

A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA E O ENVELHECIMENTO: ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS

ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME AND AGING: STUDY OF SPLENIC ALTERATIONS

ALINE CRISTINA SOUZA DA SILVA¹, MARIA LUIZA GONÇALVES REIS MONTEIRO², VICENTE DE PAULA ANTUNES TEIXEIRA³, CAMILA LOURENCINI CAVELLANI^{4*}

1. Biomédica e Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2. Médica Patologista e Professora do Departamento de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia; 3. Professor e Doutor em Patologia, Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 4. Biomédica e Doutora em Patologia, Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

* Rua Getúlio Guaritá, 159, bairro Abadia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. CEP: 38025-440. camila.cavellani@uftm.edu.br

Recebido em 07/06/2019. Aceito para publicação em 05/07/2019

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações esplênicas ocorridas na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) e no envelhecimento. Foram selecionados 13 idosos com Aids (ICA), 16 não idosos com Aids (NICA) e 13 idosos sem Aids (ISA) autopsiados entre 1997 e 2016. O peso, a densidade dos folículos linfoides, a área de arteríolas foliculares e a quantidade de fibras colágenas e elásticas no parênquima esplênico foram analisadas. As informações relacionadas ao peso corporal e ao Índice de Massa Corpórea (IMC) foram obtidas dos laudos de autópsia. O grupo NICA apresentou significativamente maior peso esplênico quando comparado aos outros dois grupos. O grupo ISA apresentou menor densidade folicular em relação aos grupos ICA e NICA, porém, sem diferença significativa. Em relação à área das arteríolas centro foliculares, o grupo ICA apresentou menor valor quando comparado aos demais grupos, no entanto, sem diferença estatística. O grupo ICA apresentou uma redução significativa do percentual de fibras colágenas e elásticas quando comparado ao grupo ISA. Conclui-se que a Aids e a senescência cursam com alterações esplênicas importantes. O envelhecimento influencia de forma predominante no peso esplênico, enquanto a infecção pelo HIV é capaz de causar modificações importantes nas fibras que compõe a matriz extracelular.

PALAVRAS-CHAVE: Aids, envelhecimento, autópsia, baço, colágeno.

ABSTRACT

The objective study was evaluate splenic alterations occurring in Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and aging. Were selected 13 elderly (ICA) and 16 non-elderly with AIDS (NICA), and 13 elderly without AIDS (ISA) autopsied between 1997-2016. Splenic material was analyzed for weight, lymphoid follicle density, follicular arteriole area and amount of collagen and elastic fibers in parenchyma. Information related to body weight and body mass index (BMI) were found in autopsy protocols. NICA presented significantly greater spleen weight compared to two other groups. Regarding follicular arteriole area, ICA presented lower values compared to other two groups, but without significant difference. ISA group had lower follicular density compared with ICA and NICA, but without

significant difference. ICA group presented statistically lower percentage of collagen and elastic fibers when compared to ISA group. It was conclude AIDS and senescence cause structural and functional changes in the spleen. Aging predominantly influences splenic weight, while HIV infection may cause important modifications in extracellular matrix fibers.

KEYWORDS: AIDS, aging, autopsy, spleen, collagen.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) foi reconhecida pela primeira vez em 1981 nos Estados Unidos e, desde então, tornou-se um grande problema de saúde pública mundial¹. Segundo levantamentos epidemiológicos, a doença vem aumentando nos últimos anos na população idosa^{2,3}. Esse dado pode ser explicado por vários fatores, entre eles, o próprio aumento da expectativa de vida, permanecendo os idosos sexualmente ativos e consequentemente, expostos a um maior risco de infecções^{4,5,6}. Por outro lado, a melhora na qualidade de vida, bem como o acesso a terapia antirretroviral (TARV), faz com que indivíduos mais jovens que adquiriram previamente o HIV atinjam a idade avançada, embora muitas vezes sejam diagnosticados com a doença apenas em idade mais tardia⁷.

Durante o envelhecimento, ocorre uma reestruturação do sistema imunológico humano denominada imunossenescência, que é caracterizada por mudanças quantitativas e qualitativas em seus componentes celulares e moleculares. Tais alterações aumentam a suscetibilidade desses indivíduos às infecções, às doenças autoimunes e ao câncer, e reduz a resposta à imunização⁸. Tal deficiência imune, em resposta às alterações fisiológicas induzidas pelo envelhecimento, é mais preocupante em pacientes soropositivos, uma vez que a afinidade do HIV por linfócitos TCD4 facilita a ocorrência de infecções oportunistas, bem como a evolução da doença⁹.

Em órgãos linfoides a progressão da Aids está associada a uma proliferação vascular decorrente da ativação da resposta imune crônica, de mudanças na

composição da matriz extracelular e de redução no número de células linfoides^{10,11,12}. Desta forma, espera-se que a infecção pelo HIV também possa causar alterações esplênicas, sendo essas particularmente relevantes em pacientes idosos, nos quais o sistema imunológico encontra-se fragilizado devido ao próprio envelhecimento.

Portanto, torna-se essencial a melhor compreensão das modificações esplênicas relacionadas à infecção pelo HIV e a senescência, já que o baço se encontra intimamente relacionado com a defesa imunológica do organismo diante da síndrome, bem como sofre alterações com o processo de envelhecimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Triângulo Mineiro (CEP-UFTM), sob protocolo número 2510.

Em um estudo retrospectivo, foram avaliados protocolos de autópsia e registros clínicos de 13 pacientes idosos com Aids (ICA), 16 não idosos com Aids (NICA) e 13 idosos sem Aids (ISA) autopsiados por patologistas da Disciplina de Patologia Geral da UFTM no período de 1997 a 2016. Os pacientes sem a síndrome com 60 anos ou mais foram considerados idosos, enquanto os pertencentes ao cenário HIV/Aids foram considerados idosos quando apresentavam idade igual ou superior a 50 anos¹³.

Informações relacionadas à idade, à cor, ao sexo, ao IMC e ao peso do baço foram coletados dos registros de autópsia. Além da análise do peso absoluto, o peso do baço dos pacientes em estudo foi corrigido pelo peso corporal, através da relação peso esplênico/peso corporal.

Em pacientes idosos, a subnutrição foi definida quando o IMC estava abaixo de 22 kg/m² e o sobrepeso quando o IMC era igual ou superior a 27 kg/m². Para os pacientes não idosos, os valores de IMC entre 18,5 e 25 kg/m² foram considerados normais¹⁴.

Após a análise macroscópica, fragmentos esplênicos que já se encontravam fixados em formaldeído 10%, foram submetidos ao processamento histológico de rotina. As colorações Hematoxilina e Eosina (HE), Picrosirius (PS) e Verhoeff (VE) foram realizadas para análise histoquímica.

A coloração HE foi utilizada para determinação da densidade de folículos linfoides e da área das arteríolas centro foliculares. Para análise da densidade folicular, todos os folículos linfoides foram contados através de um microscópio de luz comum e objetiva de 5x (ampliação final de 200x). Os folículos localizados na borda da seção que não puderam ser inteiramente visualizados foram excluídos da contagem. Com auxílio de uma régua milimetrada, a área das seções foi calculada para obtenção da densidade folicular (número de folículos linfoides/mm²).

A área das arteríolas centro foliculares foi obtida através do software KS-300 Kontron-Zeiss® (Kontron Elektronik, Carl-Zeiss, Alemanha), sendo as lâminas coradas com HE observadas sob objetiva de 20x (ampliação final de 800x). Com auxílio de um cursor, a área do lúmen vascular foi delineada e subtraída da área

das paredes das arteríolas de secção transversal. Foram analisadas apenas as arteríolas centro foliculares intactas em toda a seção histológica.

Para determinar a porcentagem de fibras colágenas e elásticas no parênquima do baço, foram analisadas as lâminas coradas com PS e VE, respectivamente, na objetiva de 40x (ampliação final de 1600x). As lâminas de PS foram avaliadas sob luz polarizada, e a área que compreendia as fibras colágenas foi identificada pela aparência birrefringente e de cor avermelhada. As lâminas coradas com VE foram analisadas com luz comum, sendo a porcentagem de fibras elásticas obtida através da área corada em marrom. A quantificação das fibras da matriz extracelular foi realizada usando o software KS-300 Kontron-Zeiss®. Foram analisados 60 campos por lâmina, sendo o número de campos determinado pelo cálculo da Média Acumulada¹⁵.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigma Stat® 2.03. Em casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, utilizou-se o teste Anova (F). Caso contrário, utilizou-se o Kruskal-Wallis (H). Foram considerados valores estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A média da idade do grupo ICA foi de 57,53 anos, do grupo ISA 69,92 anos e do grupo NICA foi de 34,50 anos. Nos três grupos analisados houve predomínio do sexo masculino e da cor branca. Os valores médios de IMC dos grupos ICA e ISA revelaram um quadro de subnutrição, enquanto no grupo NICA, o valor encontrava-se dentro da normalidade (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis demográficas de pacientes ICA, ISA e NICA autopsiados no período 1997- 2016.

		ICA (n=13)	ISA (n=13)	NICA (n=16)
Idade (anos)	x±dp	57,53±5,68	69,92±5,90	34,50±7,03
Sexo (n,%)	Masculino	10 (77)	12 (92,30)	11 (68,75)
	Feminino	3 (23)	1 (7,70)	5 (31,25)
Cor (n,%)	Branco	11 (84,62)	11 (84,62)	11 (68,75)
	Não Branco	2 (15,38)	2 (15,38)	5 (31,25)
IMC (kg/m ²)	x±dp	20,22±5,13	20,88±26,23	19,05±3,87

Fonte: os Autores

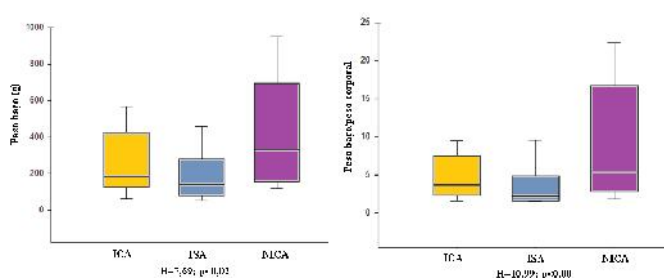


Figura 1. Análise entre o peso esplênico e peso esplênico/peso corporal dos grupos ICA, ISA e NICA autopsiados no período 1997- 2016. **Fonte:** os Autores

O grupo NICA apresentou significativamente maior peso esplênico e maior relação peso do baço/peso corporal que o grupo ISA e ICA, respectivamente (Figura 1A - B). Os pacientes ISA apresentaram menor densidade folicular em relação aos outros grupos analisados, sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). Em relação à área das arteríolas centro foliculares, o grupo ICA apresentou menor valor quando comparado aos outros dois grupos, porém sem diferença significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis morfométricas (densidade folicular e área das arteríolas centro foliculares) dos grupos ICA, ISA e NICA autopsiados no período 1997- 2016.

	Densidade folicular (fóliculos/mm ²) ^I	Área das arteríolas centro foliculares (µm ²) ^{II}
	(Med, Min-Max)	
ICA (n=13)	0,17 (0,03-0,48)	1240,73 (42,65-5109,30)
ISA (n=13)	0,11 (0,04-0,29)	1254,80 (84,22-5412,06)
NICA (n=16)	0,18 (0,04-0,92)	1252,77 (152,95-4586,55)

^IH=2,56, p<0,27; ^{II}H=0,69, p<0,70

Fonte: os Autores

Na análise das fibras da matriz extracelular, o grupo ICA apresentou significativamente menor porcentagem de fibras colágenas e elásticas em comparação com o grupo ISA (Tabela 3, Figura 2A-F).

Tabela 3. Fibras colágenas e elásticas dos grupos ICA, ISA e NICA autopsiados no período 1997- 2016.

	Fibras Colágenas (%)	Fibras Elásticas (%)
	Med (Min-Max)	
ICA (n=13)	0,57 (0,10-13,65) ^I	6,01 (0,16-37,36) ^{II}
ISA (n=13)	0,75 (0,00-9,05) ^I	7,81 (0,09-28,40) ^{II}
NICA (n=16)	0,67 (0,10-10,90)	4,58 (0,12-27,22)

^IH=9,92; p<0,00; ^{II}H=87,43, p<0,00

Fonte: os Autores

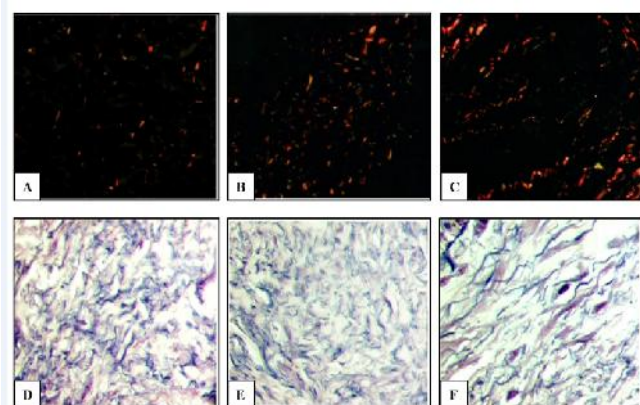


Figura 2. Fibras da matriz extracelular dos grupos ICA, ISA e NICA autopsiados no período 1997- 2016. A) Menor quantidade de fibras colágenas no grupo ICA (PS sob luz polarizada, 1600x); B) Fibras colágenas no grupo ISA (PS sob luz polarizada, 1600x); C) Fibras colágenas no grupo NICA (PS sob luz polarizada, 1600x); D) Menor quantidade de fibras elásticas no grupo ICA (VE, 1600x); E) Fibras elásticas no grupo ISA (VE, 1600x); F) Fibras elásticas no grupo NICA (VE, 1600x). **Fonte:** os Autores

4. DISCUSSÃO

A predominância de homens no grupo com Aids verificada neste estudo está em linha com os dados epidemiológicos dos últimos 38 anos, mostrando que ainda existe um predomínio do sexo masculino na população HIV positiva. No entanto, em relação à cor, no período de 2006 a 2016 foi registrado no Brasil um predomínio de homens não brancos com a doença³, evidenciando uma mudança no perfil da população com HIV/Aids, que era predominantemente constituída por negros.

Em relação ao estado nutricional, pacientes idosos independentemente da síndrome, apresentaram subnutrição, enquanto o grupo de não idosos com a doença estava dentro do intervalo considerado normal. A subnutrição é um dos distúrbios mais comuns em idosos, relacionado principalmente a um maior gasto energético e deficiência de absorção, utilização e transporte de nutrientes, tornando o indivíduo mais susceptível às infecções e aumentando o risco para outras comorbidades¹⁶. Nesse estudo, as alterações metabólicas que ocorrem no processo de envelhecimento influenciaram predominantemente nesse dado e não a infecção viral.

O peso médio do baço dos idosos sem Aids foi menor quando comparado ao dos não idosos com a doença. Ao analisar a relação peso do baço/peso corporal, foi observado que o fator envelhecimento atuou de forma significativa em sua redução. De acordo com a literatura, o peso esplênico de um adulto saudável varia entre 160 e 200g e diminui com o avançar da idade^{17,18}. Dessa forma, nossos dados corroboram com a literatura, uma vez que o fator envelhecimento demonstrou influenciar nesse parâmetro.

O peso esplênico pode ser afetado por diferentes variáveis, como o peso corporal, a altura, os processos patológicos e a reatividade esplênica frente a processos infecciosos, incluindo a infecção pelo HIV^{19,20,21}. O baço abriga cerca de um quarto dos linfócitos do corpo, e essas células representam um importante reservatório para o vírus. No início da infecção ocorre hiperplasia dos centros germinativos, proliferação de células imunes, produção de anticorpos e expansão de folículos linfóides²². No entanto, com a progressão da doença, os folículos linfóides são destruídos, há apagamento completo da arquitetura nodal com ausência de centros germinativos^{23,24}. Portanto, essas alterações provocadas pelo HIV também contribuíram com a redução do peso esplênico verificado no presente estudo, considerando que todos os pacientes HIV positivos incluídos na pesquisa já haviam evoluído para Aids.

Os idosos com Aids apresentaram menor área das arteríolas centro foliculares. Em pacientes com HIV/Aids a ativação crônica do sistema imunológico inicia uma cascata de eventos com maior liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-10) que são capazes de causar maior dano celular através da indução de apoptose das células endoteliais, podendo influenciar, portanto, na área dessas arteríolas^{25,26,27}.

A menor densidade folicular observada entre os idosos sem Aids pode ser justificada pela diminuição dos centros germinativos e desorganização dos folículos linfóides que ocorre no processo de envelhecimento^{17,21}.

Os idosos com Aids apresentaram menor porcentagem de fibras da matriz extracelular quando comparados aos idosos sem a doença, evidenciando uma influência da síndrome na quantidade das fibras colágenas e elásticas. Nossos dados divergem da literatura em que autores sugerem que pacientes com Aids podem apresentar um aumento da neoformação de colágeno em órgãos linfóides^{28,29,30}. No entanto, o HIV infecta não apenas linfócitos TCD4 mas também outras células imunes e fibroblastos, e esses quando infectados podem sofrer apoptose induzida por proteínas virais e dessa forma, ocorre um desequilíbrio entre produção e degradação de fibras colágenas das fibras colágenas^{31,32,33}.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a Aids e a senescência causam mudanças estruturais e funcionais no baço. O envelhecimento influencia de forma predominante no peso esplênico, enquanto a infecção pelo HIV é capaz de causar modificações importantes nas fibras que compõe a matriz extracelular.

6. AGRADECIMENTOS e FINANCIAMENTO

Este estudo foi realizado na Disciplina Patológica Geral da Universidade Federal Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil, com subsídios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU).

REFERÊNCIAS

- [1] Siriluck A, Thavornpitak Y. Burden of human immunodeficiency virus (HIV) infection in hospitalized Thai adults: an analysis of data from the National Health Insurance System. 2010. J Med Assoc Thai 2012; 95(7):143-148.
- [2] Pinto ACS, Pinheiro PNC, Vieira NFC. *et al.* Compreensão da pandemia da AIDS nos últimos 25 anos. DST-J Bras Doenças Sex Transm. 2007; 19(1):45-50.
- [3] Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim epidemiológico HIV, Brasília, Ministério da Saúde. 2016. [Acesso 23 dez. 2018]. Disponível em: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/boletim_2016_1_pdf_16375%20(2).pdf.
- [4] Feitoza AR, Souza AR, Araújo MFM. A magnitude da infecção pelo HIV-AIDS em maiores de 50 anos no município de Fortaleza- CE. DST-J Bras Doenças Sex Transm. 2004; 16(4):32-37.
- [5] Sousa ACA, Suassuna DSB, Costa SML. Perfil clínico-epidemiológico de idosos com AIDS. DST – J Bras Doenças Sex Transm. 2009; 21(1):22-26.
- [6] Maschio MBM, Balbino AP, De Souza PFR. *et al.* Sexualidade na terceira idade: medidas de prevenção para doenças sexualmente transmissíveis e AIDS. Rev Gaucha Enferm. 2011; 32(3):583-589.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica. Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Brasília (DF); 2006. [Acesso 23 dez. 2018]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/envelhecimento_saude_pessoa_idosa.pdf.
- [8] Perez JL, Moore RD. Greater effect of highly active antiretroviral therapy on survival in people aged ≥50 years compared with younger people in an urban observational cohort. Clin Infect Dis. 2003; 36(2):212-218.
- [9] Mota SMQ, Porto DB, Freitas MVC. *et al.* Imunossenescência: alterações imunológicas no idoso. Rev Assoc Med Bras. 2009; 67(6):183-188.
- [10] Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. Annu Rev Immunol. 1995; 13:487-512.
- [11] Paiva DD, Morais JC, Pilotto J. *et al.* Spectrum of morphologic changes of lymph nodes in HIV infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(3):371-379.
- [12] Leng SX, Yang H, Walston JD. Decreased cell proliferation and altered cytokine production in frail older adults. Exp Gerontol. 2004; 16(3):249-252.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1992; 41(RR-17):1-19.
- [14] Brasil. Ministério da Saúde. Avaliação do peso IMC na terceira idade. 2017. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/component/content/article/804-imc/40511-avaliacao-do-peso-imc-na-terceira-idade>. Acesso em: 30 mai. 2019.
- [15] Williams A. Quantitative Methods in Biology. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1977.
- [16] Fiore EG, Vireira VL, Cervato AM. *et al.* Perfil Nutricional de idosos frequentadores de Unidade Básica de Saúde. Rev Ciênc Méd. 2006; 15(5):369-377.
- [17] Sprogøe-Jakobsen S, Sprogøe-Jakobsen U. The weight of the normal spleen. Forensic Sci Int Genet. 1997; 88(3):215-223.
- [18] Inoue T, Otsu S. Statistical analysis of the organ weights in 1,000 autopsy cases of Japanese aged over 60 years. Am J Pathol. 1987; 37(3):343-359.
- [19] Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG. *et al.* Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human 15 lymphoid tissue. Cell. 2010; 143(5):789-801.
- [20] Rocha EV da, Nunes LC, Quites LV. *et al.* Differential diagnosis of hepatosplenomegaly in HIV-positive patients. Rev Med Minas Gerais. 2011; 21(4 Supl 6):S1-S143.
- [21] Metcalf MR. Influence of the spleen and Thymus on Immune responses in ageing mice. Clin Exp Immunol. 1996; 2(1):109-120.
- [22] Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G. *et al.* Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. Am J Pathol. 1992; 140(1):15-22.
- [23] Stein H, Spiegel H, Herbst H. *et al.* Lymphoid tissues and AIDS: role of lymphocytes and follicular dendritic cells (FDC). Verh Dtsch Ges Pathol. 1991; 75:4-19.
- [24] Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 1993; 328(5):327-335.

- [25] Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA. *et al.* Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2007; 356:1723–1735.
- [26] Pace GW, Leaf CD. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19:523–528.
- [27] Triant VA, Meigs JB, Grinspoon SK. Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 51(3):268–273.
- [28] Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ. *et al.* Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2002; 110(8):1133-9.
- [29] Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ. *et al.* Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naïve CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13(5):556-560.
- [30] Estes JD, Wietgreffe S, Shacker T. *et al.* Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor β 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *JID.* 2007; 195(4):551-561.
- [31] Spector DH, Wade E, Wright DA. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Pseudo types with Expanded Cellular and Species Tropism. *J Virol.* 1990; 64(5):298-308.
- [32] Zambruno G, Mori L, Marconi A. *et al.* Detection of HIV-1 in epidermal Langerhans cells of HIV infected patients using the polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(6):979-982.
- [33] Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K. *et al.* Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science.* 1999; 285(5431):1261-1265.