao companheiro dedicado e amoroso de todas as horas, meu marido Cleston Celestino Batista Landgraf, por ter a generosidade de enfrentar as dificuldades, em apoio irrestrito ao meu momento. Por ter assumido todas as exigências do nosso lar, cuidando de nossos filhos e harmonizando as distâncias entre nós. Por externar sempre uma palavra adequada e uma postura assertiva, especialmente no auxílio das questões necessárias à conclusão deste estudo. Eterna gratidão!

Aos meus pais, Maria de Lourdes Machado Landgraf e Vanderlei Bagio Landgraf, porque não mediram esforços, como pais e avós, para me apoiarem.

Aos meus tios Rosângela Mendes Silva Tironi e Cícero Lotário Tironi. Representam para mim um porto seguro.

À minha amiga Ana Paula Faria. Pela amizade verdadeira.

À Josiéld Marprates Cunha, porque sempre está ao meu lado quando eu preciso. Por sua amizade e desprendimento.

Às queridas e novas amigas, presentes de Deus nesta caminhada...

Adriane de Castro Martinez Martins. Por cada palavra, cada gesto, repletos de generosidade.

Soraya de Azambuja Berti Couto, professora da PUCPR, por sua incansável dedicação à Estomatologia e contribuições relevantes a esse trabalho. Levarei no meu coração as suas palavras de incentivo, o seu carinho e a bela amizade.

Yoko Gomi. Poderia lhe escrever tanta coisa querida amiga, tantos foram os bons momentos juntas... Sua presença me fez muito mais feliz!

À funcionária pública da Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso, Soraia Pinto Tamberi Rodrigues Maciel, pelo seu comprometimento no trato com as questões necessárias à minha licença para qualificação profissional.

À diretora da Escola de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso, Marta Maciel Metello Mansur Bumlai, por sempre me incentivar. Seus exemplos de força foram a minha motivação.

Ao professor Luiz Carlos Carta Gambus, pela excelência profissional e exemplos de vida, sempre tão solícito com os alunos e pacientes da Clínica de Estomatologia da PUCPR.

Aos colegas Ademir Franco, Angélica Reinheimer, Henrique Climeck e Maria Augusta Ramires. Porque juntos nos tornamos mais fortes.

À secretária acadêmica, Neide Reis Borges, por tanta dedicação e solicitude.

Agradecimentos aos profissionais que estiveram ao meu lado em todo o desenvolvimento deste estudo. A paixão com a qual desempenharam as suas atividades tocaram profundamente o meu ser:

À Adriane Zarife Klentzuk, farmacêutica adorável que conheci, responsável pelo processamento laboratorial de todos os espécimes celulares desse estudo.

Ao professor Júlio Cezar Merlin. Como farmacêutico, realizou as análises citopatológicas desse estudo, sempre compartilhando seu profundo conhecimento. Por sua especial dedicação nas contribuições necessárias e exemplos de respeito, profissionalismo e altruísmo. Muito obrigada, caro professor!

Ao professor Sérgio Aparecido Ignácio, estatístico responsável pelo tratamento de dados desse estudo. Por seu desprendimento e notável dedicação.

Aos verdadeiros protagonistas, que foram todos os pacientes e seus acompanhantes, que se permitiram participar do estudo, por tamanha generosidade e amor ao próximo.

Agradecimento especial...

Ao meu orientador, professor Paulo Henrique Couto Souza. Como educador, soube valorizar cada etapa do meu aprendizado, guiando os meus passos na construção dos saberes com afinco, paciência, respeito e perseverança. Eterna gratidão, professor!

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Página título

ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA COM E SEM VENTILAÇÃO MECÂNICA

Ana Carolina Machado Landgraf¹, Paulo Henrique Couto Souza²

1- Aluna de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

2- Autor correspondente:

Professor Titular, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho.

CEP: 80215-901

Curitiba – PR

Brasil

Tel: 55 (41) 3271 – 2565

Fax: 55 (41) 3271 – 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

Resumo

Objetivo: Analisar os aspectos citopatológicos da mucosa bucal de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI), utilizando o método da citologia esfoliativa em base líquida (CEBL). **Material e método:** A amostra foi dividida em três grupos: 1) Grupo CVM: 27 pacientes admitidos em UTI, permanecendo internados de sete a 14 dias sob ventilação mecânica; 2) Grupo SVM: 29 pacientes admitidos em UTI, permanecendo internados de sete a 14 dias sem ventilação mecânica; 3) Grupo controle (C): 27 pacientes saudáveis, sem lesões em mucosas jugais. Todos os participantes foram pareados por sexo e idade. Os critérios de não inclusão foram pacientes HIV soropositivos, em tratamento quimioterápico ou radioterápico de cabeça e pescoço. Utilizou-se escova de citologia para a obtenção de espécimes celulares da mucosa jugal. Processou-se o material em lâminas de vidro e aplicou-se a coloração de Papanicolaou. As lâminas foram codificadas, impossibilitando a obtenção de informações dos pacientes. Um especialista citopatologista realizou a análise, cujos achados foram registrados numa escala ordinal. **Resultados:** Aplicando-se os testes Kruskal Wallis e Dunn ($\alpha=5\%$), foram comprovadas maiores frequência e intensidade de cariomegalia, halos perinucleares, queratinização celular, células profundas e infiltrado leucocitário no grupo CVM ($p<0,05$), em comparação aos grupos SVM e C, que não diferiram entre si ($p>0,05$). **Conclusões:** A CEBL foi capaz de detectar alterações pré-clínicas em mucosa jugal. **Relevância clínica:** O grupo CVM está mais vulnerável às infecções em UTI. Portanto, a atenção odontológica pode contribuir com o desenvolvimento de cuidados bucais específicos a esse público.

Palavras-chave: Citopatologia - Mucosa bucal - Citologia esfoliativa em base líquida - Ventilação mecânica - Unidade de terapia intensiva - Intubação endotraqueal

Introdução

No âmbito da atenção terciária em saúde, os estudos desenvolvidos até o momento refletem a crescente preocupação da comunidade científica em relação à implementação da assistência para os pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI), considerando que a microbiota residente da boca possui microrganismos potencialmente patogênicos, capazes de promoverem infecções secundárias e oportunistas [1-5].

Dentre as condições e doenças associadas que determinam maior vigilância dos profissionais de saúde acerca dos cuidados odontológicos, se destacam a necessidade de ventilação mecânica invasiva por meio da intubação endotraqueal, pelo alto risco de propiciarem pneumonia, conhecida como pneumonia associada à ventilação mecânica [3, 4]. Embora com importantes variáveis entre os estudos, os resultados comprovam as relações entre a redução da incidência de infecções respiratórias e a efetivação de ações voltadas para a descontaminação do sítio bucofaríngeo, em pacientes hospitalizados em UTI [4, 6, 7-10]. No campo da Odontologia Hospitalar, os estudos de avaliação do perfil de saúde bucal enfatizam que os pacientes em UTI vivenciam alterações importantes como lesões em mucosa bucal, doenças periodontais [11], ressecamento de lábios e mucosas, infecções fúngicas ao longo do período de internação [12], além do aumento do biofilme em superfícies dentárias [13, 14]. Essas condições estão associadas a fatores específicos tais como o uso de medicamentos que reduzem o fluxo salivar e consequentemente a proteção natural da mucosa bucal que a saliva proporciona por meio de enzimas e anticorpos. Além disso, o comprometimento da resposta imune decorrente da doença de base do paciente ou de complicações sistêmicas associadas, também contribuem para o agravamento da saúde bucal [2, 9, 12].

Outra questão apontada é a ausência da atividade mastigatória nesses pacientes, que contribui para a diminuição do fluxo salivar, determinando o ressecamento das mucosas bucais. Esse quadro é agravado nos pacientes intubados, pela ausência de selamento labial promovida pela intubação endotraqueal necessária em determinadas condições de suporte de vida [12]. Nesse contexto, a evidente dificuldade de acesso intra bucal nesses pacientes, comumente sedados, não responsivos ou não colaborativos [15, 16], propicia a

permanência de focos infecciosos na boca e o surgimento de soluções de continuidade nas mucosas. Tais condições configuram-se como possíveis portas de entrada para microrganismos patogênicos, que podem agravar o quadro sistêmico já debilitado desses pacientes [17, 18] e ainda, parecem determinar maior vulnerabilidade dos pacientes intubados, frente aos fatores de risco comumente encontrados no ambiente de UTI, especialmente os infecciosos.

Autores destacam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas rigorosamente científicas que abordem o diagnóstico e possibilitem determinar as reais necessidades de cuidados em saúde bucal de pacientes internados em UTI [2, 3, 11, 12, 14]. E ainda, a maioria dos estudos na área estão pautados em critérios clínicos, subjetivos e dependentes de julgamento do observador [2, 8, 11], sendo escassos aqueles bem desenhados e controlados que analisem o perfil de saúde bucal de pacientes em UTI, sejam em ventilação mecânica ou respiração espontânea ou ainda, comparando a real situação entre grupos distintos de pacientes. Entretanto, estudos precisam orientar a atenção odontológica às reais necessidades de cada público específico [9, 14].

A partir dessa concepção de cuidado, enfatiza-se a necessidade de identificação dos fatores de risco aos quais o paciente de UTI está exposto, para o desenvolvimento de estratégias de enfrentamento adequadas, o que inclui uma criteriosa avaliação não apenas dos dentes e gengivas, mas também do padrão das mucosas bucais [9, 18].

Nessa perspectiva, apesar da escassez de estudos sobre análise citopatológica da mucosa bucal de pacientes em UTI e considerando que a técnica da citologia esfoliativa em base líquida é um procedimento não invasivo, indolor, de baixo custo e de execução fácil e rápida [19, 20], vislumbrou-se a possibilidade de se estabelecer o perfil de saúde bucal de pacientes hospitalizados, submetidos ou não à ventilação mecânica invasiva, a partir das condições das mucosas bucais, por meio da avaliação citopatológica. Justificou-se a presente pesquisa considerando-se que as alterações celulares benignas, inflamatórias ou infecciosas, podem ser detectadas precocemente pela análise citopatológica [21] e nesses casos, caracterizadas como preditoras de risco para a saúde bucal. Essa hipótese é especialmente importante porque a mucosa bucal desempenha papel crucial na defesa e resposta imune, por ser uma barreira de proteção contra os microrganismos [22].

Frente ao referencial teórico exposto, objetivou-se analisar a mucosa bucal de pacientes internados em UTI, com e sem ventilação mecânica, utilizando-se a técnica da citologia esfoliativa em base líquida.

Material e Método

Aspectos Éticos

O estudo fora previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob parecer de número 570.988/2014, e incluiu pacientes internados no Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia, em Curitiba, Paraná, Brasil, admitidos em UTI geral ou cardíaca durante o desenvolvimento da pesquisa. O grupo controle constituiu-se de pacientes ambulatoriais da Clínica de Odontologia da PUCPR. Todos os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e após os esclarecimentos necessários, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

População e Amostra do Estudo

Durante o período de março a novembro de 2014, obteve-se a amostra de 83 pacientes, pareados por sexo e idade, que constituíram três grupos de estudo, descritos a seguir:

Grupo com ventilação mecânica (CVM): constituído por 27 pacientes traqueostomizados e internados em UTI.

Grupo sem ventilação mecânica (SVM): constituído por 29 pacientes que deram entrada em UTI, permanecendo internados em UTI ou encaminhados para as unidades de enfermaria.

Grupo controle (C): constituído por 27 pacientes saudáveis, sem lesões clinicamente aparentes em mucosa jugal, não etilistas, não tabagistas, não hospitalizados ou submetidos à ventilação mecânica prévia de qualquer modalidade, uso de névoa, cateter nasal de O₂ ou nebulização nos últimos 90 dias.

Os critérios de inclusão foram pacientes com idade superior a 18 anos, com entrada nas referidas UTI, permanecendo internados em um período de sete a 14 dias e que apresentassem condições físicas para a realização do exame clínico e citopatológico da mucosa jugal pelo pesquisador.

Os critérios de não inclusão foram pacientes reinternados ou admitidos de outro hospital, HIV soropositivos, pacientes em tratamento quimioterápico ou em radioterapia de cabeça e pescoço.

Exame Clínico

As informações relativas a sexo, idade e motivo da internação foram extraídas do prontuário médico do paciente. Para todos os pacientes, fora aplicado um protocolo clínico que incluiu o umedecimento de lábios e mucosas com gaze e água destilada estéreis, seguido de remoção de biofilme e resíduos alimentares porventura presentes. Na sequência realizou-se o exame físico intrabucal e procedeu-se a colheita de células. Todos os procedimentos foram realizados por um único observador treinado, com o auxílio de uma lanterna portátil com luz amarela.

Colheita de Células

Realizou-se a colheita de células das mucosas jugais do lado direito e esquerdo, executando-se movimentos circulares amplos, de modo a evitar a erosão da mucosa pela fricção repetida no mesmo sítio [23], totalizando dez movimentos em cada lado em sentido horário, utilizando-se a escova de citologia.

No grupo CVM a colheita fora realizada nos pacientes que deram entrada na UTI e foram imediatamente intubados, permanecendo nessa condição de sete e 14 dias, e então submetidos à traqueostomia. A colheita era realizada em período não superior a 48 horas da realização da traqueostomia. No grupo SVM realizou-se a colheita entre sete e 14 dias da internação em UTI. Para o grupo C, realizou-se a colheita durante o atendimento ambulatorial na clínica de Odontologia da PUCPR.

A parte ativa da escova contendo o esfregaço fora destacada da sua haste longa e submersa num frasco previamente identificado, contendo 10 mL da

solução conservadora *Specimen Collection Vial*, que compõe o kit para citologia em base líquida da marca *Liqui-PREP™ Cytology Processing* (LGM International, FL). Os frascos foram conservados em temperatura ambiente até o processamento laboratorial.

Processamento Laboratorial

O material biológico fora processado em lâminas de vidro no laboratório de Citologia do Curso de Farmácia da PUCPR, conforme orientações do fabricante, em seguida fixado em álcool 95% durante dez minutos e então hidratado em água corrente por três minutos. Procedeu-se a coloração de Papanicolaou (Newprov® Produtos para Laboratório LTDA, Paraná, Brasil), finalizando-se com a adesão das lamínulas sobre cada espécime celular corada, utilizando-se duas gotas de verniz Entellan® (Merck®, Darmstadt, Alemanha).

Análise Citopatológica

As lâminas foram identificadas, de modo a impossibilitar a visualização das informações dos pacientes. A leitura fora realizada por um especialista citopatologista, por meio de microscópio binocular planocromático (Nikon®, Tokyo, Japan) percorrendo em movimento de zigue-zague toda a extensão da lâmina, no sentido superior para inferior, de modo a evitar que algum campo não fosse observado, bem como a duplicidade de leituras das células, com o intuito de observar a possível presença de alterações celulares associadas à inflamação, reparo e presença de infiltrado leucocitário.

Análise Estatística

Para a variável idade, aplicou-se o teste Kolmogorov-Smirnov, seguido de ANOVA e para a variável sexo, teste Qui-quadrado e Razão de Verossimilhança.

Para as variáveis obtidas na análise citopatológica, utilizou-se tabela e gráfico de frequência cruzada, comparando-as entre os grupos CVM, SVM e C. Em seguida, aplicou-se o teste Kruskal-Wallis não paramétrico e quando ocorreram diferenças, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn.

Em todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Idade e sexo

Participaram 83 pacientes, com idade média de 64,78 ($\pm 12,21$), 64,17 ($\pm 10,90$) e 66,41 ($\pm 12,18$), para os grupos CVM, SVM e C, respectivamente.

Comprovou-se que os participantes da pesquisa foram efetivamente pareados por idade ($p=0,766$) e sexo ($p=0,840$).

Achados Citopatológicos

No total, 83 espécimes celulares foram analisados. Não ocorreram perdas amostrais e todas as lâminas processadas foram consideradas satisfatórias, adotando-se como critérios adequada celularidade e ausência de artefatos que impedissem a análise citopatológica. Houve predomínio de células intermediárias para os três grupos de estudo. As alterações citopatológicas encontradas foram registradas e classificadas numa escala ordinal de zero a quatro, em ordem crescente de intensidade:

- 0 - Ausente;
- 1 - Raro (+): presença de raras alterações em até 25% das células de todo o esfregaço;
- 2 - Discreto (++) : raras ou algumas células alteradas em alguns campos, até 50% de todo o esfregaço;
- 3 - Moderado (+++) : raras ou algumas células alteradas em todos os campos, até 75% de todo o esfregaço;
- 4 - Acentuado (++++): algumas ou muitas células alteradas em todos os campos, até 100%.

Os resultados que apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p<0,05$), constam na Tabela 1 e estão descritos na sequência :

Tabela 1 - Comparação dos resultados entre os grupos CVM, SVM e C

Resultado	Classificação	CVM		SVM		C	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cariomegalia	Ausente	8a	(29,6)	20b	(69,0)	24b	(88,9)
	Raro	12a	(44,4)	8a, b	(27,6)	3b	(11,1)
	Discreto	7a	(25,9)	1b	(3,4)	0b	(0,0)
Média ¹		0,96		0,34		0,11	
Haloperinuclear	Ausente	9a	(33,3)	24b	(82,8)	26b	(96,3)
	Raro	8a	(29,6)	3a, b	(10,3)	1b	(3,7)
	Discreto	6a	(22,2)	2a, b	(6,9)	0b	(0,0)
	Moderado	4a	(14,8)	0b	(0,0)	0b	(0,0)
Média ¹		1,19		0,24		0,04	
Queratinização	Ausente	14a	(51,9)	23b	(79,3)	26b	(96,3)
	Raro	11a	(40,7)	6a, b	(20,7)	1b	(3,7)
	Discreto	2a	(7,4)	0a	(0,0)	0a	(0,0)
Média ¹		0,56		0,21		0,04	
Infiltrado leucocitário	Ausente	1a	(3,7)	10b	(34,5)	11b	(40,7)
	Raro	18a	(66,7)	15a	(51,7)	13a	(48,1)
	Discreto	5a	(18,5)	2a	(6,9)	2a	(7,4)
	Moderado	0a	(0,0)	0a	(0,0)	1a	(3,7)
	Acentuado	3a	(11,1)	2a	(6,9)	0a	(0,0)
Média ¹		1,48		0,93		0,74	
Células profundas	Ausente	17a	(63,0)	28b	(96,6)	26b	(96,3)
	Raro	7a	(25,9)	1b	(3,4)	1b	(3,7)
	Discreto	2a	(7,4)	0a	(0,0)	0a	(0,0)
	Acentuado	1a	(3,7)	0a	(0,0)	0a	(0,0)
Média ¹		0,56		0,03		0,04	

(1) Teste de Kruskal Wallis. (a, b) Teste de Dunn: cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo: grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).

Cariomegalia

Apresentou-se com maior frequência e intensidade no grupo CVM ($p=0,000$) em relação aos grupos CVM e C (Tabela 1), que não diferiram entre si ($p>0,05$). Dos espécimes analisados, 70,3% apresentaram resultados positivos no grupo CVM, 31% no grupo SVM e 11% no grupo C.

Halos Perinucleares

Ocorreu em 66,7% dos espécimes do grupo CVM (Tabela 1), que obteve a maior prevalência, determinando importante diferença ($p=0,000$) quando comparado aos grupos SVM (17,2%) e C (3,7%), que não diferiram entre si ($p>0,05$).

Queratinização Celular

Observou-se em 48,1% dos espécimes analisados do grupo CVM (Tabela 1), com diferenças significantes ($p=0,000$) quando comparado aos grupos SVM (20,7%) e C (3,7%), que não diferiram entre si ($p>0,05$).

Infiltrado Leucocitário

No grupo CVM, 96,3% dos espécimes apresentaram essa condição (Tabela 1), determinando o maior percentual de resultados positivos ($p=0,003$) em relação aos grupos SVM (68,5%) e C (59,2%), que não diferiram entre si ($p>0,05$). Quanto à morfologia celular dos leucócitos, houve predomínio de polimorfonucleares neutrófilos para os três grupos de estudo.

Células Profundas

A presença ocorreu em 37% dos espécimes analisados para o grupo CVM (Tabela 1), com diferenças significantes ($p=0,000$) em comparação aos grupos SVM (3,4%) e C (3,7%), que não diferiram entre si ($p>0,05$).

Discussão

A expressiva presença de cariomegalia nos espécimes celulares em CVM configurou-se como alerta à integridade do epitélio da mucosa jugal nesses pacientes, uma vez que essa alteração celular é frequente nos processos inflamatórios, especialmente em células jovens com intensa atividade proliferativa [24].

Essa condição pode estar associada ao ressecamento das mucosas bucais, determinado pela permanência do tubo endotraqueal, bem como possíveis alterações no fluxo e composição bioquímica da saliva nos pacientes CVM, situações que determinam a redução da capacidade de resposta imunológica local. Portanto, a somatória de agentes agressores, locais e sistêmicos, potencializou a presença de cariomegalia no grupo CVM.

Essa suspeição fora reforçada pela importante presença de queratinização celular no grupo CVM. Salientou-se que o epitélio da mucosa jugal é do tipo não queratinizado, mas variações neste padrão podem ocorrer. Isso porque a queratinização é caracterizada como uma resposta adaptativa da célula, que apresenta aceleração no seu processo de maturação, frente aos agentes agressores ambientais [22]. Nessas condições, observou-se expressiva queratinização associada ao aumento das áreas nucleares das células [25], o que se comprovou no presente estudo.

Destacou-se que a queratinização celular relacionou-se com o aumento da idade [26]. Entretanto, os grupos foram pareados por sexo e idade e mesmo assim, a queratinização não ocorrera de forma similar entre eles, com a maior prevalência de células queratinizadas no grupo CVM e portanto, atribuiu-se a esta condição, a maior agressividade dos fatores locais e sistêmicos presentes nesse grupo.

Embora não foram encontrados dados relativos à condição citopatológica das mucosas bucais de pacientes expostos à ventilação mecânica endotraqueal, a clara associação entre cariomegalia, halos perinucleares e queratinização celular configurou-se como sinal de alerta para a integridade das mucosas bucais nos pacientes do grupo CVM, considerando que essas são alterações típicas de processos inflamatórios [22, 26]. Portanto, a maior frequência e intensidade desses achados levou à suspeição de que os pacientes desse grupo apresentam condições locais e sistêmicas específicas, impostas pela ventilação mecânica.

Além disso, a presença de infiltrado leucocitário com predominância de polimorfonucleares neutrófilos em maior prevalência para o grupo CVM, sinalizou a presença constante e recente de importantes agentes agressores locais.

Quanto aos resultados positivos para a presença de células profundas, soluções de continuidade na mucosa jugal explicariam a presença das mesmas com maior prevalência para o grupo CVM. Entretanto, constatou-se clinicamente

a presença de mucosa jugal ulcerada, coincidente com a descrição de células profundas no resultado citopatológico, somente em dois pacientes do grupo CVM.

Ocorre que, em situações de integridade do epitélio, essas células dificilmente são observadas, portanto, esses achados corroboram o posicionamento defendido em estudo prévio, de que a citologia esfoliativa em base líquida é um método útil para a avaliação de alterações celulares que precedem o surgimento de sinais clínicos na mucosa jugal [27].

Conclusão

Os resultados comprovaram a deterioração da saúde bucal dos pacientes intubados, que apresentaram maior frequência e intensidade de alterações celulares na mucosa jugal, constatadas por meio da análise citopatológica, destacando-se a importância do acompanhamento odontológico em UTI.

Estudos inovadores poderão contribuir para o aprimoramento da citologia esfoliativa em base líquida, a partir de marcadores biológicos específicos para a mucosa jugal, definidos por protocolos integrados de pesquisas em citopatologia e saúde bucal, considerando que a citologia esfoliativa é capaz de detectar alterações pré-clínicas, caracterizadas como preditoras de risco para a integridade das mucosas bucais. Resultados promissores nessa área poderão contribuir para a manutenção da integridade epitelial, bem como para a redução do risco de infecções secundárias e complicações sistêmicas associadas às lesões em mucosas bucais, diminuindo os índices de morbi-mortalidade em UTI e, principalmente, melhorando a qualidade de vida dos pacientes intubados.

Referências

1. Azarpazhooh A, Leak JL (2006) Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol* 77:1465-1482. doi:10.1902/jop.2006.060010
2. Berry AM, Davidson PM, Masters J, Rolls K (2007) Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. *American Journal of Critical Care* 16(6):552-562.
3. Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gil SR, Scannapieco FA (2008) Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis* 47(12):1562-1570. doi: 10.1086/593193
4. Garcia R, Jendresky L, Colbert L, Bailey A, Zaman M, Majumder M (2009) Reducing ventilator-associated pneumonia through advanced oral-dental care: a 48-month study. *American Journal of Critical Care* 18(6):523-532. doi: 10.4037/ajcc2009311
5. Scannapieco FA (2013) The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections. *Clin Microbiol New* 35(20):163-169.
6. Bergmans DCJJ, Bonten MJM, Gaillard CA, Paling JC, Geest SVD, Tiel FHV, *et al.* (2001) Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 164(3):382-388.
7. Koeman M, Van der Ven AJAM, Hak E, Joore HCA, Kaasjager K, Smet AGAD, *et al.* (2006) Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1348-1355. doi: 10.1164/rccm.200505-8200c
8. Shi Z, Wang P, Zhang Q, Wu Y, Chen E, Worthington HV, *et al.* (2013) Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia (Review). *The Cochrane Collaboration* 8:1-125.
9. Prendergast V, Kleiman C, King M (2013) The bedside oral exam and the barrow oral care protocol: translating evidence-based oral care into practice. *Intensive Critical Care Nursing* 29:282-290. doi: 10.1016/j.iccn.2013.04.001

10. Pèrez-Granda MJ, Barrio JM, Muñoz P, Hortal J, Rincón C, Bouza E (2014) Impact of four sequential measures on the prevention of ventilator-associated pneumonia in cardiac surgery patients. *Critical Care* 18:1-8.
11. Terezakis E, Needleman I, Kumar N, Moles D, Agudo E (2011) The impact of hospitalization on oral health: a systematic review. *J Clin Periodontol* 38(7):628-636. Doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01727.x
12. Jones H (2005) Oral care in intensive care units: a literature review. *Spec Care Dentist* 25(1):6-11.
13. Jones DJ, Munro CL, Grap MJ (2011) Natural history of dental plaque accumulation in mechanically ventilated adults: a descriptive correlational study. *Intensive Crit Care Nurs* 27(6):299-304. doi: 10.1016/j.iccn. 2011.08.005
14. Needleman I, Ryun-Hyu J, Brealey D, Sachdev M, Moskal-Fitzpatrick D, Bercades G, *et al.* (2012) The impact of hospitalization on dental plaque accumulation: an observational study. *J Clin Periodontol* 39:1011-1016. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01939.x
15. Ames NJ, Sulima P, Yates JM, McCullag L, Gollins SL, Soeken K *et al.* (2011) Effects of systematic oral care in critically ill patients: a multicenter study. *American Journal of Critical Care* 20(5):103-114.
16. Dale C, Angus FE, Sinuff T, Mykhalovskiy (2012) Mouth care for orally intubated patients: a critical ethnographic review of the nursing literature. *Intensive Crit Care Nurs* 1-9.
17. Hsu SP, Liao CS, Li CY, Chiou AF. The effects of different oral care protocols on mucosal change in orally intubated patients from an intensive care unit. *Journal of Clinical Nursing* 20:1044-53. doi: 10.1111/j.1365-2702.2010.03515.x
18. Yildiz M, Durna Z, Akin S (2013) Assessment of oral care needs of patients treated at the intensive care unit. *Journal of Clinical Nursing* 22:2734-2747. doi: 10.1111/jocn.12035
19. Mehrotra R (2011) The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvements. *Diagnostic Cytopathology* 40(1):73-83. doi: 10.1002/dc.21581
20. Dolens ES, Nakai FVD, Parizi JLS, Nai GA (2013) Cytopathology: a useful technique for diagnosing oral lesions? A systematic literature review. *Diagnostic Cytopathology* 41:505-514. doi: 10.1002/dc.22875

21. Braz-Silva PH, Magalhães MHCG, Hofman V, Ortega KL, Ilie MI, Odin G, *et al.* (2010) Usefulness of oral cytopathology in the diagnosis of infectious diseases. *Cytopathology*. 21:285-299. doi: 10.1111/j.1365-2303.2010.00770.x
22. Nanci A (2012) Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. Mosby, FL.
23. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E *et al.* (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4(6): 825-837. doi: 10.1038/nprot.2009.53
24. Kazanowska K, Halón A, Radwan-Oczko M (2014) The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology: contemporary knowledge with review of the literature. *Adv Clin Exp Med* 23 (2):299-305.
25. Hashemipour MA, Aghababaie M, Mirshekari TR, Shekaari MA, Tahmasbi-Arashlow M, Tahasbi Arashlow F, *et al.* (2013) Exfoliative cytology of oral mucosa among smokers, opium addicts and non-smokers: a cytomorphometric study. *Archives of Iranian Medicine* 16(12):725-730.
26. Moraes M, Arantes SB, Vianna LM, Guerra ENS, Melo NS (2010) Virtual database of exfoliative cytology in mouth injuries. *Oral Sci* 2:17-22.
27. Arruda, EP. Trevilatto PC, Camargo ES, Woyceichoski IEC, Machado MAN, Vieira I, Lima AAS (2011) Preclinical alterations of oral epithelial cells in contact with orthodontics appliances. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Repub* 155(3):299-304. doi: 10.5507/bp.2011.043

ARTIGO EM INGLÊS

Title page

CYTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF THE ORAL MUCOSA OF PATIENTS TREATED WITH AND WITHOUT MECHANICAL VENTILATION IN INTENSIVE CARE UNITS

Ana Carolina Machado Landgraf, DDS¹; Paulo Henrique Couto Souza, PhD¹

1. Department of Stomatology, School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Contacting author:

Paulo Henrique Couto Souza, PhD

Imaculada Conceição 1155 – Prado Velho.

Postal code: 80215-901

Curitiba – PR

Brazil

Phone: 55 (41) 3271 – 2565

Fax: 55 (41) 3271 – 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

CYTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF THE ORAL MUCOSA OF PATIENTS TREATED WITH AND WITHOUT MECHANICAL VENTILATION IN INTENSIVE CARE UNITS

Abstract

Objective: To evaluate the cytopathological aspects of the oral mucosa of patients treated with and without mechanical ventilation, in intensive care units (ICU), using liquid-base exfoliative cytology (LBEC). **Material and methods:** The sample was divided into three groups: 1) Twenty-seven patients admitted at ICU for a period between 7 and 14 days, under mechanical ventilation (group CVM); 2) Twenty-nine patients admitted at ICU for a period between 7 and 14 days, without mechanical ventilation (group SVM); 3) Twenty-seven healthy patients, without lesions in the oral mucosa (group C). All the included patients were paired matching age and gender. HIV positive patients were considered not eligible for sampling, as well as patients under head and neck chemo- and radiotherapy. Cell samples were collected from the buccal mucosa using cytology brushes. The obtained material was applied on glass slides prior to Papanicolaou staining. The glass slides were codified enabling further blind analyses. The analyses were performed by a specialist in the field of cytopathology. Statistical tests consisted of Kruskal Wallis' and Dunn's ($\alpha=5\%$). **Results:** CVM patients presented higher prevalence and intensity of karyomegaly, perinuclear halos, cell keratinization, deep cells and leukocyte infiltrates if compared to groups SVM and C ($p<0.05$). The comparison between groups SVM and C did not reveal statistical differences ($p>0.05$). **Conclusions:** LBEC was able to detect pre-clinical alterations in the buccal mucosa. **Clinical relevance:** CVM patients are more vulnerable to infections in intensive care units. Consequently, dental care may play a valuable role to the prognosis of these patients.

Keywords: Cytopathology – Buccal mucosa – Liquid-base exfoliative cytology – Mechanical ventilation – Intensive care unit – Endotracheal intubation.

Introduction

An emerging interest concerning the oral treatment of patients admitted in intensive care units (ICU) is observed in the scientific literature of the last decades. This trend is mostly supported by the fact that the oral environment hosts several microbiological pathogens, which potentially influence secondary infections [1-5]. In this context, endotracheal intubation plays an important part due to the associated risk for pneumonia, also known as ventilator-associated pneumonia [3, 4].

Despite differences among scientific researches, the outcomes converge indicating a correlation between the decreased incidence of respiratory infections and the routine oral care in ICU patients [4, 6, 7-10]. Specifically, dental surveys infer about relevant alterations in the oral cavity of ICU patients, such as lesions in the oral mucosa, periodontal disease [11], lip and mucosal dryness, fungal infections [12], and increased biofilm on dental surfaces [13, 14]. These alterations may be associated with several variables in the routine of ICU, such as the use of specific drugs, reducing the salivary flow and consequently worsening the oral health [2, 9, 12]. Additionally, patients under mechanical ventilation are necessarily positioned with open mouth [12], lacking masticatory function, also contributing to the reduction of salivary flow and determining mucosal dryness. Other variables increasing the risk for secondary infections comprise the difficult access to the oral cavity and the level of sedation in which most of these patients are found, making them unresponsive and uncooperative [15, 16] and more vulnerable over the time [17, 18].

Currently, the medical literature highlights the need for developing scientific researches approaching the oral diagnosis in ICU patients and their real needs regarding the oral care [2, 3, 11, 12, 14]. In specific, most of the studies developed lately are founded on subjective clinical criteria, becoming highly dependent of the observer [2, 8, 11]. From the scope of clinical relevance, the studies on ICU patients must be designed to guide the professionals in face of the patients' needs [9, 14]. Based on that, risk factors associated with ICU patients must be identified prior to the development of treatment strategies [9, 18].

Considering that: 1) LBEC is a non-invasive, painless, low-cost and quick procedure [19, 20]; 2) the hypothesis that cell alterations may be early detected in cytopathological analysis [21]; 3) the oral mucosa plays an important part during

the immune response [22]; the present research was developed to investigate the oral profile of ICU patients treated with and without mechanical ventilation.

Material and Methods

Ethical aspects

The present study was performed after approval of the Committee of Ethics in Research (CEP) of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil, under the protocol number: 570.988/2014. All the eligible patients were asked to read and sign an informed consent in order to participate in the research.

Population and study sample

From March to November 2014, Eighty-three patients, paired by age and gender, were selected from the local ICU and the local dental clinic. The sample was divided into three groups:

- CVM group: consisted of 27 patients, with mean age of 64.7 years (standard deviation: 12.2 years), admitted at the ICU under mechanical ventilation.
- SVM group: consisted of 29 patients, with age of 64.1 years (standard deviation: 10.9 years), admitted at the ICU without mechanical ventilation.
- C group: consisted of 27 healthy patients (not presenting clinically visible oral lesions; not presenting smoking and alcohol drinking habits; not reporting previous mechanical ventilation in the last three months) with mean age of 66.4 years (standard deviation: 12.1 years).

The inclusion criteria consisted of selecting patients aged above 18 years old, admitted at the ICU staying for a period between 7 and 14 days.

HIV positive patients were not considered eligible for sampling, as well as patients under head and neck chemo- and radiotherapy and patients referred from other hospitals.

Clinical exam

Information related to the patient's age, gender and cause of ICU admission were collected from the medical files. All the patients were examined after a clinical protocol including lip hydration with moistened sterile gauze and removal of biofilm and food debris. The collection of cells was performed by a single trained examiner, during the intraoral exam, using a portable yellow light flashlight.

Cell collection

The procedure for the collection of cells was performed pressing a cytology brush ten times in clock-work circle movements, both on the right and left buccal mucosa [23] of each patient.

In both CVM and SVM groups, the period from 7 to 14 days of intubation was considered. In general, after 14 days, the patients were referred for tracheotomy. Specifically in CVM group, the collection of cells was performed within the maximum time interval of 48 hours after tracheotomy. The collection of cells of group C was performed in patients treated at the dental clinics of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

After brushing the surface of the buccal mucosa, the active portion of the cytology brush was removed and submerged in a specimen collection vial (10mL), which is part of the LBEC kit Liqui-PREP™ Cytology Processing® (LGM International®, FL, USA). The cell sample was stored under ambient temperature awaiting laboratorial steps.

Laboratorial steps

The biological material was processed in glass slides at the Laboratory of Cytology, School of Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil, according to the standards described by the manufacturer. The cell were fixed using 95% alcohol during 10 minutes; hydrated with tap water during 3 minutes; and stained with Papanicolaou (Newprov® LTDA, PR, Brazil). Cover slips were sealed applying two drops of Entellan® (Merck®, Darmstadt, Germany) varnish.

Cytologic analysis

The glass slides were coded, masking the identification data. A specialist in cytology analyzed the cell using a planocromatic binocular microscope (Nikon[®], Tokyo, Japan). Zig-zag motion was adopted in upward-downward direction. The analysis aimed to detect the potential presence of alterations, such as inflammatory leukocyte and signs of local repair.

Statistical analysis

The sample pairing significance was tested applying Kolmogorov-Smirnov test and ANOVA for the variable “age”, while Chi-square test and likelihood ratio were applied for “gender”.

Cytopathological outcomes were analyzed using the tables and graphs of cross frequency, comparing groups CVM, SVM and C. Further on, Kruskal-Wallis, non-parametric test, was applied. In case of differences detected using Kruskal-Wallis, Dunn’s test for multiple comparisons was performed.

All the tests adopted statistical significance level of 5%.

Results

Statistical tests for sample pairing indicated that the patients were properly matched by age ($p=0.766$) and gender ($p=0.840$).

Eighty-three glass slides were analyzed. Intermediate cells were predominant among the three groups. Cytopathological alteration were registered and classified as follows, in ascending order of severity:

- 0 – Absent;
- 1 – Rare (+): the prevalence of the detected alteration ranges up to <25% considering the cells in a glass slide;
- 2 – Discrete (++) : the prevalence of the detected alteration ranges between 25%-50% considering the cells in a glass slide.
- 3 – Moderate (+++) : the prevalence of the detected alteration ranges between 50%-75% considering the cells in a glass slide.
- 4 – Severe (++++): the prevalence of the detected alteration ranges between 75%-100% considering the cells in a glass slide.

Significantly statistical differences ($p < 0.05$) between the groups are reported in Table 1.

Table 1 – Comparison of results from groups CVM, SVM and C.

Alteration	Classification	CVM		SVM		C	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Karyomegaly	Absent	8a	(29.6)	20b	(69.0)	24b	(88.9)
	Rare	12a	(44.4)	8a, b	(27.6)	3b	(11.1)
	Discrete	7a	(25.9)	1b	(3.4)	0b	(0.0)
Mean ¹		0.96		0.34		0.11	
Perinuclear halo	Absent	9a	(33.3)	24b	(82.8)	26b	(96.3)
	Rare	8a	(29.6)	3a, b	(10.3)	1b	(3.7)
	Discrete	6a	(22.2)	2a, b	(6.9)	0b	(0.0)
	Moderate	4a	(14.8)	0b	(0.0)	0b	(0.0)
Mean ¹		1.19		0.24		0.04	
Keratinization	Absent	14a	(51.9)	23b	(79.3)	26b	(96.3)
	Rare	11a	(40.7)	6a, b	(20.7)	1b	(3.7)
	Discrete	2a	(7.4)	0a	(0.0)	0a	(0.0)
Mean ¹		0.56		0.21		0.04	
Leukocyte infiltrate	Absent	1a	(3.7)	10b	(34.5)	11b	(40.7)
	Rare	18a	(66.7)	15a	(51.7)	13a	(48.1)
	Discrete	5a	(18.5)	2a	(6.9)	2a	(7.4)
	Moderate	0a	(0.0)	0a	(0.0)	1a	(3.7)
	Severe	3a	(11.1)	2a	(6.9)	0a	(0.0)
Mean ¹		1.48		0.93		0.74	
Deep cells	Absent	17a	(63.0)	28b	(96.6)	26b	(96.3)
	Rare	7a	(25.9)	1b	(3.4)	1b	(3.7)
	Discrete	2a	(7.4)	0a	(0.0)	0a	(0.0)
	Severe	1a	(3.7)	0a	(0.0)	0a	(0.0)
Mean ¹		0.56		0.03		0.04	

(1) Kruskal Wallis test. (a, b) Dunn's test: equal letters indicate no statistical difference between the groups ($p > 0.05$).

A general overview indicates that karyomegaly was the most prevalent alteration in group CVM ($p = 0.000$). Groups SVM and C did not reveal differences when compared ($p > 0.05$). Perinuclear halos were detected in 66.7% of the specimens in groups CVM, revealing major prevalence with evident statistical significance ($p = 0.000$). The same alteration was also found in groups SVM (17.2%) and C (3.7%). However, no statistical difference was found comparing

both groups ($p>0.05$). Keratinization was observed in 48.1% of the specimens in group CVM with statistical significance ($p=0.000$) if compared to the groups SVM (20.7%) and C (3.7%), which did not revealed statistical difference between each other ($p>0.05$). Leukocyte infiltration were reported after the analysis of 96.3% of the specimens in group CVM ($p=0.003$). Again, groups SVM and C did not differ when compared ($p>0.05$), presenting 68.5% and 59.2% of leukocyte infiltration, respectively. In specific, the morphology of leukocytes was mainly polymorph nuclear neutrophils in both three groups. Deep cells occurred in 37% of the specimens in group CVM ($p=0.000$), while in groups SVM and C this alteration reached 3.4% and 3.7%, respectively, without statistical difference ($p>0.05$).

Discussion

In the present study a high prevalence of karyomegaly was observed in group CVM. Accordingly, the medical literature [24] indicates that this alteration is commonly found in inflammatory processes, mostly involving young cells with intense proliferative activity. This condition may be associated with mucosal dryness and potential alterations within the salivary flow, which consequently culminate hampering the immune response in CVM patients.

This panorama becomes even worse when combined with the high expression of cell keratinization in CVM patients. Considering the epithelium of the buccal mucosa as non-keratinized, is possible to infer that keratinization is an important alteration. This alteration may occur as an adaptive response of the cell in face of environmental pathogens [22], represented as an acceleration process towards the maturation. Additionally, the literature previously reported higher association between keratinization and enlarged cell nuclei [25], which was confirmed in the present study as a secondary finding. Moreover, keratinization may be associated with ageing process [26]. However, independent of pairing the sample by age, the distribution of keratinization was asymmetric, revealing higher prevalence in CVM patients. It is justified by the aggressive conditions in which CVM patients are found, becoming more susceptible to local and systemic pathogens and disorders.

Despite not finding data related to the cytopathological condition of the oral mucosa in patients exposed to endotracheal ventilation, the close association

between karyomegaly, perinuclear halos and cell keratinization point out a matter of relevance, once these alterations are typical of inflammatory process [22, 26].

The presence of leukocyte infiltration with predominant polymorph nuclear neutrophils in CVM patients highlighted the constant presence of local pathogens.

Further on, lesions on the buccal mucosa explain the positive findings for the detection of deep cells in CVM patients, which are constantly injured by the endotracheal intubation. Oppositely, only two CVM patients expressed oral ulcers during clinical exams. On the other hand, deep cells are hardly found in healthy tissues, corroborating to the fact that LBEC is an accurate and useful method for the evaluation and early detection of alterations that precede clinical manifestations in the oral mucosa [27].

Conclusion

The present outcomes confirm the deterioration of the oral health in CVM patients, which present major prevalence and severity of cell alterations. These findings highlight the important role of dentists supporting the medical care in ICU. In addition, professionals of the health sciences must be aware to the fact that LBEC detects pre-clinical alterations, predicting and reducing further associated risks, such as secondary infections and even systemic disorders. Consequently, the quality of life of patients treated under intensive care is considerably improved.

Similar studies are encouraged to enhance the LBEC methodology, potentially pointing specific markers for the buccal mucosa and developing research/clinical protocols for the application of LBEC and treatment of CVM patients, respectively.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

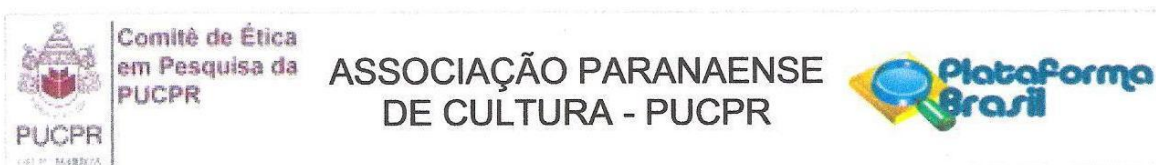
1. Azarpazhooh A, Leak JL (2006) Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol* 77:1465-1482. doi:10.1902/jop.2006.060010
2. Berry AM, Davidson PM, Masters J, Rolls K (2007) Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. *American Journal of Critical Care* 16(6):552-562.
3. Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gil SR, Scannapieco FA (2008) Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis* 47(12):1562-1570. doi: 10.1086/593193
4. Garcia R, Jendresky L, Colbert L, Bailey A, Zaman M, Majumder M (2009) Reducing ventilator-associated pneumonia through advanced oral-dental care: a 48-month study. *American Journal of Critical Care* 18(6):523-532. doi: 10.4037/ajcc2009311
5. Scannapieco FA (2013) The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections. *Clin Microbiol New* 35(20):163-169.
6. Bergmans DCJJ, Bonten MJM, Gaillard CA, Paling JC, Geest SVD, Tiel FHV, *et al.* (2001) Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 164(3):382-388.
7. Koeman M, Van der Ven AJAM, Hak E, Joore HCA, Kaasjager K, Smet AGAD, *et al.* (2006) Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1348-1355. doi: 10.1164/rccm.200505-8200c
8. Shi Z, Wang P, Zhang Q, Wu Y, Chen E, Worthington HV, *et al.* (2013) Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia (Review). *The Cochrane Collaboration* 8:1-125.
9. Prendergast V, Kleiman C, King M (2013) The bedside oral exam and the barrow oral care protocol: translating evidence-based oral care into practice. *Intensive Critical Care Nursing* 29:282-290. doi: 10.1016/j.iccn.2013.04.001

10. Pèrez-Granda MJ, Barrio JM, Muñoz P, Hortal J, Rincón C, Bouza E (2014) Impact of four sequential measures on the prevention of ventilator-associated pneumonia in cardiac surgery patients. *Critical Care* 18:1-8.
11. Terezakis E, Needleman I, Kumar N, Moles D, Agudo E (2011) The impact of hospitalization on oral health: a systematic review. *J Clin Periodontol* 38(7):628-636. Doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01727.x
12. Jones H (2005) Oral care in intensive care units: a literature review. *Spec Care Dentist* 25(1):6-11.
13. Jones DJ, Munro CL, Grap MJ (2011) Natural history of dental plaque accumulation in mechanically ventilated adults: a descriptive correlational study. *Intensive Crit Care Nurs* 27(6):299-304. doi: 10.1016/j.iccn.2011.08.005
14. Needleman I, Ryun-Hyu J, Brealey D, Sachdev M, Moskal-Fitzpatrick D, Bercades G, *et al.* (2012) The impact of hospitalization on dental plaque accumulation: an observational study. *J Clin Periodontol* 39:1011-1016. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01939.x
15. Ames NJ, Sulima P, Yates JM, McCullag L, Gollins SL, Soeken K *et al.* (2011) Effects of systematic oral care in critically ill patients: a multicenter study. *American Journal of Critical Care* 20(5):103-114.
16. Dale C, Angus FE, Sinuff T, Mykhalovskiy (2012) Mouth care for orally intubated patients: a critical ethnographic review of the nursing literature. *Intensive Crit Care Nurs* 1-9.
17. Hsu SP, Liao CS, Li CY, Chiou AF. The effects of different oral care protocols on mucosal change in orally intubated patients from an intensive care unit. *Journal of Clinical Nursing* 20:1044-53. doi: 10.1111/j.1365-2702.2010.03515.x
18. Yildiz M, Durna Z, Akin S (2013) Assessment of oral care needs of patients treated at the intensive care unit. *Journal of Clinical Nursing* 22:2734-2747. doi: 10.1111/jocn.12035
19. Mehrotra R (2011) The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvements. *Diagnostic Cytopathology* 40(1):73-83. doi: 10.1002/dc.21581
20. Dolens ES, Nakai FVD, Parizi JLS, Nai GA (2013) Cytopathology: a useful technique for diagnosing oral lesions? A systematic literature review. *Diagnostic Cytopathology* 41:505-514. doi: 10.1002/dc.22875

21. Braz-Silva PH, Magalhães MHCG, Hofman V, Ortega KL, Ilie MI, Odin G, *et al.* (2010) Usefulness of oral cytopathology in the diagnosis of infectious diseases. *Cytopathology*. 21:285-299. doi: 10.1111/j.1365-2303.2010.00770.x
22. Nanci A (2012) Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. Mosby, FL.
23. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E *et al.* (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4(6): 825-837. doi: 10.1038/nprot.2009.53
24. Kazanowska K, Halón A, Radwan-Oczko M (2014) The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology: contemporary knowledge with review of the literature. *Adv Clin Exp Med* 23 (2):299-305.
25. Hashemipour MA, Aghababaei M, Mirshekari TR, Shekaari MA, Tahmasbi-Arashlow M, Tahasbi Arashlow F, *et al.* (2013) Exfoliative cytology of oral mucosa among smokers, opium addicts and non-smokers: a cytomorphometric study. *Archives of Iranian Medicine* 16(12):725-730.
26. Moraes M, Arantes SB, Vianna LM, Guerra ENS, Melo NS (2010) Virtual database of exfoliative cytology in mouth injuries. *Oral Sci* 2:17-22.
27. Arruda, EP. Trevilatto PC, Camargo ES, Woyceichoski IEC, Machado MAN, Vieira I, Lima AAS (2011) Preclinical alterations of oral epithelial cells in contact with orthodontics appliances. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Repub* 155(3):299-304. doi: 10.5507/bp.2011.043

ANEXO

Parecer de comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS CLÍNICOS E CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA BUCAL DE ADULTOS COM E SEM VENTILAÇÃO MECÂNICA EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA

Pesquisador: Ana Carolina Machado Landgraf

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26116214.7.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 570.988

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

O estudo proposto tem como objetivo analisar os aspectos clínicos e citopatológicos da mucosa bucal de pacientes internados em UTI, com e sem ventilação mecânica, comparando-os entre si e a um grupo controle.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar os aspectos clínicos e citopatológicos da mucosa bucal de pacientes internados em UTI, com e sem ventilação mecânica, comparando-os entre si e ao grupo controle.

Objetivo Secundário:

- Classificar os pacientes dos grupos de estudo e controle de acordo com o padrão da mucosa bucal.
- Analisar o epitélio bucal dos grupos de estudo e controle por meio da técnica de citologia esfoliativa.
- Relacionar os achados clínicos e citopatológicos dos grupos experimentais, relacionando-os entre si e ao grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por tratar-se de pesquisa observacional, não existem riscos inerentes ao desenvolvimento do estudo, no tocante a intervenções no paciente, pois os procedimentos a serem realizados não são invasivos e costumam ser bem tolerados pelos pacientes em geral. Os produtos utilizados na

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 570.988

boca dos pacientes serão água destilada, gaze e microescova estéreis e não há relatos na literatura de reações adversas com o uso dos mesmos. Todos os procedimentos serão realizados conforme o fluxo de normas e rotinas do hospital ISCMC, em especial quanto ao controle de infecções em UTI's, o que será realizado com o uso de materiais de consumo descartáveis e frequente lavagem e desinfecção das mãos do pesquisador. Todas as informações sobre os procedimentos que serão realizados, bem como as possibilidades reais de detecção de doenças no ato do exame físico e citopatológico serão apresentadas ao paciente, em linguagem clara e objetiva e sob a condição de o paciente ou o seu responsável ter a opção de manifestar livremente a vontade de participar da pesquisa e ainda, desistir da participação a qualquer momento. A despeito da notícia de uma alteração patológica na boca poder representar algo não esperado e não desejado pelo paciente, o diagnóstico precoce de possíveis doenças contribui muito para o adequado tratamento em tempo hábil, melhorando o prognóstico e prevenindo possíveis infecções e complicações sistêmicas associadas.

Benefícios: Durante todas as fases da pesquisa os pacientes serão acompanhados por cirurgiões-dentistas e médicos da equipe do corpo clínico do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia (ISCM), em Curitiba, Paraná, que farão o tratamento e acompanhamento necessários em caso de doenças detectadas. O exame físico extra e intra bucal realizado pelo pesquisador, aliados a colheita de material da mucosa bucal por meio da citologia esfoliativa, constituem métodos de detecção precoce de alterações inflamatórias, infecciosas e neoplásicas possibilitando uma abordagem odontológica integral. Para o caso de detecção de situações de risco e de doenças pelo pesquisador, será possível ofertar o tratamento eficaz ao paciente, contribuindo para a manutenção de seu bem estar e prevenção de possíveis complicações sistêmicas. A oferta de exame clínico e cuidados a serem desenvolvidos por cirurgião dentista, sem dúvida, contribuirá para a eleição de condutas adequadas e personalizadas para cada paciente, no tocante aos cuidados em saúde bucal ofertados pelas UTI's. De maneira indireta mas não menos importante, os resultados da pesquisa podem indicar novos caminhos no tocante ao desenvolvimento de protocolos de conduta em saúde bucal e na gestão de cuidados ofertados em ambientes de UTI's, melhorando o conforto e a segurança dos pacientes, otimizando recursos e prevenindo infecções hospitalares, contribuindo para a redução do período de internação desses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa relevante; metodologicamente adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: claro, objetivo, preserva o sujeito de pesquisa.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 570.988

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

CURITIBA, 27 de Março de 2014

Assinador por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido A

PARA MAIORES DE 18 ANOS PLENAMENTE CAPAZES DE
MANIFESTAREM O SEU CONSENTIMENTO:

Eu, _____
nacionalidade: _____ anos, estado civil: _____
profissão: _____, RG: _____
endereço: _____

Estou sendo convidado a participar de um estudo denominado. “Aspectos clínicos e citopatológicos da mucosa bucal de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva com e sem ventilação mecânica”, cujos objetivos são: a) realizar o exame da boca desses pacientes pelo cirurgião dentista b) coletar material da boca desses pacientes para realizar exames de laboratório c) comparar se existem diferenças entre os pacientes das UTI e os pacientes da Clínica de Odontologia da PUCPR, que não estão internados.

Alguns estudos apontam que existem alterações na boca de pacientes internados em UTI e por isso o pesquisador espera compreender essas possíveis alterações para que seja possível o desenvolvimento de formas de prevenção e de tratamento e com isso, melhorar os cuidados prestados, em especial para aqueles que necessitam de respiração artificial (com a ajuda de aparelhos).

A minha participação nesse estudo será permitindo que o pesquisador, que é um cirurgião-dentista, realize o exame clínico odontológico e colete material da mucosa da minha boca.

O pesquisador utilizará uma espátula de madeira para afastar as minhas bochechas e lábios, uma lanterna com luz branca para iluminar dentro da minha boca e ainda, uma escova muito pequena e macia que será friccionada em minhas bochechas.

Estou ciente de que esses procedimentos são rápidos, não provocam dor e não necessitam de anestesia. Depois de coletar material das bochechas com a escova, ele será analisado em laboratório e o resultado desse exame poderá apontar alterações de células da mucosa da minha boca.

Fui alertado de que, a partir desse estudo, eu poderei esperar alguns benefícios tais como: ser acompanhado pelo pesquisador, que estará monitorando a minha condição de saúde bucal.

Na possibilidade de qualquer manifestação de doenças na minha boca, detectadas no exame clínico realizado pelo pesquisador ou no exame de laboratório, eu serei acompanhado e tratado por ele, pela equipe de Odontologia da PUCPR e médica do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, caso necessário.

Além disso, estarei contribuindo para o progresso da ciência e principalmente, para a melhoria dos cuidados que os pacientes de UTI precisam receber, para o bem estar, conforto e segurança desses pacientes.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários de que os

procedimentos não provocam dor ou risco de dano dentro da minha boca ou fora dela, uma vez que para a limpeza da boca antes da coleta de material o pesquisador utilizará somente uma gaze embebida com água tratada. Levando-se em conta que é uma pesquisa, os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, minhas fotos ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que poderei recusar a minha participação no estudo, bem como poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que eu venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são a cirurgiã-dentista e aluna de mestrado Ana Carolina Machado Landgraf (telefone: 41- 9914 8351), sob a orientação do professor doutor e cirurgião-dentista Paulo Henrique de Souza Castro (telefone: 41- 9945 9885), ambos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/PR e com eles poderei manter contato nesses telefones.

É assegurada a minha assistência durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, concordo em participar da referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre esta pesquisa devo ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da PUCPR (41) 3271-2292 ou enviar um e-mail para nep@pucpr.br.

De igual maneira, caso ocorra qualquer dano decorrente da participação no estudo, este será reparado, conforme determina a lei.

Curitiba, de de 2014.

Assinatura do participante da pesquisa

Dra. Ana Carolina Machado Landgraf

Dr. Paulo Henrique Couto Souza

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido B

PARA MAIORES DE 18 ANOS, SEM CONDIÇÕES DE MANIFESTAREM
O SEU CONSENTIMENTO

nacionalidade: _____, _____ anos, estado civil: _____
profissão: _____ RG: _____
endereço: _____
_____.

neste ato representado por mim:

nacionalidade: _____, _____ anos, estado civil: _____
profissão: _____, RG: _____
endereço: _____
_____.

Está sendo convidado a participar de um estudo denominado. “Aspectos clínicos e citopatológicos da mucosa bucal de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva com e sem ventilação mecânica”, cujos objetivos são: a) realizar o exame da boca desses pacientes pelo cirurgião dentista b) coletar material da boca desses pacientes para realizar exames de laboratório c) comparar se existem diferenças entre os pacientes das UTI e os pacientes da Clínica de Odontologia da PUCPR, que não estão internados.

Alguns estudos apontam que existem alterações na boca de pacientes internados em UTI e por isso o pesquisador espera compreender essas possíveis alterações para que seja possível o desenvolvimento de formas de prevenção e de tratamento e com isso, melhorar os cuidados prestados, em especial para aqueles que necessitam de respiração artificial (com a ajuda de aparelhos).

A participação do meu representado no referido estudo será no sentido de permitir que o pesquisador, que é um cirurgião-dentista, realize o exame clínico odontológico e colete material da sua boca.

O pesquisador utilizará uma espátula de madeira para afastar as suas bochechas e lábios, uma lanterna com luz branca para iluminar dentro da sua boca e ainda, uma escova muito pequena e macia que será esfregada em suas bochechas.

Estou ciente de que esses procedimentos são rápidos, não provocam dor e não necessitam de anestesia. Depois de coletar material das suas bochechas com a escova, ele será analisado em laboratório. O resultado desse exame de laboratório poderá apontar alterações de células da mucosa bucal do meu representado.

Fui alertado de que, a partir desse estudo, será possível esperar alguns benefícios para o meu representado, tais como: ser acompanhado pelo pesquisador e pela equipe de Odontologia da PUC/PR que atende no hospital e que estará monitorando a sua condição de saúde bucal.

Na possibilidade de qualquer manifestação de doenças na sua boca, detectadas no exame clínico realizado pelo pesquisador ou no exame de laboratório, meu representado será acompanhado e tratado pela equipe de Odontologia da PUCPR e médica do Hospital Irmandade da Santa Casa de

Misericórdia de Curitiba, caso necessário.

Além disso, meu representado estará contribuindo para o progresso da ciência e principalmente, para a melhoria dos cuidados que os pacientes de UTI precisam receber, para o bem estar, conforto e segurança desses pacientes.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários de que os procedimentos não provocam dor ou risco de dano dentro da boca do meu representado ou fora dela, uma vez que para a limpeza da boca antes da coleta de material o pesquisador utilizará somente uma gaze embebida em água tratada. Levando-se em conta que é uma pesquisa, os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que a sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome, suas fotos ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, identificá-lo (a) será mantido em sigilo.

Também fui informado de que pode haver recusa à participação no estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que meu representado vem recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são a cirurgiã-dentista e mestrande Ana Carolina Machado Landgraf (telefone: 41- 9914 8351), sob a orientação do professor e cirurgião-dentista Paulo Henrique de Souza Castro (telefone: 41- 9945 9885), ambos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e com eles poderei manter contato nesses telefones.

É assegurada a assistência do meu representado durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação do meu representado

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, autorizo a participação de

na referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre esta pesquisa devo ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da PUC/PR (41) 3271 2292 ou enviar um e-mail para nep@pucpr.br.

De igual maneira, caso ocorra qualquer dano decorrente da participação no estudo, este será reparado, conforme determina a lei.

Curitiba, de de 2014.

Ass.representante legal – RG:

Juntar documento que comprove parentesco/tutela/curatela se for o caso

Dra.Ana Carolina Machado Landgraf

Dr.Paulo Henrique Couto Souza

Análise estatística

Idade

Teste Kolmogorov-Smirnov: comparação entre os grupos para a variável idade

		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estatística	df	Sig.
Idade	CVM	0,122370	27	0,200000
	SVM	0,120033	29	0,200000
	C	0,101555	27	0,200000

(a) Lilliefors Significance Correction

Apesar dos grupos em VM e Controle não apresentarem distribuição normal, média e mediana são praticamente iguais, indicando a **distribuição simétrica**, portanto, recomenda-se a aplicação do teste paramétrico **ANOVA**.

Dados descritivos: comparação entre os grupos para a variável idade

						Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
		N	Média	Median	Desvio padrão	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior	
Idade	CVM	27	64,78	63,00	12,21	2,35	59,95	69,61	44,00 94,00
	SVM	29	64,17	64,00	10,90	2,02	60,03	68,32	45,00 90,00
	C	27	66,41	65,00	12,18	2,34	61,59	71,23	43,00 97,00

Test of Homogeneity of Variances: idade

Idade	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	0,113	2	80	0,8935

ANOVA: comparação entre os grupos para a variável idade

		Soma Quadrados	dos df	Quadrado Médio	F	Sig.	Potência observada ^b
Idade	Entre Grupos	73,906	2	36,953	0,267	0,76612	0,090840
	Nos grupos	11059,323	80	138,242			
	Total	11133,229	82				

(b) Computado usando alfa = 0,05

Sexo

Tabulação cruzada: comparação entre os grupos para a variável sexo

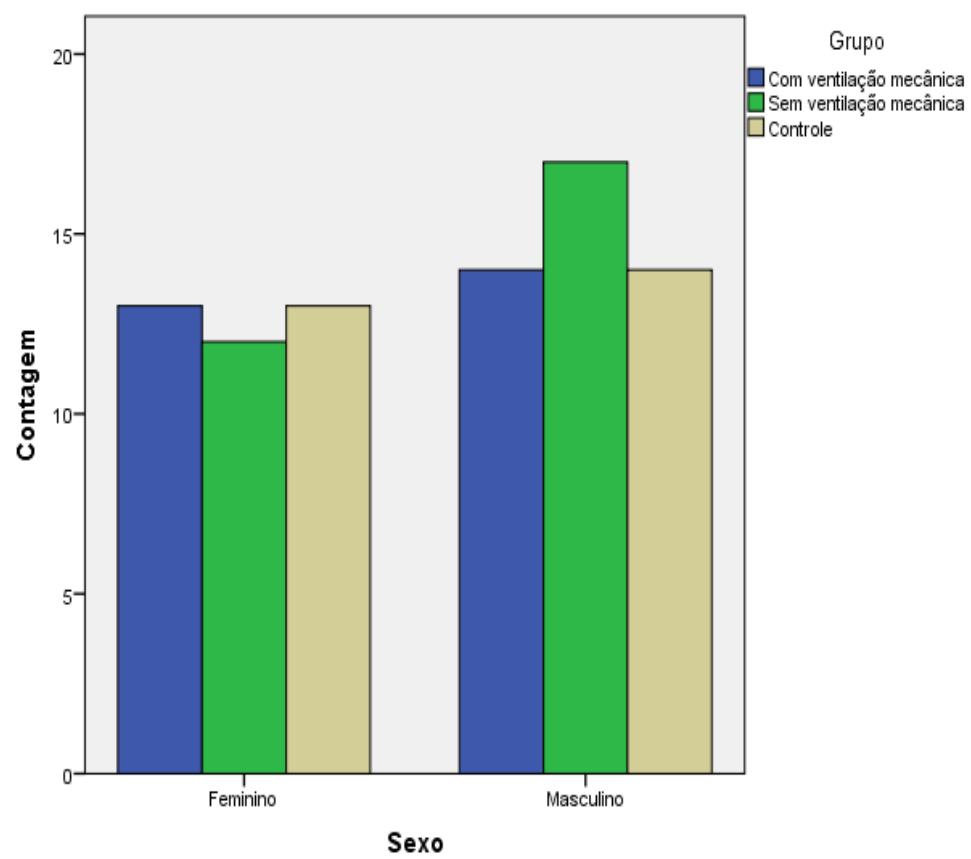
		Grupo				
			CVM	SVM	C	Total
Sexo	Feminino	Contagem	13 _a	12 _a	13 _a	38
		Expected Count	12,4	13,3	12,4	38,0
		% dentro de Grupo	48,1%	41,4%	48,1%	45,8%
	Masculino	Contagem	14 _a	17 _a	14 _a	45
		Expected Count	14,6	15,7	14,6	45,0
		% dentro de Grupo	51,9%	58,6%	51,9%	54,2%
Total	Contagem	27	29	27	83	
	Expected Count	27,0	29,0	27,0	83,0	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

(a,b) Cada letra inscrita denota um subconjunto de categorias de grupo: grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

Testes de qui-quadrado: variável sexo

	Valor	df	Valor p
Qui-quadrado de Pearson	0,348 ^a	2	0,840
Razão de verossimilhança	0,349	2	0,840
N de Casos Válidos	83		

(a) Células (0,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 12,36



Kruskall-Wallis: classificação média de cada grupo.

Grupo		N	Mean Rank
Cariomegalia	CVM	27	56,91
	SVM	29	38,67
	C	27	30,67
	Total	83	
Haloperinuclear	CVM	27	58,26
	SVM	29	36,81
	C	27	31,31
	Total	83	
Queratinização	CVM	27	52,24
	SVM	29	40,38
	C	27	33,50
	Total	83	
Células profundas	CVM	27	51,48
	SVM	29	37,38
	C	27	37,48
	Total	83	
Infiltrado leucocitário	CVM	27	53,28
	SVM	29	38,12
	C	27	34,89
	Total	83	

Kruskall-Wallis Test^a

	Cariomegalia	Haloperinuclear	Queratinização	Células profundas	Infiltrado leucocitário
Qui-quadrado	23,017	29,732	15,134	16,610	11,129
df	2	2	2	2	2
Valor p	0,0000	0,0000	0,0005	0,0002	0,0038

(a) Variável de agrupamento: grupo

Kruskall-Wallis: dados descritivos

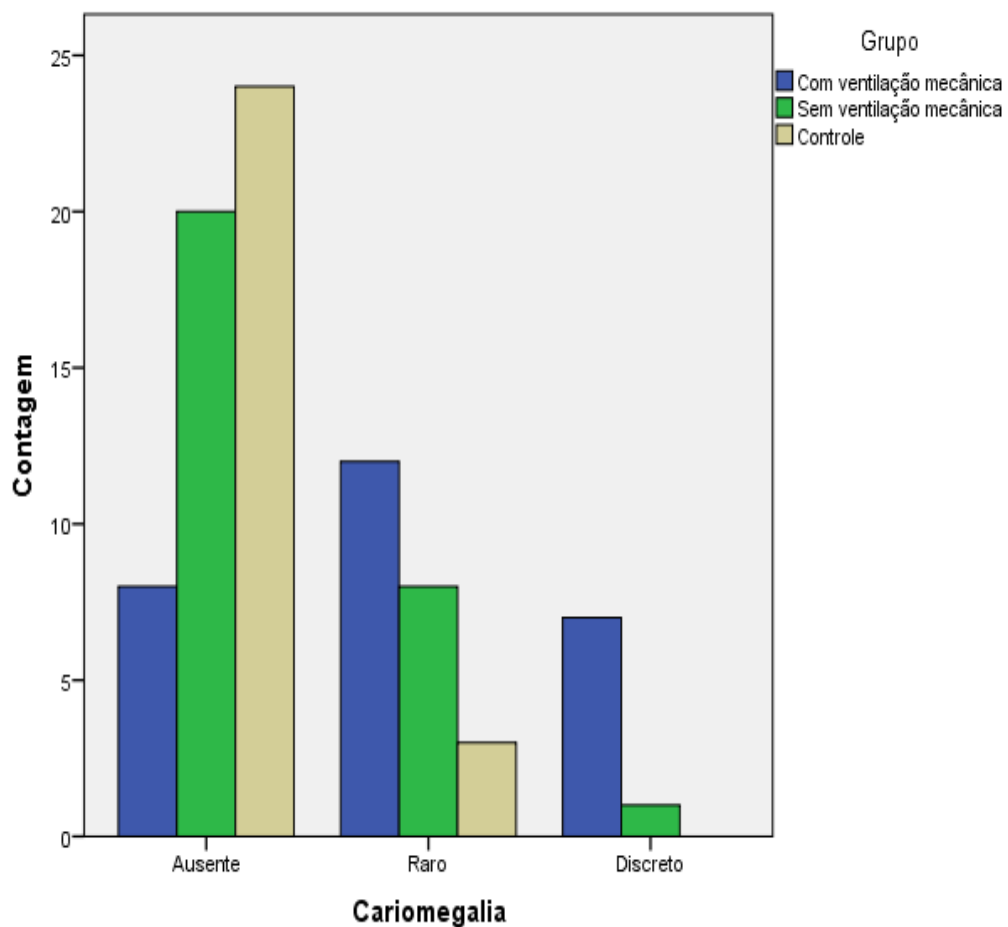
Variável	Grupo	N	Média	Median	Desvio padrão	Erro padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
							Limite inferior	Limite superior		
Cariomegalia	CVM	27	0,96	1,00	0,76	0,15	0,66	1,26	0	2
	SVM	29	0,34	0,00	0,55	0,10	0,13	0,56	0	2
	C	27	0,11	0,00	0,32	0,06	-0,02	0,24	0	1
Haloperinuclear	CVM	27	1,19	1,00	1,08	0,21	0,76	1,61	0	3
	SVM	29	0,24	0,00	0,58	0,11	0,02	0,46	0	2
	C	27	0,04	0,00	0,19	0,04	-0,04	0,11	0	1
Queratinização	CVM	27	0,56	0,00	0,64	0,12	0,30	0,81	0	2
	SVM	29	0,21	0,00	0,41	0,08	0,05	0,36	0	1
	C	27	0,04	0,00	0,19	0,04	-0,04	0,11	0	1
Células profundas	CVM	27	0,56	0,00	0,93	0,18	0,19	0,92	0	4
	SVM	29	0,03	0,00	0,19	0,03	-0,04	0,11	0	1
	C	27	0,04	0,00	0,19	0,04	-0,04	0,11	0	1
Infiltrado leucocitário	CVM	27	1,48	1,00	1,01	0,20	1,08	1,88	0	4
	SVM	29	0,93	1,00	1,03	0,19	0,54	1,32	0	4
	C	27	0,74	1,00	0,76	0,15	0,44	1,04	0	3

Cariomegalia

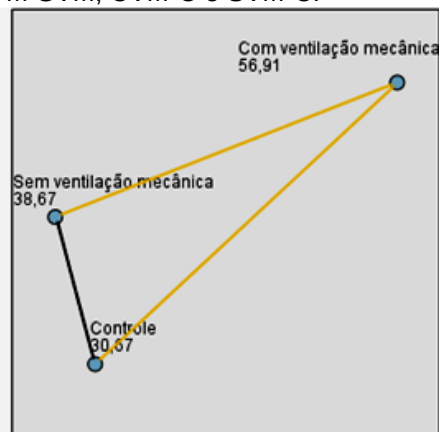
Tabulação cruzada: comparação dos resultados para cariomegalia entre os grupos CVM, SVM e C.

			Grupo			
			CVM	SVM	C	Total
Cariomegalia	Ausente	Contagem	8 _a	20 _b	24 _b	52
		% dentro de Grupo	29,6%	69,0%	88,9%	62,7%
	Raro	Contagem	12 _a	8 _{a, b}	3 _b	23
		% dentro de Grupo	44,4%	27,6%	11,1%	27,7%
	Discreto	Contagem	7 _a	1 _b	0 _b	8
		% dentro de Grupo	25,9%	3,4%	0,0%	9,6%
Total		Contagem	27	29	27	83
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

(a,b) Cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo. Grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).



Teste de Dunn: comparação dos resultados para cariomegalia entre os pares de grupos CVM-SVM, CVM-C e SVM-C.



Cada nó apresenta a classificação média de amostra do grupo, obtida no Teste de Kruskal Wallis.

Amostra1-Amostra2	Estatística de Teste	Erro Padrão	Estatística de Teste Padrão	Sig.	Sig. Aj.
Controle-Sem ventilação mecânica	8,006	5,515	1,452	,147	,440
Controle-Com ventilação mecânica	26,241	5,613	4,675	,000	,000
Sem ventilação mecânica-Com ventilação mecânica	18,235	5,515	3,306	,001	,003

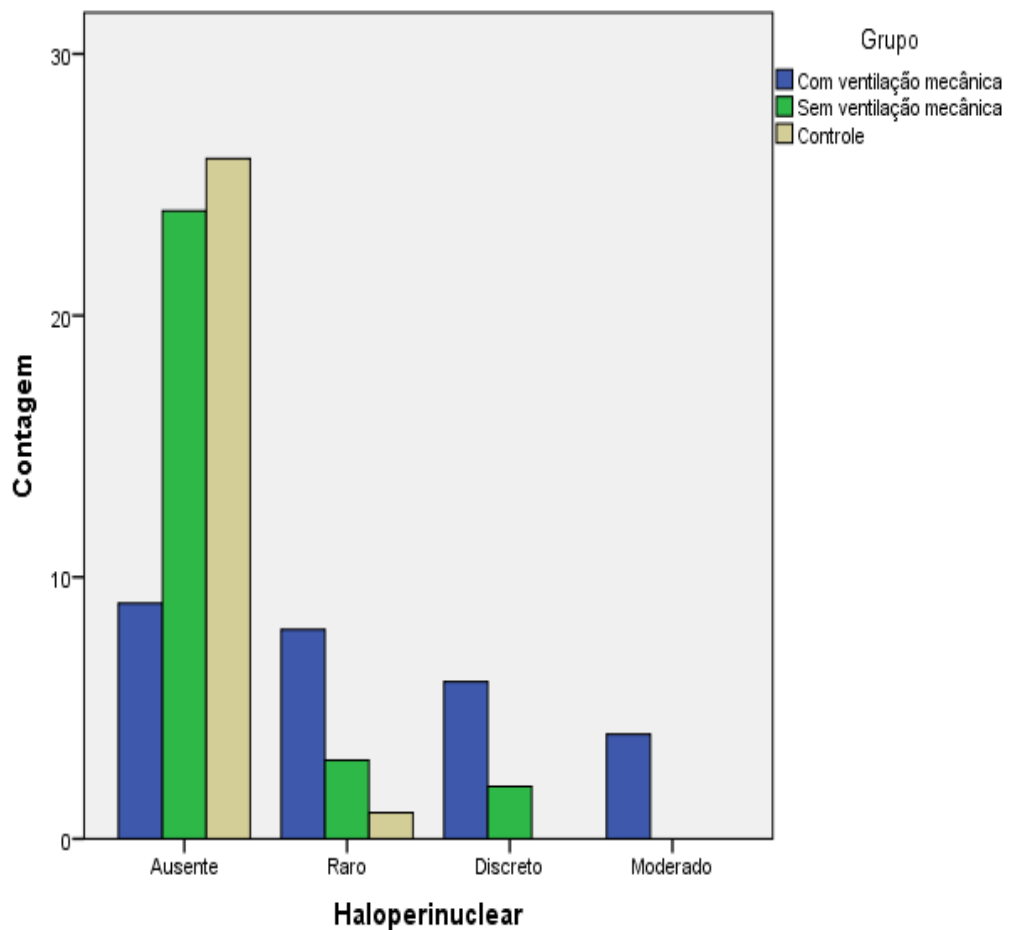
Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições de amostra 1 e amostra 2 são a mesma. Significâncias assintóticas são exibidas ($p < 0,05$). O gráfico apresenta a distribuição espacial de grupos a partir da Classificação Média. A linha preta do gráfico demonstra grupos que não diferiram entre si e as linhas amarelas representam as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pares de grupo, resultando em uma distribuição espacial, onde linhas são unidas por nós.

Halos perinucleares

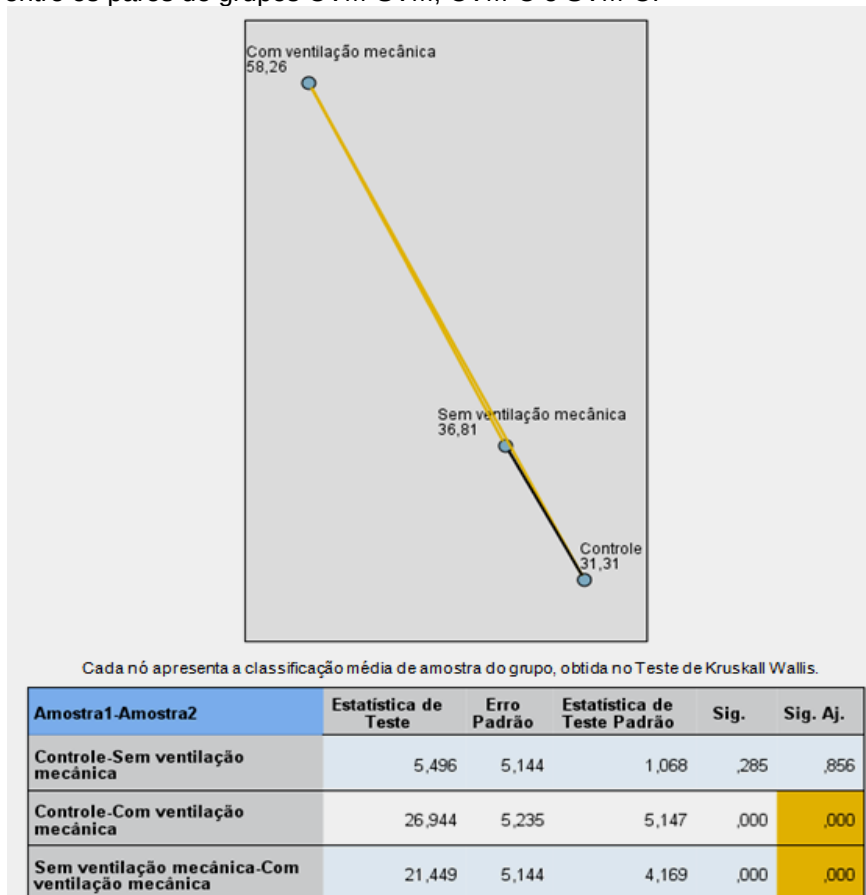
Tabulação cruzada: comparação dos resultados para halos perinucleares entre os grupos CVM, SVM e C.

			Grupo			
			CVM	SVM	C	Total
Haloperinuclear	Ausente	Contagem	9 _a	24 _b	26 _b	59
		% dentro de Grupo	33,3%	82,8%	96,3%	71,1%
	Raro	Contagem	8 _a	3 _{a, b}	1 _b	12
		% dentro de Grupo	29,6%	10,3%	3,7%	14,5%
	Discreto	Contagem	6 _a	2 _{a, b}	0 _b	8
		% dentro de Grupo	22,2%	6,9%	0,0%	9,6%
	Moderado	Contagem	4 _a	0 _b	0 _b	4
		% dentro de Grupo	14,8%	0,0%	0,0%	4,8%
Total	Contagem	27	29	27	83	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

(a,b) Cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo. Grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).



Teste de Dunn: comparação dos resultados para halos perinucleares entre os pares de grupos CVM-SVM, CVM-C e SVM-C.



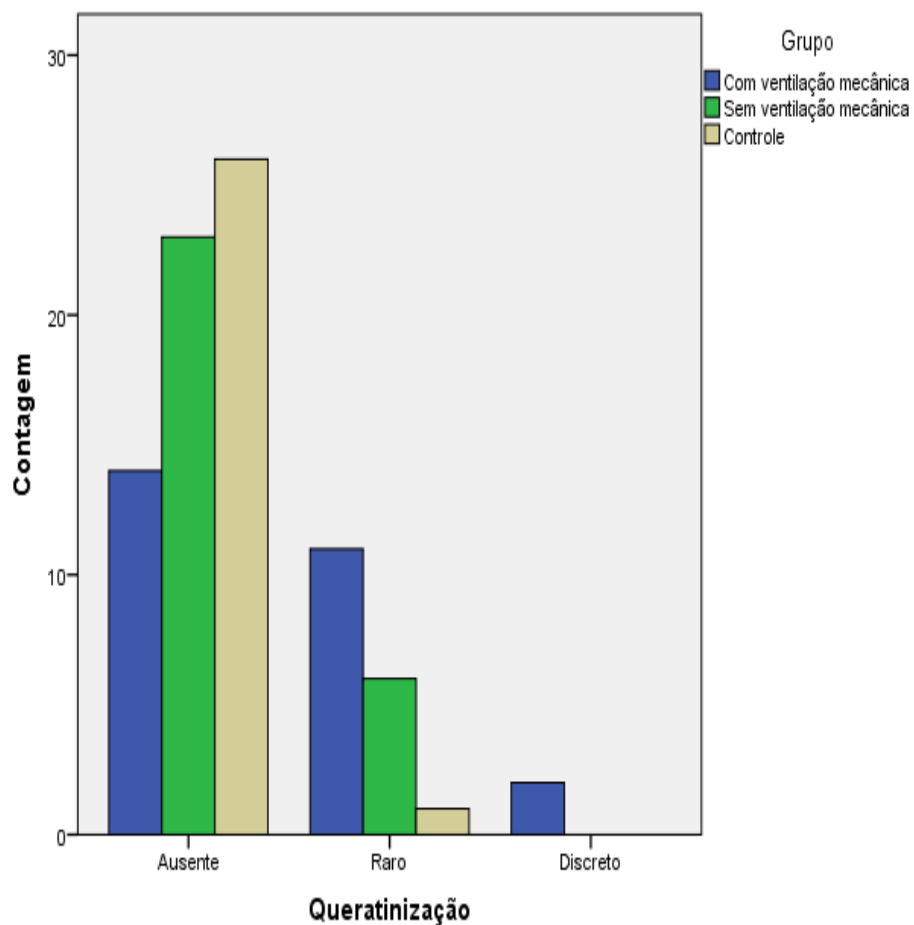
Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições de amostra 1 e amostra 2 são a mesma. Significâncias assintóticas são exibidas ($p < 0,05$). O gráfico apresenta a distribuição espacial de grupos a partir da Classificação Média. A linha preta do gráfico demonstra grupos que não diferiram entre si e as linhas amarelas representam as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pares de grupo, resultando em uma distribuição espacial, onde linhas são unidas por nós.

Queratinização celular

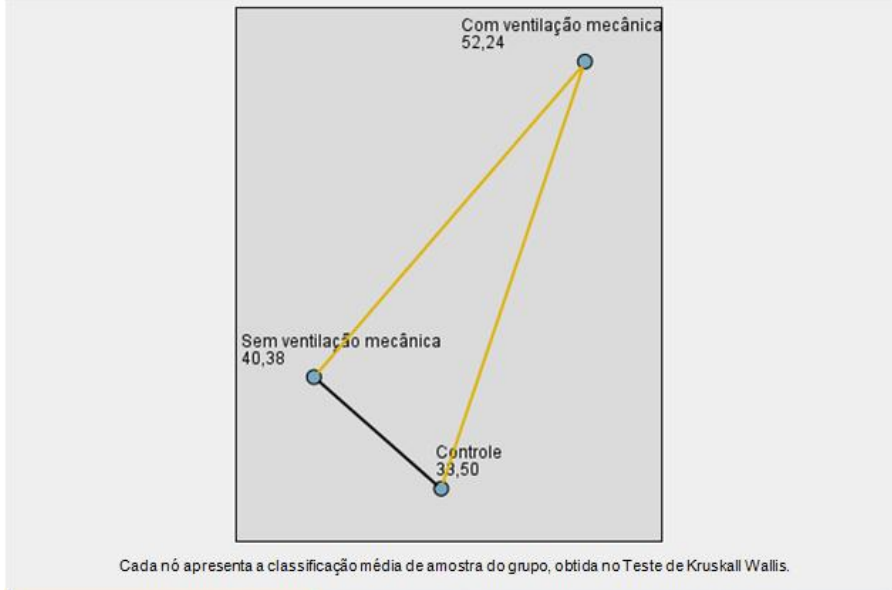
Tabulação cruzada: comparação dos resultados para queratinização celular entre os grupos CVM, SVM e C.

			Grupo			
			CVM	SVM	C	Total
Queratinização	Ausente	Contagem	14 _a	23 _b	26 _b	63
		% dentro de Grupo	51,9%	79,3%	96,3%	75,9%
	Raro	Contagem	11 _a	6 _{a, b}	1 _b	18
		% dentro de Grupo	40,7%	20,7%	3,7%	21,7%
	Discreto	Contagem	2 _a	0 _a	0 _a	2
		% dentro de Grupo	7,4%	0,0%	0,0%	2,4%
Total	Contagem		27	29	27	83
	% dentro de Grupo		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

(a,b) Cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo. Grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).



Teste de Dunn: comparação dos resultados para queratinização celular entre os pares de grupos CVM-SVM, CVM-C e SVM-C.



Amostra1-Amostra2	Estatística de Teste	Erro Padrão	Estatística de Teste Padrão	Sig.	Sig. Aj.
Controle-Sem ventilação mecânica	6,879	4,792	1,436	,151	,453
Controle-Com ventilação mecânica	18,741	4,877	3,843	,000	,000
Sem ventilação mecânica-Com ventilação mecânica	11,861	4,792	2,475	,013	,040

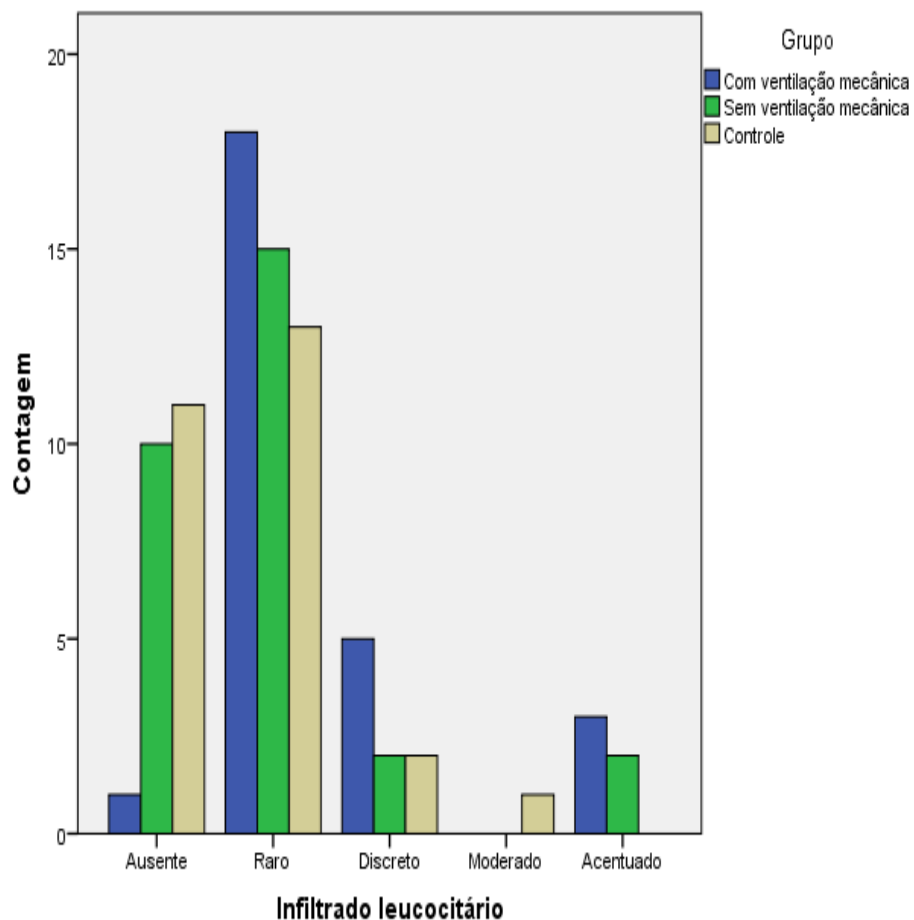
Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições de amostra 1 e amostra 2 são a mesma. Significâncias assintóticas são exibidas ($p < 0,05$). O gráfico apresenta a distribuição espacial de grupos a partir da classificação média. A linha preta do gráfico demonstra grupos que não diferiram entre si e as linhas amarelas representam as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pares de grupo, resultando em uma distribuição espacial, onde linhas são unidas por nós.

Infiltrado leucocitário

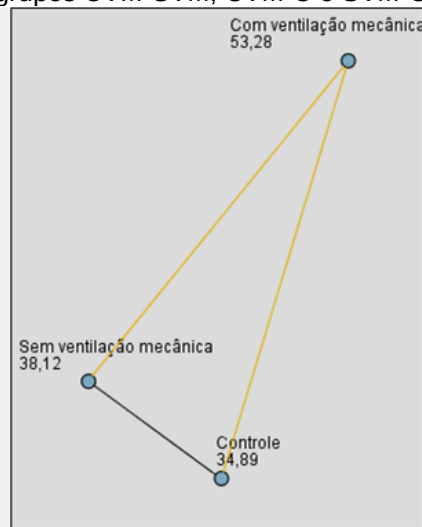
Tabulação cruzada: comparação dos resultados para infiltrado leucocitário entre os grupos CVM, SVM e C

			Grupo			
			CVM	SVM	C	Total
Infiltrado leucocitário	Ausente	Contagem	1 _a	10 _b	11 _b	22
		% dentro de Grupo	3,7%	34,5%	40,7%	26,5%
	Raro	Contagem	18 _a	15 _a	13 _a	46
		% dentro de Grupo	66,7%	51,7%	48,1%	55,4%
	Discreto	Contagem	5 _a	2 _a	2 _a	9
		% dentro de Grupo	18,5%	6,9%	7,4%	10,8%
	Moderado	Contagem	0 _a	0 _a	1 _a	1
		% dentro de Grupo	0,0%	0,0%	3,7%	1,2%
	Acentuado	Contagem	3 _a	2 _a	0 _a	5
		% dentro de Grupo	11,1%	6,9%	0,0%	6,0%
Total		Contagem	27	29	27	83
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

(a,b) Cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo. Grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).



Teste de Dunn: comparação dos resultados para infiltrado leucocitário entre os pares de grupos CVM-SVM, CVM-C e SVM-C.



Cada nó apresenta a classificação média de amostra do grupo, obtida no Teste de Kruskal Wallis.

Amostra1-Amostra2	Estatística de Teste	Erro Padrão	Estatística de Teste Padrão	Sig.	Sig. Aj.
Controle-Sem ventilação mecânica	3,232	5,801	,557	,577	1,000
Controle-Com ventilação mecânica	18,389	5,903	3,115	,002	,006
Sem ventilação mecânica-Com ventilação mecânica	15,157	5,801	2,613	,009	,027

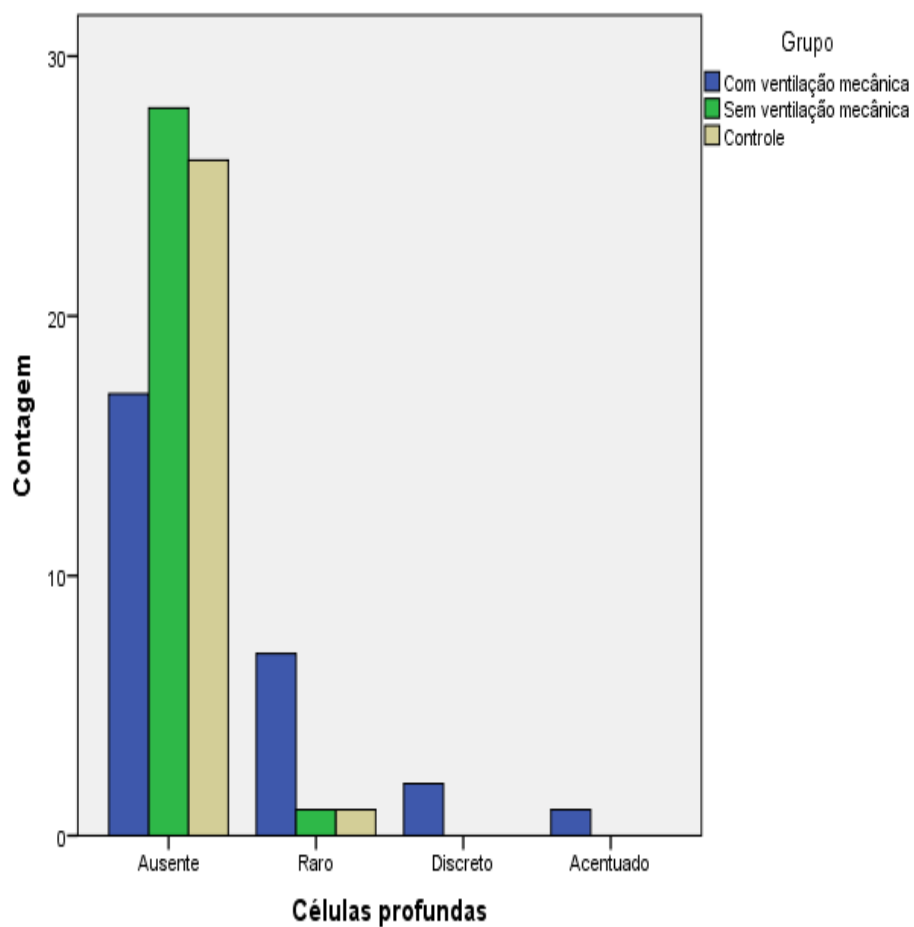
Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições de amostra 1 e amostra 2 são a mesma. Significâncias assintóticas são exibidas ($p < 0,05$). O gráfico apresenta a distribuição espacial de grupos a partir da classificação média. A linha preta do gráfico demonstra grupos que não diferiram entre si e as linhas amarelas representam as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pares de grupo, resultando em uma distribuição espacial, onde linhas são unidas por nós.

Células profundas

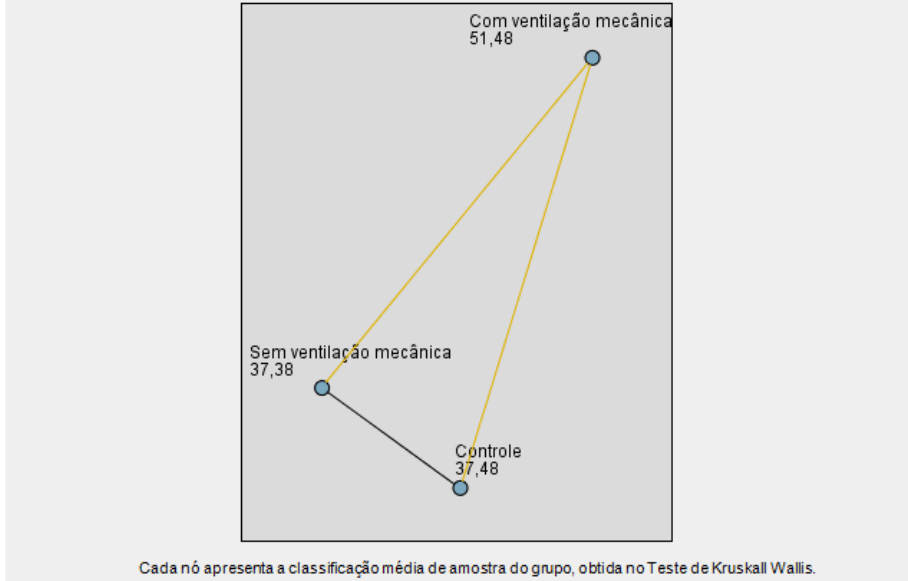
Tabulação cruzada: comparação dos resultados para células profundas entre os grupos CVM, SVM e C.

			Grupo			
			CVM	SVM	C	Total
Células profundas	Ausente	Contagem	17 _a	28 _b	26 _b	71
		% dentro de Grupo	63,0%	96,6%	96,3%	85,5%
	Raro	Contagem	7 _a	1 _b	1 _b	9
		% dentro de Grupo	25,9%	3,4%	3,7%	10,8%
	Discreto	Contagem	2 _a	0 _a	0 _a	2
		% dentro de Grupo	7,4%	0,0%	0,0%	2,4%
	Acentuado	Contagem	1 _a	0 _a	0 _a	1
		% dentro de Grupo	3,7%	0,0%	0,0%	1,2%
Total	Contagem	27	29	27	83	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

(a,b) Cada letra denota um subconjunto de categorias de grupo. Grupos com a mesma letra apresentaram proporções que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).



Teste de Dunn: comparação dos resultados para células profundas entre os pares de grupos CVM-SVM, CVM-C e SVM-C.



Amostra1-Amostra2	Estatística de Teste	Erro Padrão	Estatística de Teste Padrão	Sig.	Sig. Aj.
Sem ventilação mecânica-Controle	-,102	3,936	-,026	,979	1,000
Sem ventilação mecânica-Com ventilação mecânica	14,102	3,936	3,583	,000	,001
Controle-Com ventilação mecânica	14,000	4,006	3,495	,000	,001

Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições de amostra 1 e amostra 2 são a mesma. Significâncias assintóticas são exibidas ($p < 0,05$). O gráfico apresenta a distribuição espacial de grupos a partir da classificação média. A linha preta do gráfico demonstra grupos que não diferiram entre si e as linhas amarelas representam as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pares de grupo, resultando em uma distribuição espacial, onde linhas são unidas por nós.

Normas para publicação



Clinical Oral Investigations

Editor-in-Chief: Gottfried **Schmalz**

ISSN: 1432-6981 (print version)

ISSN: 1436-3771 (electronic version)

Journal no. 784

RECOMMEND TO LIBRARIAN

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

- Original articles
- Invited reviews
- Short communications
- Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

EDITORIAL PROCEDURE

If you have any questions please contact:

Prof. Dr. G. Schmalz

University of Regensburg

Department of Conservative Dentistry and Periodontology

Franz-Josef-Strauß-Allee 11

93053 Regensburg

Germany

e-mail: gottfried.schmalz@klinik.uni-regensburg.de

Tel.: +49 941 9446024,

Fax: +49 941 9446025

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Further Useful Information

please follow the link below

- [Further Useful Information](#)

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

- [Springer Author Academy](#)

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Objectives (stating the main purposes and research question)
- Materials and Methods
- Results
- Conclusions
- Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

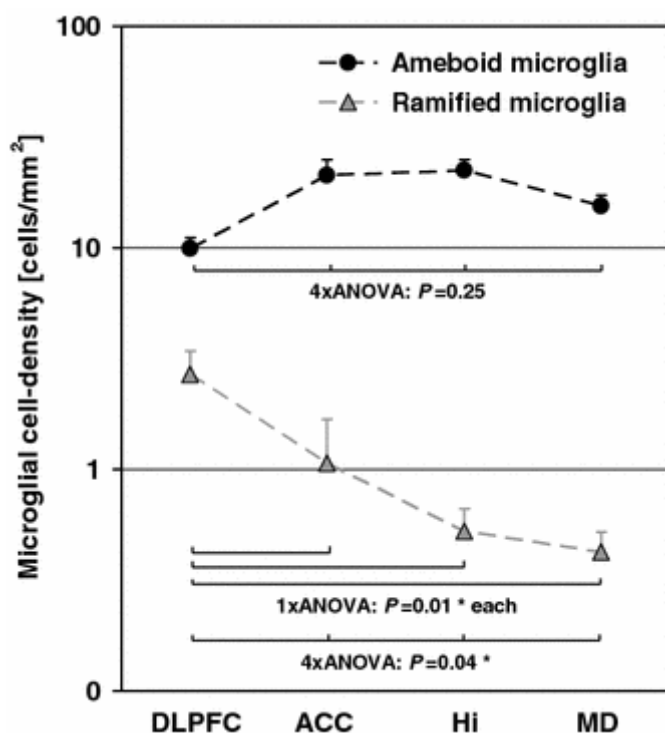
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



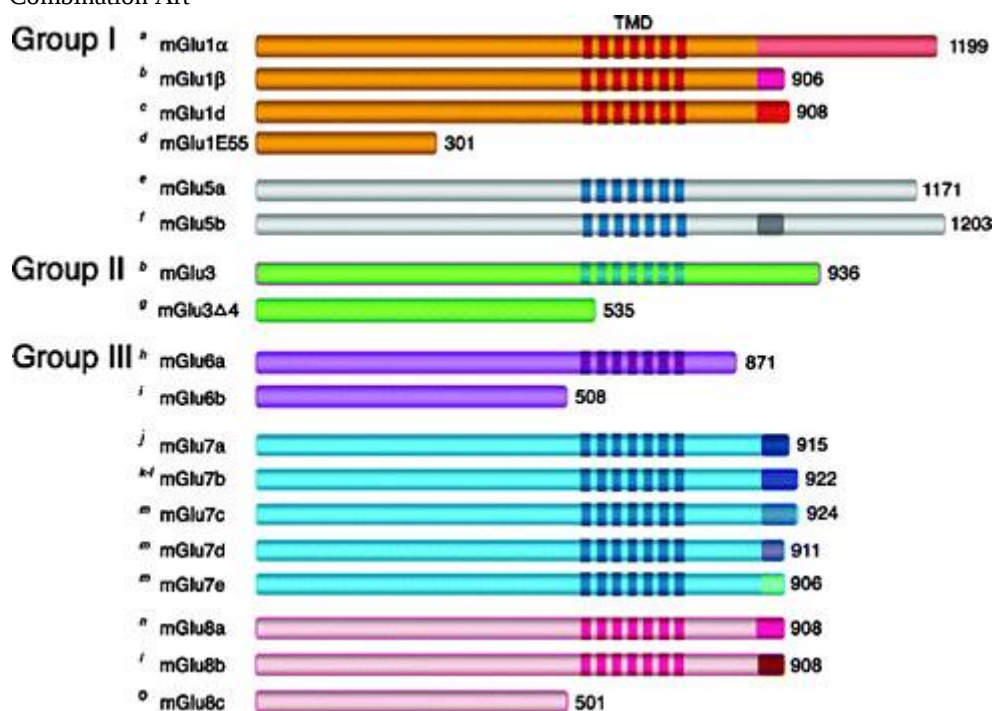
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have full control of all primary data and that they agree to allow the journal to review their data if requested.

Therefore the manuscript must be accompanied by the “Conflict of Interest Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

The manuscript must also be accompanied by the “Authorship & Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダンズグループジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- [Edanz Editing Global](#)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author’s institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” before the References when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript.

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z. If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.