

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

NATALIA KOERICH LAUREANO

**ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E SEU ABANDONO SOBRE A VELOCIDADE DE
PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL:
AVALIAÇÃO LONGITUDINAL**

PORTO ALEGRE

2015

NATALIA KOERICH LAUREANO

**ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E SEU ABANDONO SOBRE A VELOCIDADE DE
PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL:
AVALIAÇÃO LONGITUDINAL**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final à obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Koerich Laureano, Natalia
ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E SEU ABANDONO
SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA
MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL / Natalia
Koerich Laureano. -- 2015.
51 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Citopatologia. 2. AgNOR. 3. Abandono de fumo.
4. Longitudinal. I. Rados, Pantelis Varvaki, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Inicialmente a minha **mãe Cleusa** e meu **pai Julio**, por não terem medidos esforços durante toda sua vida, para que eu chegasse até aqui. Por terem deixado de lado todas as suas escolhas para que pudesse realizar os meus sonhos. Por terem me ensinado sempre o lado correto e justo das coisas.

À minha **irmã Juliana**, por ter sido a minha primeira professora, minha companheira de toda a vida. Que junto dos meus pais construiu o meu caráter e quem eu sou hoje. Minha segunda mãe. Meu exemplo de perseverança, e agora de profissional e mulher.

Às minhas **filhas Elisa, Elsa, Bilica, Magnólia e Hortência**, por seu amor incondicional.

À **Lelê**, por ter sido minha mãe, irmã, terapeuta e orientadora. Meu norte e minha força nesses últimos 2 anos. Por ter me recebido de braços abertos. Por acreditar muito mais em mim do que eu mesma e estar sempre presente.

Ao bicho **Carol**, por me aturar há 16 anos e ser minha família nesse último ano. Por me permitir ser Menezes e Krebs.

Às minhas amigas de Floripa, **Marina, Rafa, Cissa, Maria, Fran, Lauren e Dani** que por mais longe que estejamos, sempre se mostraram presentes nesses últimos 2 anos.

À **Lauren e Ale** por terem se tornado grandes amigas.

À **Fer**, por estar sempre presente, disposta, calma e esclarecedora. Por sempre ajudar e se preocupar. Por sempre acreditar e incentivar. Pelo exemplo de profissional e professora.

À **Bru**, por ter me disponibilizado o trabalho, me ajudando e apoiando durante o percurso.

Aos **“patológicos”**, por se tornar minha família aqui em Porto Alegre e tornar os dias muito mais leves e alegres.

Ao **grupo da Cito**, sempre presente e colaborativo. Tenho muito orgulho de trabalhar com todos.

A **Chris, Alessandra e Pedro** por não medirem esforços para que nossas pesquisas deem certo.

Aos professores **Márcia, Vinícius, Manoela, Marco, Laura, Marcelo, Ana e Lisiane** por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar.

À equipe do Setor de Pneumologia do HCPA por terem possibilitado este trabalho, em especial à Professora **Marli Knust**.

Ao Professor **Manoel Sant'Ana Filho**, pelo exemplo de professor e cientista. Obrigada pelo acolhimento no programa de Pós-Graduação e na Patologia.

Ao **Professor Pantelis Varvaki Rados**, orientador deste trabalho e meu orientador, pelos ensinamentos acadêmicos, pela dedicação e compreensão. Obrigada pelo voto de confiança.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Odontologia da UFRGS, e a CAPES por possibilitarem a realização do meu curso de pós-graduação.

À cidade de Porto Alegre por ter me recebido tão bem.

*"Se vi mais longe
foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."*

J. Newton

5 de fevereiro de 1676

RESUMO

LAUREANO, Natalia Koerich. **Estudo do efeito do tabagismo e seu abandono sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal: avaliação longitudinal.** 2015. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

OBJETIVO: avaliar através da citopatologia, associada a técnica AgNOR, o reflexo da cessação do fumo sobre a velocidade de proliferação das células epiteliais descamadas de borda de língua (BL) e assoalho de boca (AB), ao longo do tempo. **MÉTODOS:** Foram incluídos na amostra inicial 138 indivíduos. As coletas foram realizadas em um momento inicial (T1), após 8-15 meses (T2) e após 16-30 meses (T3). Os participantes foram divididos em três grupos de acordo com os seguintes critérios: Grupo Controle (GC) (n=71): indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, que nunca fumaram, e que ingeriam até 30g de álcool por semana. Grupo Abandono de Fumo (GAF) (n=26): indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que fumavam no momento do início do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico. Alcoolistas ou não. Grupo Fumo (GF) (n=41): indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do HCPA, que fumavam no momento do início do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo da pesquisa. Alcoolistas ou não. As amostras foram submetidas à técnica de AgNOR e quantificadas por três examinadores previamente calibrados. A média de AgNOR por núcleo (mAgNOR) e a porcentagem de células com mais de 1, 2 e 3 AgNORs (pAgNOR>1, pAgNOR>2 e pAgNOR>3) foram calculados nas 50 primeiras células, nucleadas, não sobrepostas, e bem distendidas. **RESULTADOS:** ao final dos tempos experimentais os grupos tinham 9 indivíduos em cada. Não foram observada diferença estatística do mAgNOR e pAgNOR>3 entre os grupos avaliados, nos diferentes tempos em ambos os sítios. Foi observada uma tendência à diminuição na velocidade de proliferação, no tempo intermediário, e uma tendência a aumentar no tempo final, em todos os grupos. Em T1, os grupos expostos ao fumo (GAF e GF) apresentavam velocidade de proliferação mais elevada, se comparados ao GC no BL. No AB o GC apresenta valores maiores que GAF. Em T2, os indivíduos do GAF apresentaram uma redução da taxa de proliferação celular, em ambos os sítios analisados, maior do que GC e GF. Em T3 os valores retornam ao equilíbrio, exibindo valores maiores que os em T1. No BL o pAgNOR>1 e 2 mostrou uma diferença estatística entre os grupos em T1 e T2. O sítio AB apresentou diferença estatística no pAgNOR>1, em T2, mostrando que indivíduos do GC e GAF apresentam velocidade de proliferação menor quando comparados ao GF. **CONCLUSÕES:** O estudo mostrou que o GAF apresenta maior flutuação, de mAgNOR, que o GC e GF, ao longo do tempo. Estudos futuros ampliando o tempo de controle, controlando os agentes carcinógenos, e observando indivíduos com características populacionais seriam convenientes para buscar a padronização deste modelo de prevenção de câncer.

Palavras-chave: AgNOR. Citopatologia. Abandono de fumo. Proliferação celular.

ABSTRACT

LAUREANO, Natalia Koerich. **Estudo Study of the effect of smoking and its abandonment on the speed of proliferation of cells of the oral mucosa: longitudinal evaluation.** 2015. 47f. Thesis (MA) – Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

OBJECTIVE: evaluate, through cytopathology associated with AgNOR technique, the reflection of smoking cessation on the speed of proliferation of desquamated epithelial cells of tongue edge (TE) and mouth floor (MF) over time. **METHODS:** We included in the initial sample 138 individuals. Samples were collected at an early time (T1), after 8-15 months (T2) and after 16-30 months (T3). Participants were divided into three groups, according to the following criteria: control group (CG) (n = 71): patients seen at the Faculty of Dentistry at UFRGS, who had never smoked and who drank till 30g of alcohol a week. Abandonment group Smoke (AS) (n = 26): individuals in monitoring the Group of Smokers of Hospital de clínicas dePorto Alegre (HCPA), who smoked at the time of the initial work, and that over time ceased the smoking habit. Alcoholic or not. Tobacco group (TG) (n = 41): follow-up individuals in the group of smokers HCPA, who smoked at the time of the initial work, and that did not stop the smoking habit during the research. Alcoholic or not. Samples were subjected to AgNOR technique and quantified for three calibrated examiners. The average AgNOR per core (Magnor) and the percentage of cells with 1, 2 and 3 AgNOR (pAgNOR> 1, pAgNOR> 2 and pAgNOR> 3) were calculated on the first 50 cells, nucleated, non-overlapping, and well- distended. **RESULTS:** At the end of the experimental time groups had 9 individuals in each. There were no statistical difference of mAgNOR and pAgNOR> 3 between the groups in different times on both sites. A tendency to decrease in the proliferation rate was observed, at the intermediate time, and a trend of increase in the end time for all groups in T1, the smoke exposed groups (AS and TG) showed higher proliferation rate, compared the CG in the TE. MF in the CG presents values greater than AS. In T2, AS individuals showed a reduction in cell proliferation rate in both sites evaluated greater than TG and CG. In T3 values return to equilibrium, exhibiting values greater than the T1. TE in the pAgNOR> 1 and 2 showed a statistical difference between groups in T1 and T2. The site MF showed statistical difference in pAgNOR> 1, T2, showing that CG and the AS show less proliferation of speed when compared to the TG. **CONCLUSIONS:** The study showed that the AS has greater fluctuation mAgNOR that CG and TG, over time. Future study extending the time control, controlling carcinogens, and observing individuals with population characteristics would be convenient to seek standardization of this cancer prevention model.

Keywords: AgNOR. Cytopathology. Smoke abandonment. Cellular proliferation.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	9
2. OBJETIVOS	22
3. REFERÊNCIAS	23
4. ARTIGO	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA	44
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	45
APÊNDICE C - CARTA DE CHAMAMENTO	47
ANEXO A - PROTOCOLO TÉCNICA DE AgNOR.....	48
ANEXO B - PARECER CONSUBISTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	49

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O câncer de boca é o sétimo tipo de câncer que mais acomete a população brasileira. Foram estimados para o ano de 2014, mais de 15.290 novos casos no Brasil. Destes, 11.280 em homens. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal estão principalmente, o uso do tabaco e a ingestão de álcool. Segundo estudo realizado nas principais capitais do Brasil, o hábito de fumar é maior em homens do que em mulheres sendo Porto Alegre/RS a capital com maior índice de fumantes(1).

Existem outros agentes etiológicos, além do fumo e do álcool, para o desenvolvimento do câncer bucal, dentre os quais destacam-se fatores hormonais, genéticos, nutricionais, infecções virais e as deficiências imunológicas(2, 3). Os sítios anatômicos mais acometidos por essa patologia são borda de língua e o assoalho de boca(4).

Homens, acima dos 40 anos, que fumam e bebem são considerados a população de risco para o desenvolvimento destas neoplasias (5). Em um estudo realizado em populações da Índia onde o consumo de tabaco é alto revelou um aumento da incidência do câncer bucal associado a este hábito e a transformação maligna de lesões leucoplásicas (desordem potencialmente maligna mais comum em boca), observado em pacientes de ambos os sexos com idade inferior a 40 anos(6). Shopland et al. mostrou que em uma pesquisa realizada pelo Centro Nacional de Estatísticas em Saúde dos Estados Unidos, 90,6% dos cânceres de boca em homens tem como principal causa o cigarro, enquanto que nas mulheres a atribuição é de 58,5%(7).

O tabaco e as substâncias que derivam da sua combustão estão fortemente relacionados com a carcinogênese. Mais de 60 substâncias carcinogênicas foram encontradas na fumaça do cigarro, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos,

nitrosaminas e aminas aromáticas(8). A combustão do tabaco induz estresse oxidativo nos tecidos, a partir do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de resposta antioxidante. Nestas situações, espécies reativas de oxigênio podem interagir e danificar proteínas, lipídios, carboidratos e, o próprio DNA, resultando em eventos iniciadores da carcinogênese(9, 10).

O abandono do hábito tabágico é a única forma de prevenir o alto número de mortes relacionadas ao cigarro. Parar de fumar na meia idade evita o desenvolvimento de doenças relacionadas ao fumo. Quando a cessação ocorre no adulto jovem, os benefícios são ainda melhores(11).

Muitos casos de câncer de boca são diagnosticados em estágio avançado, o que acaba resultando em prognóstico desfavorável e alta taxa de mortalidade. Visto isso, o diagnóstico prévio das lesões é de extrema importância para a melhor conduta do paciente(12). Assim como, monitorar o aparecimento de lesões potencialmente malignas em grupos considerados de risco, é um método efetivo na prevenção do câncer.(13, 14)

As alterações genéticas que precedem a transformação maligna são acumuladas durante o processo de carcinogênese. A utilização de marcadores moleculares tende a auxiliar na identificação dessas alterações(15). A busca por marcadores que detectem o campo de cancerização antes de alterações morfológicas pré-malignas, é o interesse biológico e a relevância clínica de estudos na prevenção do câncer de boca. Os biomarcadores tendem a ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e prognóstico, e um elemento de persuasão no manejo de pacientes com hábitos nocivos(16).

O fumo pode atuar como um carcinógeno que proporciona o aumento na proliferação de celular durante o processo de carcinogênese. Células com taxa de proliferação

altas estão mais suscetíveis a mutações e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de mecanismos que levem ao câncer(17).

A citopatologia é um método de diagnóstico que consiste na remoção das células mais superficiais da mucosa por meio de raspados, para posterior análise microscópica(18). É uma técnica simples, não dolorosa, não invasiva que auxilia na detecção precoce de alterações epiteliais(19). Associada a técnica de AgNOR pode ser um método auxiliar no controle de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer bucal(20). Estudos, têm sido realizados associando métodos quantitativos, como o AgNOR, à citopatologia e tem demonstrado ser um recurso para detectar alterações precoces na mucosa bucal expostas ao tabaco, e ao álcool, principalmente quando lesões não podiam ser clinicamente detectadas(12, 20-25).

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) foram descritas inicialmente por Heitz e McClintock (26), na citologia exfoliativa por Howell et al (27). As NORs são alças de DNA, localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos. Na espécie humana esses cromossomos são: 13, 14, 15, 21 e 22 (28). As NORs são unidades funcionais, que compõem parte do nucléolo, e realizam a síntese de RNA ribossômico (29). Entre as proteínas fundamentais para a transcrição do RNAr, estão as proteínas nucleolinas e nucleofosmina. Sem a presença delas a síntese de RNAr durante a interfase não ocorre (26). Quando estas NORs estão ativas a impregnação pela prata é específica para detectá-las, ocorrendo a marcação seletiva das proteínas não-histônicas associadas a estas regiões. As NORs quando presentes no núcleo representam um parâmetro de avaliação da velocidade de proliferação celular. Quando estão ativas, são impregnadas pela prata, denominadas AgNORs, e são identificadas como pontos pretos dentro do núcleo de contornos bem definidos, observados em microscopia de luz(21, 26, 30).

O número e o tamanho dos AgNORs variam de acordo com a atividade proliferativa das células. Células com baixa síntese de ribossomos apresentam um único e grande ponto preto, já as células com alta atividade proliferativa apresentam maior número de pontos pretos pequenos(31). Assim, o aumento ou diminuição do número de AgNOR em células do epitélio bucal indicam a proporção de síntese ribossomal e a atividade celular(32). Variações de volume e forma dos AgNORs revelam que a células está em maior atividade de síntese proteica, como ocorre na transformação de células malignas(33).

O primeiro estudo a avaliar a correlação entre a idade e o número de AgNOR das células da mucosa bucal foi de Selvi et al. A avaliação foi feita através do mAgNOR e da relação área total de AgNOR/área total do núcleo de 15 núcleos por indivíduo. 50 indivíduos saudáveis participaram (24 homens e 26 mulheres), com idade de 2-81 anos, categorizadas de 0-20 anos, 20-40 anos, 40-60 anos e 60-80 anos. Os grupos apresentaram valores de mAgNOR 4,26 (0,89), 3,10 (0,52), 3,22 (0,48) e 2,59 (0,26) respectivamente ($p < 0,0001$), mostrando que a quanto mais velho o indivíduo menor quantidade de AgNOR por núcleo(32).

Mourad et al. e Xie et al. avaliaram a taxa de proliferação celular utilizando dois parâmetros, mAgNOR e pAgNOR, de epitélios sem alterações celulares e arquiteturais, de epitélios displásicos, e de carcinomas espinocelulares. A contagem do número das AgNORs e a porcentagem das AgNORs (pAgNOR > 1, 2, 3, 4) permitiram discriminar entre epitélio normal, com displasia e carcinoma espinocelular, sugerindo ainda, que a contagem das AgNORs, pode prever a progressão de uma lesão displásica para carcinoma espinocelular. Os estudos concluíram que mAgNOR tem forte valor prognóstico para os casos de carcinoma espinocelular.

A técnica de AgNOR, quando associada á citopatologia, apresenta dados mais precisos, visto que todo o nucléolo pode ser analisado, e não apenas uma parte dele como nos cortes histológicos(35). Paiva et al. e Gedoz et al, ao avaliar a media do número de AgNORs e a área de AgNOR de indivíduos fumantes e não fumantes através da citopatologia, perceberam que a utilização da média do numero de AgNORs era mais sensível (23, 24).

Estudos vem mostrando a utilização da técnica AgNOR para determinar o prognóstico de lesões malignas(36).

Van Oijen et al. avaliou a relação do hábito tabágico na proliferação das células de mucosa, adjacente ao carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço, através do marcador de proliferação KI-67. Seis grupos foram avaliados a partir de amostras de tecido, coradas em HE, analisando a mucosa adjacente ao CEC de indivíduos fumantes, não fumantes e ex fumantes de mais de um ano; e a mucosa normal de indivíduos não fumantes, fumantes e ex fumantes por mais de 3 meses. O estudo mostrou que os indivíduos fumantes apresentavam taxa de proliferação maior quando comparados aos não fumantes do mesmo grupo. O grupo CEC também apresenta taxa de proliferação celular maior que o grupo com mucosa normal. Já indivíduos ex-fumantes apresentaram taxas de proliferação menores quando comparados aos fumantes, porém esta diferença não foi significativa. Isso sugere que o tabaco continua interferindo no ciclo celular mesmo após sua cessação, e que o aumento na proliferação celular ocorre sem o desenvolvimento de alterações morfológicas visíveis (17).

Sampaio et al. em um estudo com 40 participantes (22 homens e 18 mulheres), fumantes e não fumantes, com idade de 40-77 anos, avaliou em raspados citológicos da mucosa jugal dos indivíduos a proliferação pela técnica de AgNOR. A média de AgNOR por núcleo do grupo fumante ($3,4 \pm 0,54$) foi maior do que o grupo não fumante ($2,6 \pm 0,49$)

($p < 0,01$). O grupo de fumantes também apresentou maior frequência de células com ≥ 5 AgNORs por núcleo (20%) quando comparado aos não fumantes (6%) ($p < 0,01$).

Cançado et al. avaliaram 120 indivíduos saudáveis (58 mulheres e 62 homens), 60 fumantes (20 cigarros/dia ou 10 cigarros/dia a mais de 10 anos) e 60 não fumantes, não etilistas, idade entre 50-70 anos. Foram coletados raspados citológicos da borda de língua e assoalho de boca. O grupo de fumantes apresentou mAgNOR maior $1,94 \pm 0,13$ (borda da língua) e $2,07 \pm 0,19$ (assoalho de boca) comparado ao não fumantes $1,79 \pm 0,21$ (borda da língua) e $1,84 \pm 0,23$ (assoalho de boca) $p = 0,0001$. A porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo apresentou o mesmo padrão: grupo fumantes $25,16 \pm 6,01\%$ e $30,51 \pm 8,25\%$, em borda de língua e assoalho de boca respectivamente, enquanto que o grupo de não fumantes $11,85 \pm 4,50\%$ e $12,80 \pm 4,58\%$ ($p = 0,0001$). Este trabalho mostrou diferença estatística na média do número de AgNORs por núcleo e na porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo ao comparar fumantes e não fumantes (21).

Remmerbach et al. comparou raspados citológicos, submetidos a técnica de AgNOR, realizados sobre lesões de 75 pacientes, com diagnóstico confirmado por biópsia. Foram avaliados 53 CEC, 22 leucoplasias e 11 mucosas normais. O grupo CEC apresentou média do número de AgNOR e porcentagem de células com mais de 3, 4 e 5 AgNORs maior quando comparado aos demais grupos, assim como o grupo leucoplasia apresentou maior que o controle. O estudo também comparou as médias do número de AgNOR de células descamadas da mucosa bucal de indivíduos fumantes ($2,4 \pm 0,54$) e não fumantes ($2,6 \pm 0,49$), e não foi encontrada diferença estatística entre eles. Os autores acreditam que a especificidade na média de AgNOR é alta o suficiente para ajudar a distinguir o carcinoma espinocelular das demais lesões, e estipulou como valor de corte a média de 4,8 AgNOR por célula e 70% das células com mais de 3 AgNORs por núcleo (37).

Bustos et al. avaliaram 60 indivíduos saudáveis (30 fumantes e 30 não fumantes), não etilistas, com idade entre 29-58 anos, sendo 23 homens e 37 mulheres; através de raspados citológicos obtidos da borda de língua. Os indivíduos fumantes apresentaram média de AgNOR por núcleo maior (3,86) que os indivíduos não fumantes (2,79) ($p=0,003$)(20).

Paiva et al. avaliou a proliferação celular, através da citopatologia associada a técnica de AgNOR, de mucosas clinicamente normais expostas a fumo e a álcool e fumo de homens com mais de 30 anos. Os resultados mostraram que indivíduos expostos a álcool e fumo possuem maior velocidade de proliferação das células esfoliadas da mucosa bucal, quando comparado a indivíduos não expostos e expostos somente ao fumo(23).

Cançado et al. utilizaram a mesma amostra de um estudo anterior(21) para avaliar a relação da carga tabágica com a atividade proliferativa, avaliando dois sítios: borda de língua e assoalho de boca. Ao avaliar o sítio borda de língua, o estudo não encontrou correlação do número de cigarro consumidos por dia ou a duração do hábito com a média do número de AgNORs por núcleo ou com a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo. Já no assoalho de boca houve relação da quantidade de cigarros/dia com a média do número de AgNORs por núcleo e a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs ($p\leq 0,05$). Os autores deste estudo sugerem que o aumento da proliferação celular em fumantes está mais relacionado à intensidade do consumo de cigarro, do que com a duração. (22)

Fontes et al. avaliaram a influência do hábito tabágico (tempo e número de cigarros consumidos por dia) na atividade de proliferação celular e a correlação entre os resultados obtidos através da citopatologia associada a técnica de AgNOR e Papanicolau. O estudo revelou que indivíduos fumantes apresentam maior velocidade de proliferação celular que os não fumantes. A quantidade de cigarros/dia e a duração do hábito não mostraram relação com o mAgNOR(12)

López-Blanc et al. mostraram que o AgNOR possibilita a visualização de alterações celulares antes mesmo de qualquer sinal histológico ou clínico, causado pelo álcool e pelo fumo na mucosa bucal de pacientes sem tumor. Por meio da técnica de AgNOR em cortes histopatológicos - de 12 mucosas de indivíduos etilistas e fumantes, e de 15 indivíduos controles, sem alterações significativas ao serem visualizadas em HE – foi possível observar que as células da camada suprabasal de indivíduos etilistas/fumantes ($2,301 \pm 0,694$) proliferavam mais ao comparado com controle ($1,747 \pm 0,455$) ($p \leq 0,05$). A maior proliferação das células da camada basal sugere uma alteração metabólica induzida pelo álcool e pelo tabaco(16).

Ahmed et al. avaliaram a atividade proliferativa das células descamadas da mucosa jugal, borda da língua e do assoalho de boca de 180 indivíduos (60 fumantes, 52 consumidores de comidas/bebidas picantes e/ou quentes, 34 etilistas e 24 controles), com idade entre 15-62 anos, 65% homens e 35% mulheres. O estudo mostrou que o grupo fumo e o grupo álcool apresentaram médias de AgNOR maiores (3,68 e 2,82 respectivamente) comparado ao grupo controle (2,00) ($p=0,0001$). O estudo não mostrou a comparação dos valores do grupo fumo e grupo álcool, porém relatou uma pequena diferença entre os grupos(38).

Sharma et al. avaliaram quantitativamente e compararam AgNORs de células descamas da mucosa bucal de fumantes e mascadores de tabaco, com e sem displasia, com carcinoma epidermóide e indivíduos controle. Os resultados mostraram que o indivíduos com CEC apresentaram média de AgNOR e porcentagem de células com mais de 3 e 5 AgNORs maiores que os indivíduos de fumavam e mascavam tabaco ($p < 0,001$), e que os indivíduos controle apresentaram valores menores que os demais grupos ($p < 0,001$) (19).

Jindal et al. compararam alterações em células aparentemente normais da mucosa bucal com os efeitos do álcool e do fumo, através da avaliação de AgNOR e micronúcleos, na tentativa de detectar possíveis alterações causadas por esses carcinógenos. Cem indivíduos, entre 20-30 anos, divididos em 4 grupos (grupo controle, grupo fumo, grupo álcool e grupo álcool/fumo) participaram da pesquisa. A média do número de AgNORs foi maior em todos os grupos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo fumo apresentou média maior ($4,162 \pm 0,5338$) comparada ao grupo álcool ($3,980 \pm 0,7582$), porém esse aumento não foi significativo. O grupo álcool/fumo apresentou valores estatisticamente maiores ao comparado aos demais grupos, mostrando o efeito sinérgico entre o fumo e o álcool. Os resultados revelaram que os carcinógenos aumentam a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal(39).

A velocidade de proliferação das células da mucosa bucal sofre influência de diversos fatores. Matheus et al. avaliaram o efeito de uso crack e álcool na taxa de proliferação celular das células descamadas da mucosa bucal de 87 indivíduos (26 no grupo crack, 26 grupo álcool e 35 grupo controle). Ao avaliar a quantidade de cigarros consumida o grupo álcool mostrou valores maiores comparado ao grupo crack ($p = 0,02$). O grupo álcool apresentou valores mais altos de mAgNOR e pAgNOR > 1, 2, 3 e 4 ($p < 0,01$) em borda de língua; já em assoalho de boca esse aumento foi só em relação ao grupo controle. Os resultados do estudo sugerem que o uso de crack não interfere na proliferação das células da mucosa bucal, reforçando que o consumo de álcool associado ao tabaco permanecem como o fatores determinantes nas alterações da mucosa bucal.

Gonzales Segura et al. através na citologia exfoliativa avaliaram a sensibilidade e especificidade das técnicas Papanicolau e AgNOR na detecção de alterações malignas para o monitoramento de populações. Trinta e quatro indivíduos, 14 com lesões potencialmente

malignas (líquen plano e leucoplasia) e 20 com CEC, tendo como grupo controle a mucosa clinicamente saudável do lado oposto da lesão. Os grupos de lesões potencialmente malignas e o grupo CEC apresentaram número de AgNORs estatisticamente maior quando comparado ao grupo controle. O AgNOR mostrou uma sensibilidade e especificidade de 90%, e apresentou certa vantagem sobre o Papanicolau, uma técnica qualitativa, por ser uma técnica quantitativa (40).

Todos esses estudos supra citados mostraram maior proliferação celular em indivíduos fumantes. Porém os efeitos ao longo tempo, deste aumento na proliferação celular ainda não são claros. A detecção de alterações celulares pode reduzir o desenvolvimento de lesões permitindo a intervenção nos fatores de risco. Para sua detecção, estudos longitudinais com pacientes de risco devem ser desenvolvidos(24).

Estudos (23, 24), mostraram que a análise de mAgNOR é suficiente para conduzir estudos longitudinais de acompanhamento de indivíduos expostos aos carcinógenos, álcool e fumo (Tabela I)

Gedoz et al. avaliaram após 24 meses os mesmos indivíduos do estudo de Paiva et al(23). Dos 60 participantes iniciais, 52 continuaram o estudo (17 no grupo controle, 25 grupo fumo e 18 no grupo álcool/fumo). Um indivíduo do grupo fumo abandonou o hábito, e foi observada diminuição na média do número de AgNOR por célula e na porcentagem de células com mais de 3 e 5 AgNORs no sítio lábio inferior. Dois indivíduos do grupo álcool/fumo pararam de beber e foi observado um aumento nos valores das variáveis dos sítios avaliados. O grupo controle mostrou valores constantes para as variáveis média de AgNOR e porcentagem de células com mais de 3 e 5 AgNORs, na borda de língua e no assoalho de boca. O grupo fumo apresentou aumento significativo dos valores de média de AgNOR nos sítios borda de língua e assoalho de boca, e na porcentagem de células com mais

de 3 AgNORs na borda de língua. O grupo álcool/fumo mostrou aumento significativo na média de AgNOR em todos os sítios, valores maiores comparados ao grupo fumo, confirmando a sinergia do efeito do álcool e do fumo na proliferação celular.

Tabela I – Principais estudos utilizando AgNOR para avaliar a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal

Estudo	Tipo de Estudo	Grupos avaliados	n	Parâmetros avaliados	Sítios Avaliados	Principais achados
Sampaio et al. 1999	Transversal	Fumantes	20	mAgNOR	MJ	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>5 em fumantes
	Citopatologia	Não Fumantes	20	pAgNOR>5		
Cançado et al. 2001²¹	Transversal	Fumantes	60	mAgNOR	BL AB	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes
	Citopatologia	Não Fumantes	60	pAgNOR>3 pAgNOR>5		
Remmerbach et al 2003³⁸	Transversal Citopatologia	CEC	53	mAgNOR	SL	Aumento estatisticamente significativo dos parâmetros avaliados em CEC em relação aos demais grupos. Valor corte de mAgNOR de 4,8 por célula e pAgNOR>3 70%.
		Leucoplasias	22	pAgNOR >3,		
		Mucosas normais	11	pAgNOR> 4		
		Fumantes Não Fumantes		pAgNOR> 5		
Orellana-Bustos et al. 2004²⁰	Transversal Citopatologia	Fumantes	30	mAgNOR	BL	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR em assoalho bucal de fumantes
		Não Fumantes	30			
Paiva et al. 2004²³	Transversal Citopatologia	Fumantes	25	mAgNOR	BL AB	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes e fumantes/etilistas
		Fumantes/etilistas	18	pAgNOR>3		
		Não Fumantes	17	pAgNOR>5		
Gedoz et al. 2007³²	Longitudinal (24 meses) Citopatologia	Fumantes	25	mAgNOR	LI BL AB	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e em borda de língua e assoalho de boca de fumantes e fumantes/etilistas ao longo do tempo. pAgNOR>3 aumento significativo em borda de língua em fumantes.
		Fumantes/etilistas	18	pAgNOR>3		
		Não Fumantes	17	pAgNOR>5		
Fontes et al. 2008¹²	Transversal Citopatologia	Fumantes	25		BL	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes
		Não-Fumantes	25	mAgNOR pAgNOR>3		
López-Blanc et al 2009¹⁶	Transversal Histologia	Fumantes/etilistas	12		PL	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR na camada suprabasal de fumantes/etilistas.
		Controle	15	mAgNOR		

Ahmed et al 2010 ³⁹	Transversal Citopatologia	Fumantes	60	mAgNOR	ML	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR em fumantes e etilistas comparados ao controle.
		Comidas/bebidas picantes/quentes	52		BL	
		Etilistas	34		AB	
		controle	24			
Sharma et al 2012 ¹⁹	Transversal Citopatologia	Fumantes sem displasia	20	mAgNOR pAgNOR>3 pAgNOR>5	AB	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 e 5 de fumantes com CEC.
		Fumantes com displasia	20		P	
		Fumantes com CEC	5		MJ	
		Controle	10			
Gonzales Segura et al 2015 ⁴¹	Transversal Citopatologia	Lesões potencialmente malignas	14	mAgNOR	SL	Aumento estatisticamente significativo de lesões potencialmente malignas e CEC comparado ao controle.
		CEC	20			
		Controle	34			

MJ: mucosa jugal; BL: Borda de Língua; AB: Assoalho de Boca; SL: Sítio Lesional; LI: Lábio Inferior; PL: Peri-lesional; P: Palato

A avaliação longitudinal das mudanças na proliferação celular na mucosa bucal induzidas pelo fumo e pelo álcool pode ser útil no acompanhamento de pacientes expostos a esses carcinógenos e na prevenção do câncer bucal. A importância da observação dessas mudanças ao longo do tempo está na possibilidade de estabelecer marcadores que identifiquem o risco ao câncer bucal em indivíduos e população (24).

Estudos devem continuar para definir a melhor metodologia e biomarcadores para a população e possibilitar a detecção precoce do CEC. A cavidade oral é de fácil avaliação e alguns dos fatores de risco já estão estabelecidos, o que é uma ótima oportunidade de implantar técnicas de monitoramento que possam melhorar os resultados em termos de detecção precoce do CEC(40).

Percebe-se, assim, a definição de um modelo citológico quantitativo que permita prever com maior acurácia, qual indivíduo desenvolverá câncer bucal. Para isso, esse estudo se propõe avaliar o padrão proliferativo das células epiteliais descamadas da mucosa

bucal, e futuramente definir qual o perfil do indivíduo que apresente uma constante velocidade de proliferação das células da mucosa aumentada.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar o reflexo da cessação do consumo de fumo sobre a velocidade de proliferação celular, em células epiteliais descamadas da mucosa bucal ao longo do tempo.

Objetivos Específicos

- Avaliação quantitativa do padrão de proliferação celular pela técnica de AgNOR em um momento inicial e após um período intermediário (8-15meses) e final (16-30 meses) da cessação da exposição ao fumo sobre as células epiteliais descamadas da borda de língua e assoalho bucal.
- Medir o mAgNOR e pAgNOR dos indivíduos avaliados e compará-los no momento inicial e após um período intermediário (8-15meses) e final (16-30 meses) da cessação da exposição ao fumo.

3. REFERÊNCIAS

1. INCA. Estimativa 2014 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/2007>.
2. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2005;35(3):169-73.
3. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral oncology*. 2001;37(5):401-18.
4. Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral oncology*. 2001;37(1):28-35.
5. Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral oncology*. 2004;40(2):158-63.
6. Squier CA. Smokeless tobacco and oral cancer: a cause for concern? *CA: a cancer journal for clinicians*. 1984;34(5):242-7.
7. Shopland DR. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. *Environmental health perspectives*. 1995;103 Suppl 8:131-42.
8. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(10):733-44.
9. Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview. *Oral oncology*. 2001;37(3):205-10.
10. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology 2000*. 2011;57(1):19-37.
11. Vainio H, Weiderpass E, Kleihues P. Smoking cessation in cancer prevention. *Toxicology*. 2001;166(1-2):47-52.
12. Fontes PC, Correa GH, Issa JS, Brandao AA, Almeida JD. Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head and neck pathology*. 2008;2(3):157-62.
13. Epstein JB, Scully C. Assessing the patient at risk for oral squamous cell carcinoma. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital*

Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry. 1997;17(4):120-8.

14. Kleinman DV, Swango PA, Pindborg JJ, Gupta P. Toward assessing trends in oral mucosal lesions: lessons learned from oral cancer. *Advances in dental research*. 1993;7(1):32-41.

15. Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1998;36(4):252-60.

16. Lopez-Blanc SA, Collet AM, Gandolfo MS, Femopase F, Hernandez SL, Tomasi VH, et al. Nucleolar organizer regions (AgNOR) and subepithelial vascularization as field cancerization markers in oral mucosa biopsies of alcoholic and smoking patients. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(5):747-53.

17. van Oijen MG, Gilsing MM, Rijksen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral oncology*. 1998;34(4):297-303.

18. Cohen L. Some observations on the use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral lesions. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1966;21(4):458-64.

19. Sharma A, Saxena S. Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2012;23(2):251-6.

20. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez ME, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Medicina oral : organo oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal*. 2004;9(3):197-203.

21. Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral oncology*. 2001;37(5):446-54.

22. Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS. Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers' normal buccal mucosa. *Tobacco induced diseases*. 2004;2(1):43-9.

23. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 2004;26(3):175-80.
24. Gedoz L, Lauxen Ida S, Sant'Ana MF, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 2007;29(4):231-8.
25. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta cytologica*. 2005;49(3):265-72.
26. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* (Oxford, England : 1993). 2000;31(2):117-20.
27. Howell WM, Denton TE, Diamond JR. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*. 1975;31(2):260-2.
28. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 1975;53(1):37-50.
29. Derenzini M, Trere D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *The American journal of pathology*. 1998;152(5):1291-7.
30. Schwartz JL, Muscat JE, Baker V, Larios E, Stephenson GD, Guo W, et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral oncology*. 2003;39(8):842-54.
31. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *International review of experimental pathology*. 1991;32:149-92.
32. Selvi B, Demirtas H, Eroz R, Imamoglu N. Reduction of the argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis with age in buccal epithelial cells of healthy individuals. *Aging clinical and experimental research*. 2015;27(2):201-8.
33. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *The Journal of pathology*. 1989;158(3):185-8.
34. Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1997;79(11):2200-8.

35. Sujathan K, Kannan S, Pillai KR, Chandralekha B, Amma NS, Nair MK. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta cytologica*. 1996;40(4):724-8.
36. Rajput DV, Tupkari JV. Early detection of oral cancer: PAP and AgNOR staining in brush biopsies. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2010;14(2):52-8.
37. Khuder SA, Dayal HH, Mutgi AB. Age at smoking onset and its effect on smoking cessation. *Addictive behaviors*. 1999;24(5):673-7.
38. Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*. 2003;25(3):139-46.
39. Ahmed HG, Ebnoof SO, Hussein MO, Gbreel AY. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. *Diagnostic cytopathology*. 2010;38(7):489-95.
40. Jindal S, Chauhan I, Grewal HK. Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organiser regions and micronuclei. *Journal of cytology / Indian Academy of Cytologists*. 2013;30(3):174-8.
41. Gonzalez Segura I, Secchi D, Carrica A, Barello R, Arbelo D, Burgos A, et al. Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2015;44(3):178-84.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E SEU ABANDONO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL. AVALIAÇÃO LONGITUDINAL ATÉ 30 MESES¹

LAUREANO NK, MARASCHIN BJ, SONDA NC, STRAPASSON RA, DA SILVA AD, VISIOLI F,
KNORST MM, RADOS PV

Palavras chave: AgNOR, fumo, avaliação longitudinal

INTRODUÇÃO

O consumo de tabaco é a principal causa evitável de morte em todo o mundo(41), sendo seu consumo responsável por mais de 5 milhões de mortes/ano, com estimativa que 8 milhões de mortes em 2030, 80% dessas em países em desenvolvimento (42). O fumo é o principal fator de risco independente para o desenvolvimento de câncer de boca, uma vez que ele atua como agente iniciador e também promotor do processo de carcinogênese, provocando mutações em genes que regulam os mecanismos de proliferação e morte celular(43, 44).

90% dos casos de câncer de boca são do tipo carcinoma espinocelular (CEC), representando cerca de 600.000 novos casos todo ano, desses 2/3 são descobertos em estágios avançados e apenas 50% tem sobrevida de 5 anos(45). Sabendo-se da importância do diagnóstico inicial para um prognóstico favorável do CEC bucal, e que o fumo promove um aumento na proliferação celular a citopatologia pode auxiliar na detecção de alterações prévias ao aparecimento de lesões clinicamente visíveis. A utilização da citopatologia

¹ *este estudo será submetido à revista Cytopathology

agregada a técnicas quantitativas - como a impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs), que avalia a taxa de proliferação celular - busca aumentar a acurácia deste exame. Inúmeros trabalhos utilizando essas técnicas foram capazes de mostrar diferenças na velocidade de proliferação celular de células descamadas da mucosa bucal entre pacientes fumantes e não fumantes(21, 25, 46).

Uma das formas de prevenção do câncer de boca é a suspensão da exposição dos fatores de risco, porém, são escassos os estudos que avaliam o tempo necessário para as células bucais voltarem às condições fisiológicas após a remoção dos fatores de risco(11). O acompanhamento ao longo do tempo de indivíduos expostos a carcinógenos pode ser importante para estabelecer parâmetros que possam identificar o indivíduo com risco de desenvolvimento de câncer bucal(24). O objetivo desse estudo foi avaliar o reflexo da cessação do consumo de fumo sobre a velocidade de proliferação celular, por meio da técnica de AgNOR, em um momento inicial, intermediário e final sobre as células epiteliais descamadas da borda de língua e assoalho bucal.

METODOLOGIA

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes éticas estabelecidas na Declaração de Helsinki e aprovado pelo comitê de ética da instituição (número 952.897).

Este foi um estudo observacional prospectivo. A amostra inicial foi constituída por 138 voluntários, que participavam do Programa de Abandono do Hábito de Fumar do HCPA, ou que recebiam atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e que concordaram em participar do estudo.

Os critérios de inclusão foram ter 18 ou mais anos, ausência de lesões bucais detectáveis (exceto doença periodontal), não apresentar histórico prévio de lesões malignas bucais, ser fumante ou não, ser alcoolista ou não ingerir mais que 30g de álcool por semana. Os participantes foram distribuídos em três grupos de acordo com os seguintes critérios: Grupo Controle (GC): indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, que nunca fumaram ou param há mais de 10 anos, e que ingeriam até 30g de álcool por semana. Grupo Abandono de Fumo (GAF): indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico, alcoolistas ou não. Grupo Fumo (GF): indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do HCPA, que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo da pesquisa, alcoolistas ou não.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em dados de estudo prévio⁽²¹⁾ que comparou a detecção de AgNORs em controles e em tabagistas e encontrou desvio padrão de 0,48 no grupo controle e de 0,51 nos tabagistas. Utilizando uma diferença esperada de 0,50 na quantificação de AgNORs nos dois grupos estimou-se um tamanho

amostral de 24 indivíduos em cada grupo, considerando-se perda de 10%, uma significância de 0,05 poder do teste de 90%.

A inclusão dos indivíduos neste estudo só ocorreu após a realização dos esclarecimentos sobre o estudo, e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por aqueles que decidiram participar da pesquisa.

Os pacientes responderam um questionário sobre hábito-tabágico, consumo de bebida alcoólica e de bebidas quentes, presença de doenças sistêmicas e medicamentos. Todos os participantes foram submetidos ao exame clínico da cavidade bucal. Usuários de próteses removeram-nas previamente. Aqueles pacientes com lesões bucais detectáveis foram encaminhados à Clínica de Patologia Bucal da UFRGS.

Após realizarem bochecho com água filtrada durante 1 minuto(25), com auxílio de uma escova citológica realizou-se esfregaços citológicos dos seguintes sítios bucais: borda de língua e mucosa do assoalho de boca. Foram realizados dois raspados em cada sítio selecionado. Cada esfregaço foi distendido em uma lâmina histológica de vidro, previamente higienizada, fixada em álcool absoluto 99,3%, e armazenada em frasco porta lâminas. Uma lâmina de cada sítio foi destinada à técnica de AgNOR, e as restantes reservadas para caso de necessidade de repetição da técnica. As coletas citopatológicas foram realizadas em três momentos, coleta inicial (T1), coleta intermediária durante o período de 8-15 meses (T2), e final durante o período de 16-30 meses (T3).

O cegamento em relação ao material foi feito no momento em que as lâminas, de cada paciente, chegavam ao laboratório e eram registradas sendo identificadas sob a forma de números.

As amostras foram submetidas à técnica de AgNOR seguindo o protocolo descrito por Ploton et al. (1986)(47). AgNORs foram quantificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Crocker, Boldy and Egan (1989)(33). Para ta, foram capturadas (48) células nucleadas, com núcleos de contornos bem definidos e não sobrepostos, com aumento de 1000X em óleo de imersão(24). Foi utilizado o software Qcapture® software version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., 2005), com auxílio de uma vídeo-câmera Olympus® (QColor 5, Coolet, RTV), acoplada a um microscópio binocular (CX41RF, Olympus Optical Co.) e um computador Dell (Dimension 5150).

O número de AgNORs por núcleo foi quantificado a partir das imagens capturadas de cada lâmina. A média de AgNORs por núcleo (mAgNOR) em cada amostra, e a porcentagem de células com mais de 1, 2 e 3 AgNORs por núcleo (pAgNOR>1, pAgNOR>2 e pAgNOR>3) foram calculados (12, 21). A quantificação das AgNORs foram realizadas por três examinadores previamente calibrados (ICC \geq 0,75).

Para avaliar o impacto da exposição ao tabaco, de cada indivíduo, na velocidade de proliferação celular, foi calculado o packyears(49, 50) (um pack equivale a vinte cigarros fumados todos os dias durante um ano) no momento inicial do estudo.

A flutuação da atividade proliferativa, ao longo do tempo, foi realizada comparando o número de AgNORs quantificados em cada uma das 3 coletas realizadas.

De acordo com a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Generalized Estimated Equations (GEE) e a correção de Bonferroni foi utilizado para avaliar a influência do sexo, idade, hábitos tabágico e etílicos sobre a taxa de proliferação celular. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Todas as análises foram realizadas no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

O número de participantes inicial do estudo foi de 138 indivíduos, sendo 68 (49,3%) homens e 70 (50,7%) mulheres com média de idade de 52,14 anos. 71,7% não apresentavam história prévia de consumo de álcool. Dos 138 indivíduos que iniciaram a pesquisa (71 pertenciam ao GC, 26 ao GAF e 41 ao GF); 48 realizaram a coleta intermediária (19 GC, 14 GAF e 15 GF) e 27 participaram da coleta final, 9 indivíduos em cada grupo. No decorrer do estudo, 2 participantes faleceram, 7 não quiseram mais participar e 102 não foi possível contatar. Os pacientes perdidos foram contatados por telefone, em três momentos diferentes, sem sucesso. Após as três tentativas telefônica, uma carta de chamamento foi enviada, lembrando o participante da pesquisa e convidando-o a continuar o acompanhamento.

Não foi encontrada relação entre a idade, gênero e consumo prévio de álcool ($p=0,237$) com a velocidade de proliferação celular.

Não foi observada diferença estatística do mAgNOR entre os grupos avaliados, nos diferentes tempos em ambos os sítios (Tabela I). Foi observada uma tendência à diminuição na velocidade de proliferação, no tempo intermediário, e uma tendência a aumentar no tempo final, em todos os grupos.

Tabela I – valores de mAgNOR (média e desvio padrão) das células coletadas da borda de língua e do assoalho de boca, dos diferentes grupos, nos três momentos de coleta. Percentual de variação, ao longo do tempo.

mAgNOR		n	T 1	n	T 2	%	n	T 3	%
BL $p=0,087^*$	GC	71	2,68 (,07)	19	2,52 (,13)	-5,76	9	3,05 (,12)	14,05
	GAF	26	2,79 (,09)	14	2,16 (,13)	-22,43	9	3,16 (,23)	13,24
	GF	41	3,09 (,12)	15	3,02(,12)	-2,17	9	3,40 (,13)	9,97
AB $p=0,090^*$	GC	71	3,10 (,07)	19	3,00 (,11)	-3,39	9	3,43 (,13)	10,57
	GAF	26	2,95 (,10)	14	2,63 (,16)	-10,90	9	3,79 (,16)	28,13
	GF	41	3,53 (,13)	15	3,42 (,07)	-3,11	9	4,01 (,16)	13,73

BL: Borda de Língua, AB: Assoalho de Boca,* GEE

No sítio borda de língua, o pAgNOR>1 e 2 mostrou uma diferença estatística entre os grupos em T1 e T2. Tal diferença não foi observada entre os tempos e os grupos quando avaliado o pAgNOR>3. O sítio assoalho de boca apresentou diferença estatística no pAgNOR>1, em T2, mostrando que indivíduos do GC e GAF apresentam velocidade de proliferação menor quando comparados ao GF (Tabela II).

Tabela II – valores de pAgNOR (média e desvio padrão) das células coletadas da borda de língua e do assoalho de boca, dos diferentes grupos nos três momentos de coleta.

BL		n	T1	n	T2	n	T3
p>1 p=0,000 *	GC	71	83,14 (1,61) ^A	19	78,06 (4,44) ^{A,B}	9	92,82 (1,78)
	GAF	26	89,59 (1,65) ^B	14	67,61 (4,54) ^A	9	85,98 (3,99)
	GF	41	88,44 (1,51) ^C	15	88,35 (2,15) ^B	9	93,18 (1,55)
p>2 p=0,011 *	GC	71	51,28 (2,57) ^A	19	49,18 (4,37) ^A	9	65,43 (4,61)
	GAF	26	57,75 (3,53) ^{A,B}	14	33,24 (4,91) ^B	9	64,10 (6,93)
	GF	41	62,88 (3,21) ^B	15	62,39 (3,82) ^{A,B}	9	73,76 (3,80)
p>3 p=0,196 *	GC	71	21,83 (2,14)	19	19,22 (4,03)	9	33,28 (4,08)
	GAF	26	24,15 (3,13)	14	11,69 (3,04)	9	41,00 (6,88)
	GF	41	33,41 (3,44)	15	32,99 (3,99)	9	46,79 (4,82)
AB		n	T1	n	T2	n	T3
p>1 p=0,007 *	GC	71	94,28 (,66)	19	92,04 (2,09) ^{AC}	9	94,33 (1,94)
	GAF	26	91,37 (2,05)	14	81,37 (4,95) ^{BC}	9	97,67 (1,04)
	GF	41	95,80 (1,30)	15	97,35 (,59) ^{CAB}	9	98,30 (,72)
p>2 p=0,098 *	GC	71	67,73 (2,16)	19	66,24 (3,65)	9	78,81 (4,54)
	GAF	26	65,44 (3,81)	14	54,81 (7,02)	9	83,65 (3,08)
	GF	41	78,64 (2,30)	15	81,33 (2,29)	9	90,29 (2,15)
p>3 p=0,381 *	GC	71	31,52 (2,46)	19	28,95 (4,36)	9	46,43 (4,65)
	GAF	26	28,07 (3,11)	14	22,94 (4,42)	9	55,62 (5,08)
	GF	41	49,44 (3,46)	15	44,13 (3,56)	9	63,79 (4,81)

BL: Borda de Língua, AB: Assoalho de Boca,* GEE

Ao avaliar o efeito do tabaco na velocidade de proliferação celular, observou-se maior pAgNORBL>1,2 e 3 em indivíduos que fumavam de 30-50 packyears quando comparados aos que não fumavam (Tabela III). A média de packyears consumido pelo GAF foi de 60,97± , versus 37,12± do GF.

Tabela III- valores de mAgNOR e pAgNOR (média e desvio padrão) das células coletadas da borda de língua e do assoalho de boca, ao avaliar a influência da quantidade de tabaco consumida, na velocidade de proliferação celular.

BL	n	mAgNOR p=0,091*	p>1 p=0,004*	p>2 p=0,029*	p>3 p=0,019*
Não fuma	71	2,6803 (,07757) ^A	83,14 (1,619) ^A	51,28 (2,570) ^A	21,83 (2,141) ^A
<30 packyears	23	2,8978 (,15239) ^A	87,91 (2,156) ^{A,B}	58,13 (4,402) ^{A,B}	27,74 (4,354) ^{A,B}
30-50 packyears	24	3,1642 (,14865) ^A	90,54 (1,558) ^B	65,08 (3,784) ^B	35,54 (4,320) ^B
>50 packyears	20	2,8552 (,13227) ^A	87,85 (2,127) ^{A,B}	59,23 (4,233) ^{A,B}	25,53 (3,881) ^{A,B}
AB	n	mAgNOR p=0,075*	p>1 p=0,071*	p>2 p=0,185*	p>3 p=0,162
Não fuma	71	3,1042 (,07604) ^A	94,28 (,663) ^A	67,73 (2,166) ^A	31,52 (2,465) ^A
<30 packyears	23	3,2722 (,19570) ^A	90,65 (2,773) ^A	69,19 (4,467) ^A	38,61 (5,227) ^A
30-50 packyears	24	3,4808 (,16003) ^A	96,71 (,855) ^A	79,64 (2,579) ^A	49,71 (4,098) ^A
>50 packyears	20	3,1634 (,13749) ^A	95,04 (1,557) ^A	71,42 (3,711) ^A	34,04 (4,184) ^A

BL: Borda de Língua, AB: Assoalho de Boca, * GEE

DISCUSSÃO

Já está estabelecido na literatura, que as células epiteliais descamadas da mucosa bucal de indivíduos que fumam apresentam taxas de velocidade de proliferação celular maior do que os não fumantes (12, 21-25, 51). Entretanto não estão definidos os efeitos da cessação do fumo sobre esta velocidade (24). Os resultados apresentados neste estudo mostram que ocorre uma variação neste critério, frente ao abandono do fumo, ao longo do tempo.

No planejamento amostral foram definidos grupos com 24 pessoas. Inicialmente foram coletadas amostras de 138 indivíduos que concordaram em participar do estudo. Durante o trabalho de campo observamos uma perda de amostra de aproximadamente 65% por grupo, o que é esperado em estudos longitudinais de caráter prospectivo. Estas perdas são explicadas pela natureza do trabalho que pressupõe mudanças comportamentais, de dependência química, estilo de vida, desmotivação em abandonar o hábito, fatores econômicos e outros fatores sociais. Além da disponibilidade dos indivíduos de serem acompanhados pelo menos durante 24 meses. Estes são os fatores, que em nossa opinião, explicam que nosso estudo tenha 9 indivíduos em cada grupo ao final do tempo de observação.

Durante a avaliação dos resultados, buscamos isolar os efeitos provocados pelos fatores demográficos, sexo e idade. Segundo a literatura (21, 22, 32, 51) consultada estes podem modificar a velocidade de proliferação. A análise estatística não demonstrou variação quando estas variáveis foram analisadas de forma independente, concordando com Sampaio et e Cançado et al (21, 22, 37, 51). E indo de encontro aos resultados de Selvi et al (32), no que diz respeito à velocidade de proliferação e a idade, considerando mAgNOR.

Os parâmetros de velocidade de proliferação considerados em nosso estudo, envolveram mAgNOR. No momento inicial de coleta não encontramos diferença estatística, independente dos grupos e sítios anatômicos avaliados (Tabela I). Este achado contraria a literatura (12, 19-21, 23, 39, 51), onde foram encontrados valores de mAgNOR maiores no GF em relação ao GC. Na observação inicial, é possível constatar que as médias de mAgNOR no GAF e GF são maiores que do GC, em BL sugerindo maior proliferação nos indivíduos expostos, mesmo que sem diferenças estatisticamente significantes, similar a literatura (12, 19, 20, 23, 51). Quando observamos os valores em AB nota-se que a velocidade de proliferação é maior no GC.

Ainda observando os resultados da Tabela I foi possível constatar, no tempo intermediário T2, uma diminuição da velocidade de proliferação do GAF, sendo esta pelo menos três vezes menor que os outros dois grupos. De forma interessante, observamos que no tempo final a velocidade de proliferação nos três grupos voltou a apresentar-se equilibrada independente do sítio anatômico. Esta diminuição momentânea observada nas células da mucosa dos indivíduos em abandono, representa uma adaptação do ritmo de proliferação neste grupo. O achado circunstancial apresentado por Gedoz et al, onde dois pacientes em que o abandono interferiu na velocidade de proliferação, sugeriu que a eliminação do agente carcinógeno resultaria na diminuição da proliferação celular. Esta flutuação que observamos neste estudo, representaria um momento transitório observado nestas células nos indivíduos em abandono do fumo. Quando observamos a velocidade de proliferação celular em T3 e considerando mAgNOR se constata que independentemente do grupo a velocidade de proliferação é numericamente maior. Nossos achados, concordam com a interpretação de Van Oijen et al em que o tabaco continua interferindo no ciclo celular mesmo após sua cessação, contrapondo a ideia de que o aumento na proliferação

celular ocorre apenas como resposta epitelial de um agente nocivo (17) e reforçando a teoria de Marron et al, de que são necessários de 1-4 anos para que os efeitos voltem ao normal (52).

Quando consideramos os valores de $pAgNOR > 1$ e 2 constatou-se comportamento semelhante aos resultados de $mAgNOR$, com diminuição dos valores no momento intermediário, seguido de aumento destes valores na coleta final. Considerando este critério, observamos diferenças estatísticas significantes entre os indivíduos expostos e não expostos, sugerindo que este modelo de quantificação é mais sensível. No tempo inicial, em BL, o $pAgNOR > 1$ e 2 do GF foi maior que do GC e GAF. No tempo intermediário o $pAgNOR > 1$ do GF foi maior que GAF, e o $pAgNOR > 2$ do GC maior que GAF. Em AB, no tempo intermediário, o $pAgNOR > 1$ do GF apresentou valores maiores comparados ao GC e GAF.

No estudo de Remmerbach et al, utilizando citologia com evidenciação de $AgNOR$ demonstrou que os pacientes com CEC apresentam a proporção de células com $pAgNOR > 3$ maior que 70%. e no grupo controle menor que 70%. Nosso estudo concorda com esses achados, uma vez que encontrou valores inferiores à 70%, em todos os grupos e sítios anatômicos avaliados. O $pAgNOR > 3$ não mostrou diferença estatística entre os grupos avaliados e sítio anatômicos. Considerando os parâmetros de $pAgNOR > 3$ as diferenças estatísticas não foram observadas. Em nossa opinião, este é um achado coerente na medida em que avaliamos células obtidas de mucosas clinicamente normais. Entretanto, é possível perceber que os percentuais maiores de células com $pAgNor > 3$ ocorrem em indivíduos expostos, ou em abandono de fumo, confirmando o que a literatura demonstra, de que a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal é alterada frente exposição ao fumo (12, 21, 23, 53).

Quando buscamos avaliar a relação entre dose/ resposta da mucosa bucal, ou seja, estratificando o grupo dos fumantes por quantidade de cigarros consumida, não constatamos essa influência, na medida que a contagem de mAgNOR, independente do sítio anatômico, não mostrou diferença estatística, concordando com Fontes et al (12). Um dado que merece ser destacado em nossa opinião, foi a observação de que a velocidade de proliferação maior ocorre no extrato 30-50 packyears, e não no >50 packyears (Tabela III). Os valores de pAgNOR >1, 2 e 3 no BL mostraram que esta mucosa é suscetível a esta variável. Ao contrário do relatado por Cançado et al (2004).

Ao longo da seleção dos indivíduos, constatamos a existência de fumantes isoladamente e outros que fumavam e consumiam álcool. Considerando o mAgNOR, não foi possível observar diferença estatística na velocidade de proliferação entre indivíduos etilistas ou não em ambos sítios avaliados. (dados não mostrados). Trabalhos usando histologia em animais mostram o efeito do álcool neste parâmetro, apresentando contagem maior de mAgNOR (54, 55).

O estudo mostrou que o GAF apresenta maior flutuação, de mAgNOR, que o GC e GF, ao longo do tempo. A citopatologia associada à técnica de AgNOR pode ser útil como uma ferramenta auxiliar no monitoramento de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer bucal (16, 21, 37, 39). Sugerimos, que os dados de pAgNOR são capazes de demonstrar diferenças, ao contrário do mAgNOR. Estudos futuros ampliando o tempo de controle, controlando os agentes carcinógenos, e observando indivíduos com características populacionais seriam convenientes para buscar a padronização deste modelo de prevenção de câncer.

REFERÊNCIAS

1. Brundtland GH. Achieving worldwide tobacco control. *Jama*. 2000;284(6):750-1.
2. WHO. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic: implementing smoke-free environments:executive summary. 2009.
3. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral oncology*. 2005;41(3):244-60.
4. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;108(5):741-9.
5. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
6. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutation research*. 2005;578(1-2):371-81.
7. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta cytologica*. 2005;49(3):265-72.
8. Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral oncology*. 2001;37(5):446-54.
9. Vainio H, Weiderpass E, Kleihues P. Smoking cessation in cancer prevention. *Toxicology*. 2001;166(1-2):47-52.
10. Gedoz L, Lauxen Ida S, Sant'Ana MF, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 2007;29(4):231-8.
11. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *The Histochemical journal*. 1986;18(1):5-14.
12. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *The Journal of pathology*. 1989;158(3):185-8.

13. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Ofner D, et al. Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology. *Zentralblatt fur Pathologie*. 1994;140(1):107-8.
14. Fontes PC, Correa GH, Issa JS, Brandao AA, Almeida JD. Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head and neck pathology*. 2008;2(3):157-62.
15. Herbert WH. Cigarette smoking and arteriographically demonstrable coronary artery disease. *Chest*. 1975;67(1):49-52.
16. Wood DM, Mould MG, Ong SB, Baker EH. "Pack year" smoking histories: what about patients who use loose tobacco? *Tobacco control*. 2005;14(2):141-2.
17. Sampaio Hde C, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta cytologica*. 1999;43(2):117-20.
18. Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS. Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers' normal buccal mucosa. *Tobacco induced diseases*. 2004;2(1):43-9.
19. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 2004;26(3):175-80.
20. Selvi B, Demirtas H, Eroz R, Imamoglu N. Reduction of the argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis with age in buccal epithelial cells of healthy individuals. *Aging clinical and experimental research*. 2015;27(2):201-8.
21. Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*. 2003;25(3):139-46.
22. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez ME, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Medicina oral : organo oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal*. 2004;9(3):197-203.

23. Sharma A, Saxena S. Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2012;23(2):251-6.
24. Jindal S, Chauhan I, Grewal HK. Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organiser regions and micronuclei. *Journal of cytology / Indian Academy of Cytologists*. 2013;30(3):174-8.
25. van Oijen MG, Gilsing MM, Rijkssen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral oncology*. 1998;34(4):297-303.
26. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *International journal of epidemiology*. 2010;39(1):182-96.
27. Ahmed HG, Babiker AE. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to toombak and smoking. *Rare tumors*. 2009;1(1):e18.
28. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2004;34(2-3):233-8.
29. Carrard VC, Pires AS, Mendez M, Pasquali MA, Badauy CM, Lauxen IS, et al. Exploring the mechanisms of alcohol-related damage in oral mucosa - is oxidative stress associated with the increase in cell proliferation in rat tongue epithelium? *Pharmaceutical biology*. 2013;51(2):160-9.
30. Lopez-Blanc SA, Collet AM, Gandolfo MS, Femopase F, Hernandez SL, Tomasi VH, et al. Nucleolar organizer regions (AgNOR) and subepithelial vascularization as field cancerization markers in oral mucosa biopsies of alcoholic and smoking patients. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(5):747-53.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É consenso na literatura que a citopatologia apresenta vantagens no método de investigação do câncer bucal. Sua eficácia é ainda maior quando associada à técnicas quantitativas, possibilitando detectar alterações celulares prévias em indivíduos de risco para o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas ou mesmo já portadores de câncer. Dentre estas técnicas, está a avaliação da velocidade de proliferação das células, que pode ser detectada pela quantificação das AgNOR. Deste ponto de vista busca-se associar a técnica de AgNOR às coletas citopatológicas como uma ferramenta para o acompanhamento/rastreamento de indivíduos expostos a carcinógenos.

O tabaco é um dos principais fatores etiológicos do câncer bucal, e uma das formas de prevenção desta neoplasia é a suspensão da exposição aos fatores de risco, como o tabaco. Sendo assim, o estudo se propôs a avaliar o efeito da suspensão do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação das células descamadas da mucosa bucal saudável. Indivíduos fumantes, não fumantes e em abandono do vício foram avaliados, ao longo de 30 meses, através da citopatologia associada à técnica de AgNOR.

No decorrer do estudo observamos que há uma variabilidade na velocidade de proliferação das células descamadas da mucosa bucal em todos os grupos avaliados. Porém essa variação é maior no grupo abandono de fumo, devido a uma resposta momentânea à sua cessação, seguida do retorno à velocidade anteriormente apresentada. O que sugere que o fumo exerce um efeito sobre a velocidade de proliferação das células descamadas da mucosa bucal ao longo do tempo.

Estudos longitudinais, multicêntricos, com maior tempo de acompanhamento, amostras maiores e representativas da população, controle de agentes carcinógenos e avaliação de outras condições bucais, são necessários para o melhor entendimento do efeito

do abandono do fumo sobre a velocidade de proliferação das células descamadas da mucosa bucal, a fim de determinar valores limites que indiquem alterações da normalidade e as diferenciem de alterações pré-malignas e malignas.

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA

Faculdade de Odontologia da UFRGS – Laboratório de Patologia

Ficha Clínica – Citopatologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492/ sala 503 Fone: (51) 3316-5023 Porto Alegre CEP 90035-003

Nº de Registro: _____ Data: _____

Nome do Paciente: _____

Nome da Mãe: _____

Data de Nascimento: ___/___/_____ Sexo: F M Raça: _____

Estado civil: _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefones: _____/_____

e-mail: _____ Origem (local de coleta): _____

Nº cartão SUS: _____ Nº Prontuário HCPA: _____

Doenças Sistêmicas: _____

Medicamentos: _____

() Fuma ou () Fumou parou há ____ (anos/meses) quantidade / tipo / tempo:

_____/_____/_____

() Ingera álcool ou () Ingeria parou há ____ (anos/meses) quantidade / tipo / tempo:

_____/_____/_____

Exposição ao sol () sim () não tempo: ____ horas/dia há ____ (meses/anos)

Bebida quente () sim () não tipo: _____ () chimarrão quantidade: ____ (ml)

Presença de lesão clínica () sim () não Diagnóstico Clínico: _____

História clínica: _____

Sítio Anatômico: _____

Coletado por: _____ Tipo de coleta: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ e-mail: _____

Projeto de Pesquisa: _____

Pesquisadores: _____

Ano: _____ Nº de arquivo do Comitê de Ética: _____

PARA SER PREENCHIDO PELO CITOPATOLOGISTA:

Coloração: PAP AgNOR Feulgen MGG Outro _____

Descrição da Lâmina: _____

Diagnóstico Citopatológico: _____

Citopatologista: _____

Revisado por: _____

Observações: _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CASOS

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de **pesquisa estudo do efeito do tabaco sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal – ação da suspensão do uso**, um trabalho conjunto do ambulatório de pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Odontologia da UFRGS para estudar as alterações celulares da ação do fumo sobre as células da mucosa da boca obtidas por raspagem. Estudos realizados previamente sugerem que o hábito de fumar causa alterações na mucosa da boca, entretanto não há estudos que avaliem o efeito da cessação do tabagismo na mucosa da boca.

Para participar do estudo o(a) senhor(a) deverá concordar em responder um breve questionário, realizar um exame clínico da boca e fazer duas pequenas raspagens em dois locais da boca: borda de língua e assoalho da boca. Esta raspagem é feita com uma escova descartável (semelhante a uma escova dental) e dura cerca de 5 minutos. Durante a coleta o (a) senhor (a) pode sentir um pouco de coceira no local. Este procedimento será realizado antes do (a) senhor (a) entrar no grupo para parar de fumar e seis, doze, dezoito, vinte e quatro, trinta e trinta e seis meses após o término do acompanhamento no Grupo de apoio aos fumantes do HCPA, independente se o(a) senhor(a) conseguiu parar de fumar ou manteve o hábito. Além disso, você deverá responder um questionário.

Não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos. Se no seu exame da boca e de raspagem for constatada alguma variação do padrão normal, o(a) senhor(a) será encaminhado para a Faculdade de Odontologia da UFRGS para acompanhamento. Sua participação no estudo é totalmente voluntária, a sua não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante a pesquisa com os pesquisadores responsáveis Dr. Pantelis Varvaki Rados, professor da Faculdade de Odontologia da UFRGS, através do telefone 3308-5427; e Dra. Marli Maria Knorst, médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone: 2101-8241. O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, através do telefone 3359-7640, das 8h às 17h. Este documento é elaborado em duas vias, sendo uma entregue ao participante e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

Nome do paciente _____

Assinatura _____

Nome do pesquisador _____

Assinatura _____

Local e data: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CONTROLES

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa **estudo do efeito do tabaco sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal – ação da suspensão do uso**, um trabalho conjunto do ambulatório de pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Odontologia da UFRGS para estudar as alterações celulares da ação do fumo sobre as células da mucosa da boca obtidas por raspagem. Estudos realizados previamente sugerem que o hábito de fumar causa alterações na mucosa da boca, entretanto não há estudos que avaliem o efeito da cessação do tabagismo na mucosa da boca.

Para participar do estudo o (a) senhor (a) deverá concordar em responder um breve questionário, realizar um exame clínico da boca e fazer duas pequenas raspagens em dois locais da boca: borda de língua e assoalho da boca. Esta raspagem é feita com uma escova descartável (semelhante a uma escova dental) e dura cerca de 5 minutos. Durante a coleta o (a) senhor (a) pode sentir um pouco de coceira no local. Este procedimento será realizado para a verificação do comportamento celular das células da mucosa da boca de indivíduos não fumantes. As raspagens ocorrerão assim que iniciarmos o seu acompanhamento, e aos seis, doze, dezoito, vinte e quatro, trinta e trinta e seis meses seguintes. Além disso, você deverá responder um questionário.

Não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos. Sua participação no estudo não trará benefício direto ao senhor (a), porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros. Se no seu exame da boca e de raspagem for constatada alguma variação do padrão normal, o (a) senhor (a) será encaminhado para a Faculdade de Odontologia da UFRGS para acompanhamento. Sua participação no estudo é totalmente voluntária, a sua não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante a pesquisa com o pesquisadores responsáveis Dr. Pantelis Varvaki Rados, professor da Faculdade de odontologia da UFRGS, através do telefone 3308-5427; e Dra. Marli Maria Knorst, médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone: 2101-8241. O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, através do telefone 3359-7640, das 8h às 17h. Este documento é elaborado em duas vias, sendo uma entregue ao participante e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

Nome do paciente _____

Assinatura _____

Nome do pesquisador _____

Assinatura _____

Local e data: _____

APÊNDICE C – CARTA DE CHAMAMENTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Prezado Sr (a) _____

O Senhor(a) participou da pesquisa “ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL” e não apresenta qualquer alteração em seus exames anteriores. Porém é importante dar continuidade ao acompanhamento e devemos agendar uma coleta de células de sua boca. Lembramos que o exame é indolor, não invasivo e de rápida execução.

Em função disso, tentamos fazer contato telefônico para agendar uma consulta nos dias _____.

Caso haja interesse, solicitamos que faça contato telefônico com a nossa equipe através do telefone (051) 3308.5011 e fale com Professor Vinicius Carrard, Professora Fernanda Visioli ou com Natalia Laureano, que também poderá ser contatada pelo telefone (051) 8302.8988, para agendarmos uma consulta. Reforçamos que esta coleta é muito importante para esta pesquisa, mas que é seu direito deixar de participar.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

ANEXO A – PROTOCOLO TÉCNICA DE AgNOR

TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS AgNORs*

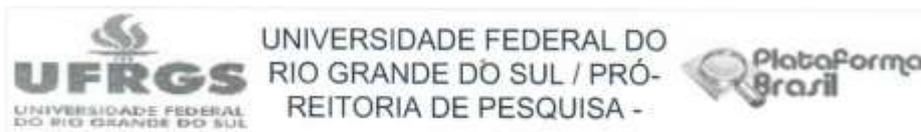
A técnica citoquímica da AgNOR será baseada na técnica descrita por Ploton *et al.*

(1986), e segue os seguintes passos:

- Fixação em álcool etílico 96%;
- Desidratação com álcool etílico absoluto;
- Pós-fixação em uma mistura de álcool etílico-ácido acético (solução 3:1) por 10 minutos
- Lavagem em água destilada;
- Impregnação pela prata, gotejando a solução coloidal sobre as lâminas, colocadas em câmara úmida fechada e levadas à estufa por 20 minutos a 45°C. A solução colóide de prata deve ser preparada, na hora de uso, pela dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, misturada numa proporção de 1:2 partes, com solução aquosa de nitrato de prata em concentração de 50%.
- Duas lavagens em água destilada aquecida a 45 °C, para facilitar a remoção da gelatina e, uma em água destilada na temperatura ambiente.
- Reidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Permount (Fisher ChemAlert®).

*A técnica foi adaptada por Isabel Lauxen e Márcia Oliveira para utilização em esfregaços citológicos da mucosa bucal. O tempo e a temperatura de impregnação pela prata devem ser adaptados de acordo com o tecido em estudo. (Laboratório de Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia da UFRGS. Fone: (051) 3308-5023.E-mail: ppgod@ufrgs.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL 36 MESES

Pesquisador: Pantelis Varvaki Rados

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38464514.9.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 952.897

Data da Relatoria: 11/02/2015

Apresentação do Projeto:

Adequadamente apresentado: todos os documentos necessários à apreciação do protocolo estão apropriadamente apresentados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o reflexo da cessação do consumo de fumo sobre a velocidade de proliferação celular, em células epiteliais descamadas da mucosa bucal ao longo do tempo.

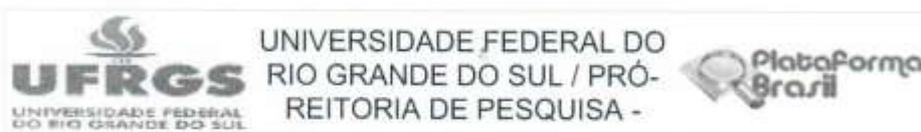
Medir o mAgNOR e pAgNOR dos indivíduos avaliados e compará-los no momento inicial e após 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses de cessação da exposição ao fumo.

Correlacionar dados sobre a saúde bucal (CPOD e doença periodontal) com a velocidade de proliferação dos indivíduos avaliados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente apresentados.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 952.897

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de uma mestranda do programa de Pós-Graduação em Odontologia; linha de pesquisa: câncer bucal.

Os pesquisadores apresentam esta pesquisa como *observacional prospectiva, embora haja intervenção na forma de coleta de material biológico aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses após a primeira.

Amostra de conveniência e a coleta de material se dará nos ambientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Serviço de Pneumologia) e na Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Critérios de inclusão, exclusão e grupo controle: bem definidos.

Três grupos serão avaliados: a-Grupo controle (GC): não fumantes e sem excessos de ingestão de álcool; b- Grupo abandono do fumo (GAF) c- Grupo fumo (GF) Metodologia: Mediante a utilização da escova citológica serão obtidos esfregaços dos seguintes sítios

buciais: borda de língua e mucosa do assoalho de boca. Serão realizados dois raspados em cada sítio selecionado, os esfregaços serão distendidos em lâminas histológicas de vidro, previamente limpas com detergente e água corrente, após fixadas em álcool absoluto 99,3%, e armazenadas em frasco porta lâminas. Duas lâminas serão destinadas à técnica de AgNOR, e as restantes serão reservadas para caso de necessidade de repetição da técnica. Cálculo do tamanho amostral: adequado (24 participantes em cada grupo). Análise estatística: adequadamente apresentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: adequadamente apresentado.

Orçamento: adequadamente apresentado.

Cronograma: adequadamente apresentado.

Recomendações:

É importante ressaltar que, para que o projeto seja realizado, deverá existir apreciação e aprovação prévia pelo CEP-HCPA.

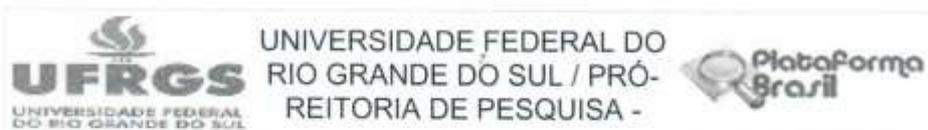
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Eticamente sem restrições na âmbito deste CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farrroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 952.897

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

PORTO ALEGRE, 12 de Fevereiro de 2015

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3736 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br