

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

**CELL PROLIFERATION RATE IN CLINICALLY HEALTHY ORAL MUCOSA OF
CRACK COCAINE USERS**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

PAULA DANIELE MATHEUS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2012

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus amados pais, Donizeti e Rose, por serem exemplos na minha vida, exemplos de carinho, amor, responsabilidade, persistência, sabedoria, compreensão, paciência, enfim, exemplo de ser humano. Agradeço por serem os melhores pais do mundo, que me apoiaram nas alegrias e nas tristezas, nos momentos felizes e nas dificuldades, e principalmente, por saber que sempre estarão comigo porque o amor que sinto deles e sinto por eles é incondicional. Sou muito grata a Deus por ser filha de vocês, amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Guilherme e André, que me ensinaram que brigas de irmãos sempre ocorrem, mas que são bobas e com o tempo isso passa e se torna irrisório perto do carinho que sentimos um pelo outro. Mesmo longe, é bom saber que tenho vocês.

À minha família, avôs, avós, tios, tias, primos, primas e cunhadas, que contribuiu com minha educação e se estou aqui hoje escrevendo estes agradecimentos é porque cada um teve um pedacinho nessa estória, obrigada meu Deus por uma família tão maravilhosa.

Ao meu namorado, Marco, que fez com que meus últimos meses de mestrado se tornassem mais leves e fáceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Santa`Ana Filho, hoje reconheço e valorizo a importância de cada puxão de orelha, de cada conselho, de cada ensinamento, vejo, também, como é linda a forma como o senhor tem paixão em ensinar. A sua maneira intensa, dedicada e responsável ao magistério nos estimula a persistir e buscar sempre mais, pois professores como o senhor, onde a sabedoria é tão grande quanto à humanidade, nos dá segurança e nos mantém focados nos nossos objetivos. Obrigada pela oportunidade.

À querida Isabel Lauxen, Belzinha, pelo exemplo de dedicação, pelo exemplo de liderança, pelo exemplo de inteligência e, principalmente, pelo exemplo de educação e humanidade, sempre disposta a ajudar, sempre com o coração aberto. Obrigada pela participação nesta dissertação, pela paciência nas minhas dificuldades.

Ao prof. Dr. Vinícius Carrard pelo seu exemplo de amor e dedicação pelo que faz, pelas inúmeras vezes que, com toda sua paciência, esteve disposto a ajudar a resolver as diversas dúvidas que surgiram no caminho. Mais que um professor, foi um co-orientador nesta etapa final do mestrado. Obrigada por dedicar, noites e noites de sono, ao este trabalho. Agradeço, não apenas, a colaboração a este trabalho, mas também, a colaboração ao meu crescimento pessoal, contigo aprendi e cresci muito, obrigada de coração.

Ao prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados por ser um exemplo de professor e dedicação. Agradeço por todos os ensinamentos durante esses dois anos.

À professora Dra. Manoela Martins, que me ensinou muito de patologia, ensinou-me mais ainda a ter foco, a se dedicar integralmente ao trabalho, a buscar sempre o melhor para ensinar os alunos, a ter responsabilidade. Mas, além disso, mostra-se um exemplo de pessoa, exemplo de mulher, querida, simpática, humana, justa... As qualidades são inúmeras.

À professora. Dra. Márcia Gaiger de Oliveira pela sua tranqüilidade em transmitir conhecimentos, sempre com bom humor.

Ao professor Dr. Marco Antônio Martins, pelo exemplo de responsabilidade, sabedoria e descontração.

Ao professor Dr. Marcelo Lazzaron Lamers, pelo exemplo de dedicação, pelo exemplo de sabedoria, simpatia e pelos ensinamentos fundamentais e valiosos.

Aos professores Dr. Fábio Herrmann Coelho de Souza e Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing por suas colaborações na elaboração deste projeto.

Aos professores do curso de mestrado por todos os ensinamentos.

À minha querida amiga Chris que colaborou com que meus dias ficassem mais alegres. Um exemplo de mulher, uma ótima conselheira, uma pessoa agradabilíssima, mas mais que tudo isso, uma ótima amiga, sempre disposta a ajudar e com um sorriso lindo no rosto. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À minha querida amiga Alessandra, pela dedicação ao laboratório de patologia, pelo profissionalismo e, principalmente, pela dedicação a esta pesquisa. Uma pessoa serena, querida, simpática, mas sempre preocupada com o bem-estar dos outros, me fazia muito bem um simples “tudo bem contigo?”.

À Adriana Aguiar e Daniele, por todo auxílio, simpatia e colaboração nos assuntos burocráticos.

À Claudinha Freire, pela amizade e pela ajuda com os assuntos da pós-graduação. Sinto saudades, mas sei que está feliz em Brasília.

Às colegas Adriana Inchausti Jou, Laura Hildebrand, Ana Luisa Homem de Carvalho e Francinne Miranda pela ajuda e ensinamentos nesta minha trajetória. Agradeço o companheirismo e a companhia do dia-a-dia da patologia.

À colega Fernanda Visioli pelo exemplo de dedicação, inteligência, cuidado, educação e, principalmente, pela tranquilidade que transmite. Agradeço as vezes que, com toda graciosidade, não hesitou em colaborar com as coletas dos pacientes da Cruz Vermelha.

À amiga Millane de Lira Godói, uma pessoa marcante e inigualável. Boa de coração, dedicada a Deus e sua família. Obrigada por ter feito meus dias melhores e mais divertidos, sinto carinho de irmã por ti, te quero muito bem.

À querida Ana Carolina, exemplo de responsabilidade, carinho e sabedoria, você me acolheu com muito carinho, foi inesquecível, obrigada. E claro, agradeço o companheirismo do dia-dia da “Cruz”, você foi essencial a execução deste trabalho.

Aos colegas recém-chegados, Viviane, Bruna, Bernardo, Carol, Arthur e Thaíse, pelo empenho.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

Às colegas da graduação, Liana Webber, Marina Curra, Nicole Marchioro, Natália Cimadon, Gabriela Walter da Luz, Isadora Klein e Vivian Petersen Wagner, que de alguma forma colaboraram com este trabalho e com minha formação, muito obrigado.

Às psicólogas e psicoterapeutas da Cruz Vermelha, em especial a Letícia Cheuiche, sua ajuda foi fundamental, muito obrigada.

Às minhas amigas Deisi Damin e Francine Kley, pela amizade dedicada com tanto cuidado e carinho.

A todos os amigos de perto e de longe que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Às bibliotecárias da FO – UFRGS por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar minha formação de pós-graduação e a Cnpq por ter financiado este estudo.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a taxa proliferativa de células esfoliadas da mucosa bucal clinicamente saudável de usuários de crack. Material e Métodos: esfregaços orais foram coletados de língua e assoalho bucal de 87 indivíduos, divididos em três grupos: os usuários de crack (CRCO), n = 26; fumantes / etilistas (SA), n = 26 e controles (C), n = 35. Lâminas histológicas foram submetidas à técnica de impregnação pela prata para quantificação do número de AgNORs/núcleo. As imagens foram obtidas por um sistema de captura de imagem adaptado a um microscópio de luz em x1000 ampliação. A média AgNOR por núcleo (mAgNOR) e a percentagem de células com mais de 1,2,3 e 4 AgNORs por núcleo (pAgNOR > 1, > 2, > 3 e > 4) foram calculados. Resultados: As células esfoliadas de mucosa da língua SA ($3,34 \pm 0,51$ AgNOR / núcleo) exibiram maior taxa de proliferação celular ($p < 0,05$) quando comparado com C ($2,81 \pm 0,773$ AgNORs / núcleo) e CRCO ($2,87 \pm 0,51$ AgNORs / núcleo). Um aumento ($p < 0,05$) da mAgNOR também foi observada nas células do assoalho bucal ($3,55 \pm 0,57$) em comparação com SA C ($3,18 \pm 0,53$) e CRCO ($3,28 \pm 0,39$). Dados semelhantes foram encontrados usando pAgNOR > 1, > 2, > 3 e > 4. Conclusão: usuários de crack não apresentaram alterações na taxa proliferativa celular da mucosa bucal. Diante dos dados apresentados, o consumo de cigarro, em combinação com o consumo de álcool, continua sendo o maior fator prejudicial à mucosa bucal.

Palavras-chave: crack, proliferação celular; mucosa bucal; drogas ilícitas.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate cell proliferation rate of cells exfoliated from clinically healthy mucosa of crack cocaine users. **Material and Methods:** Oral smears were collected from tongue and floor of the mouth mucosa of 87 individuals divided into three groups: crack cocaine users (CrCo), n=26; smokers/alcohol drinkers (SA), n=26 and controls (C), n=35. Histological slides were silver-stained using AgNOR technique to evaluate cell proliferation rate. Images were obtained by an image capturing system adapted to a light microscope at x1000 magnification. Quantification considered 50 cells by smear in which the number of AgNOR dots was visually counted. Mean AgNOR numbers per nucleus (mAgNOR) and the percentage of cells with more than 1,2,3 and 4 AgNORs per nucleus (pAgNOR>1,>2,>3 and >4) were calculated. **Results:** Cells exfoliated from tongue mucosa of SA (3.34 ± 0.51 AgNOR/nucleus) exhibit higher cell proliferation rate ($p < 0.05$) when compared to C (2.81 ± 0.773 AgNORs/nucleus) and to CrCo (2.87 ± 0.51 AgNORs/nucleus). An increase ($p < 0.05$) in mAgNOR was also observed in floor of the mouth cells (3.55 ± 0.57) in SA when compared to C (3.18 ± 0.53) and CrCo (3.28 ± 0.39). Similar findings were found using pAgNOR>1,>2,>3 and >4. **Conclusion:** Crack cocaine users did not present changes in cell proliferation rate of oral mucosa. Between the expositions studied here, cigarette smoking in combination with alcohol consumption remain as the most harmful factors to oral mucosa.

Keywords: crack cocaine; cellular proliferation; mouth mucosa; drug addiction; illicit drugs.

SUMÁRIO

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	9
OBJETIVOS.....	12
REFERÊNCIAS.....	13
ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
FIGURAS.....	21
3. RESULTADOS.....	22
TABELAS.....	23
4. DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
APÊNDICES.....	46
ANEXOS.....	52

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna de origem epitelial mais comum na boca e se caracteriza por ter crescimento rápido e invasivo. Esta neoplasia está associada a diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, que provocam alterações nos eventos de proliferação, morte e diferenciação celular. Os principais fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento são os consumos de fumo e álcool (FRANSCESCHI *et al.*, 1990; BATISTA *et al.*, 2008; MARRON *et al.*, 2009).

Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que parece atuar como um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação (protooncogenes) e morte celular (genes supressores de tumor - antioncogenes), o que, por si só, poderia levar ao aparecimento da doença. Ainda que a exposição ao fumo, associada ao álcool, tenha mostrado efeito multiplicador no risco estimado para o desenvolvimento da doença (OGDEN, WIGHT, 1998; OGDEN, WIGHT, RICE, 1999), alguns estudos procuraram verificar o efeito do consumo de álcool na mucosa bucal de forma independente. Carrard *et al.* (2004) avaliaram a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa lingual de camundongos frente à ação do etanol a 40°GL, a partir da aplicação tópica e ingestão. Os animais foram biopsiados no início, aos 6 e 12 meses de experimento. Esse estudo mostrou que a ingestão de álcool a 40°GL provoca um aumento da proliferação celular na mucosa bucal.

Em relação aos efeitos de outros agentes externos sobre a mucosa há pouco conhecimento. Nesse contexto, insere-se o crack, droga cujo consumo tem-se difundido muito nos últimos anos. Fligel *et al.* (1997) conduziram uma análise histopatológica de biópsias de mucosa traqueobronquial de fumantes de crack. Constataram que o consumo de crack estava relacionado com diversas alterações, tais como, hiperplasia das células basais, alteração da estratificação epitelial, pleomorfismo nuclear, espessamento da membrana basal e presença de inflamação. Adicionalmente, observaram aumento da imunomarcagem do Ki67 e do fator de crescimento epidermal (EGF), bem como aumento da ploidia, indicando efeito mitogênico e sugerindo que esta droga teria potencial carcinogênico.

Woyceichoski *et al.* (2008) analisaram os efeitos do crack nas células epiteliais esfoliadas da mucosa jugal. A partir de uma análise citomorfométrica, observaram que o consumo de crack induziu redução da área nuclear e da relação núcleo/citoplasma. Este resultado sugere que o consumo de crack induz o aumento da ceratinização da mucosa, reforçando achados produzidos previamente por Lima *et al.* (2007) em estudo similar.

Lima *et al.* (2010), com base na quantificação dos micronúcleos (MN), avaliaram o efeito genotóxico do álcool, do fumo e de drogas como o crack sobre a mucosa lingual. Seus resultados mostraram aumento, não estatisticamente significativo, do número total de MN nos raspados dos pacientes que fumavam crack e/ou fumavam tabaco ou, ainda, que consumissem bebidas alcoólicas. Os resultados deste trabalho apontam para a necessidade de mais estudos com este grupo de indivíduos, uma vez que estes usualmente associam fumo e álcool com crack, o que potencialmente resulta em efeito sinérgico dos diferentes agentes.

O emprego da citologia esfoliativa tem permitido que se estude a influência de fatores de risco (fumo, álcool e crack) no epitélio bucal em humanos, em especial, utilizando a análise de proliferação destas células. Cançado *et al.* (2001) e Sampaio *et al.* (1999) demonstraram, por meio desta técnica, que o consumo de fumo induz um aumento na taxa proliferativa das células da mucosa bucal. Adicionalmente, apontaram que a quantidade de cigarros e o tempo de exposição ao fumo não provoca alteração na variação do número de AgNORs por núcleo. A avaliação longitudinal destes pacientes (GEDOZ *et al.*, 2007), por meio de esfregaços, mostrou progressivo aumento da atividade proliferativa, indicando que o método de avaliação utilizado (quantificação das AgNORs) é um método útil para monitoramento de pacientes expostos.

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico e estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21, 22. AgNORs são proteínas que têm afinidade pela prata relacionadas ao nucléolo. Está bem demonstrado, por Derenzini *et al.* (2000), que a quantidade de AgNORs aumenta em células com maior atividade proliferativa. Diferentemente da maioria dos marcadores de proliferação, que indicam apenas se uma célula está ou não se dividindo, a técnica de AgNOR permite diferenciar, entre as células que estão proliferando, aquelas que o fazem mais rapidamente (DERENZINI *et al.*, 2000).

Diante do que foi exposto, pode-se sugerir que o consumo de crack modifica o processo de renovação do epitélio da mucosa bucal, principalmente ao induzir o aumento de ceratinização (LIMA *et al.*, 2007), as alterações na morfologia celular (WOYCEICHOSKI *et al.*, 2008) e a frequência de micronúcleos (LIMA *et al.*, 2010). Na medida em que se sabe que os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca estão associados ao aumento da proliferação celular de células esfoliadas da mucosa clinicamente normal (PAIVA *et al.*, 2004; GEDOZ *et al.*, 2007), o qual consiste em uma etapa importante na progressão tumoral (MACLUSKEY *et al.*, 1999), torna-se importante o estudo do efeito do crack na proliferação celular da mucosa bucal.

OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos do crack sobre a taxa proliferativa do epitélio bucal.

REFERÊNCIAS

BATISTA JL, ANES RAA, RODRIGUES LC. Smoking increases the risk of relapse after successful tuberculosis treatment. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 4, p.841 – 851, 2008.

CANÇADO 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**, v.37, n.5, p.446-454, 2001.

CARRARD VC, FILHO MS, RADOS PV, CHAVES AC, LAUXEN IS. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. **Alcohol**, v.34, n.2-3, p.233-238, 2004.

DERENZINI M. *et al.* Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissue. **Journal of Pathology**, Chichester. v.191, n. 2, p. 181-186, 2000.

FLIGIEL SE, ROTH MD, KLEERUP EC, BARSKY SH, SIMMONS MS, TASHKIN DP. Tracheobronchial histopathology in habitual smokers of cocaine, marijuana, and/or tobacco. **Chest**, v.112, n.2, p. 319-326, 1997.

FRANCESCHI S, TALAMINI R, BARRA S, BARON AE, NEGRI E, BIDOLI E. *et al.* Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. **Cancer Research**, v. 50, n. 20, p. 6502-6507, 1990.

GEDOZ L *et al.* 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**, v. 29, n. 4, p. 231-238, 2007.

LIMA AAS, WOYCEICHOSKI IEC, BATISTA AB, GREGIO AMT, IGNACIO AS, MACHADO MAN, *et al.* Cytopathological changes in oral epithelium induced by crack cocaine smoking. **Pharmacologyonline**, v.1, p.31-40, 2007.

LIMA CF *et al.* Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 6, p. 441-446, 2010.

MACLUSKEY M, OGDEN GR, GREEN M, CHISHOLM DM, SCHOR SL, SCHOR AM. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol**, v.35, n.4, p. 409-414, 1999.

MARRON M *et al.* Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. **International Journal of Epidemiology**, v.39, n. 1, p. 182-196, 2009.

OGDEN GR, WIGHT AJ. A etiology of oral cancer: alcohol. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.

OGDEN GR, WIGHT AJ, RICE P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **Jornal of Oral Pathology and Medicine**, v. 28, n. 5, p. 216-220, 1999.

PAIVA RL, SANT'ANA FILHO M, BOHRER PL, LAUXEN IS, RADOS PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.

SAMPAIO HC, LOYOLA AA, GOMES RS, MESQUITA RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Acta Cytologica**, n. 43, p. 117-120, 1999.

WOYCEICHOSKI IEC. *et al.* Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. **Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 105, n. 6, p. 745-749, 2008.

ARTIGO

**CELL PROLIFERATION RATE IN CLINICALLY HEALTHY ORAL MUCOSA OF
CRACK COCAINE USERS**

Artigo apresentado de acordo com as normas da revista: ORAL ONCOLOGY

1. Introduction

Tobacco smoking and alcohol consumption are the main risk factors for oral cancer¹⁻³. After decades of studies focused in improvement of treatment approaches high mortality rates are still observed⁴. Probably, one of the most important reasons is the delay in detection of lesions, which are often detected in advanced stages⁵.

Some studies have employed oral cytopathology to assess the effects of tobacco and alcohol in clinically healthy oral mucosa. It has been demonstrated that they modify epithelial maturation process⁶⁻⁸, cell proliferation⁹⁻¹⁴ and also induce nuclear changes¹⁵⁻¹⁶.

Lifestyle of population is changing and the consumption of some drugs, particularly crack-cocaine is increasing¹⁷. Few studies evaluate the effect of crack-cocaine use in oral mucosa¹⁸⁻¹⁹. Woyceichoski et al.¹⁸ found that illicit drugs use caused cytomorphometric changes compatible with increase in the keratinization of oral mucosa. On the other hand, significantly changes in DNA, particularly micronucleus occurrence were not observed¹⁹. It is well-known that tumor progression in the oral mucosa is accompanied by increase in epithelial proliferation²⁰⁻²¹. However, no studies evaluated the cell proliferation on oral mucosa in crack users.

AgNORs are proteins associate to regulation of RNAr transcription²²⁻²³. These proteins are closely related to nucleolar organizer regions (NORs)²⁴. It may be observed as black dots in a brown-yellowish nucleus by a silver-staining method (AgNOR's technique)²²⁻²³. Several studies consistently supported that the amount of AgNORs dots is strongly related to cell proliferation rate, informing about rapidity of proliferation along cell cycle²⁵⁻²⁶.

The primary aim of the present study was to assess cell proliferation rate in oral mucosa cells of crack-cocaine users, based on the hypothesis that crack-cocaine use may induce changes on this process. The secondary aim was to assess the influence of demographics, alcohol and smoke exposition and also oral health condition and removable prosthesis use as additional factors.

2. Patients and methods

The present study has followed the ethical guidelines of the Brazilian Resolution 196/1996 and Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the local Ethics Committee and all patients signed an informed consent form previously.

2.1 Patients

This was a cross-sectional study, whose sample was comprised by 87 subjects. The sample was selected from August 2010 to April 2012. The experimental groups was separated as follows: (1) Crack cocaine users (CrCo): 26 adult (24 males and 2 females) crack users who were attending to chemical dependency treatment group (experimental group) at International Federation of Red Cross (Cruz Vermelha/RS) at Porto Alegre/RS; (2) Smokers/Alcohol drinkers (SA): 26 adults (16 males and 10 females), alcoholics, smokers, crack non-users who were attending to tobacco dependency program at Cruz Vermelha; and (3) Control (C): 35 adult (17 males and 18 females), crack non-users, non-smokers, who drank less than 2 dosis of alcohol by week (28g) treating at School of Dentistry – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

Exclusion criteria were: history of malignant oral tumors and presence of visible oral lesions. The sample size was based on previous oral cytopathology studies with smokers and alcoholics, which usually have included about 25 subjects by group.

2.2 Questionnaire and oral examination

Each subject was interviewed by means a structured questionnaire concerning age, race, monthly incomes, educational level, removable prosthesis use, alcohol and smoke consumption and relevant medical history. Monthly incomes were expressed in US\$, considering the conversion rate of 1US\$=2.01R\$. This variable was classified as low (\leq US\$249), middle (US\$ 250-497) and high ($>$ US\$498). Educational levels were classified according Brazilian educational system as follows: elementary school (less than 9 years), secondary school (between 10 and 13 years) and higher education (more than 14 years).

The total exposure to cigarette smoking was calculated. The total number of pack years consumed in a lifetime was calculated as the number of cigarettes consumed per day, multiplied by the number of years of habit, divided by 20 (1 pack). Subjects were classified into four groups²⁷: non-smokers (0 packyears), light ($>0-7.5$ packyears), moderate ($>7.5-20$ pack years), and heavy smokers (>20 packyears).

Daily alcohol consumption was calculated by multiplying the number of drinks consumed per week by the average content of alcohol in a glass of beer, wine, or cachaça (a typical Brazilian distilled alcoholic beverage made from sugar cane) divided by 7 days. The amount of alcohol by volume was estimated to be 10 ml in a glass of beer, 12 ml in a glass of wine, and 10 ml in a drink of cachaça. Alcohol by volume was converted to alcohol by weight using a conversion factor of 0.8. Drinkers were classified into four groups²⁷: non-drinkers (0 g / day), light ($>0-2$ g / day), moderate ($>2-6$ g / day), and heavy drinkers (>6 g / day). Since age, exposure to tobacco and to alcohol are factors that may modify cell proliferation, these variables were compared between groups to avoid any bias.

The consumption of other drugs was assessed using ASSIST²⁸ (Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test) a specific questionnaire recommended for the World Health Organization (WHO).

Furthermore, they were subjected to extra- and intraoral clinical examination in order to identify oral mucosal lesion and briefly classify them in terms of oral health conditions according the following criteria¹⁹: poor – presence of residual roots, loss of various teeth and advanced periodontal disease; regular – presence of caries and tartar but loss of few teeth), good – many restorations without caries and tartar and very good – absence of caries restorations or tartar.

2.3 Collection of cells and slide preparations

Previously to sample collection, patients were oriented to take off the removable prosthesis and rinse the mouth with filtered water for 1 minute.¹⁶ Then, smears were collected from lateral tongue border and floor of the mouth mucosae using cytobrushes. The sample was spread onto histological slides and fixed in 100% ethanol. After, the slides were submitted to AgNOR staining according to protocol proposed by Ploton et al.²⁹ Images from each slide were recorded using a digital camera Olympus® (model Qcolor 5, Coolet, RTV) adapted to a binocular light microscope (Olympus Optical Co. model CX41RF) and to a Dell computer (Dimension 5150). The images were captured using the software Qcapture® (version 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005) and the microscope was set at magnification x 1000 with immersion oil. The first 50 well spread and nonoverlapping nucleated cells (Figure 1) were considered.¹¹

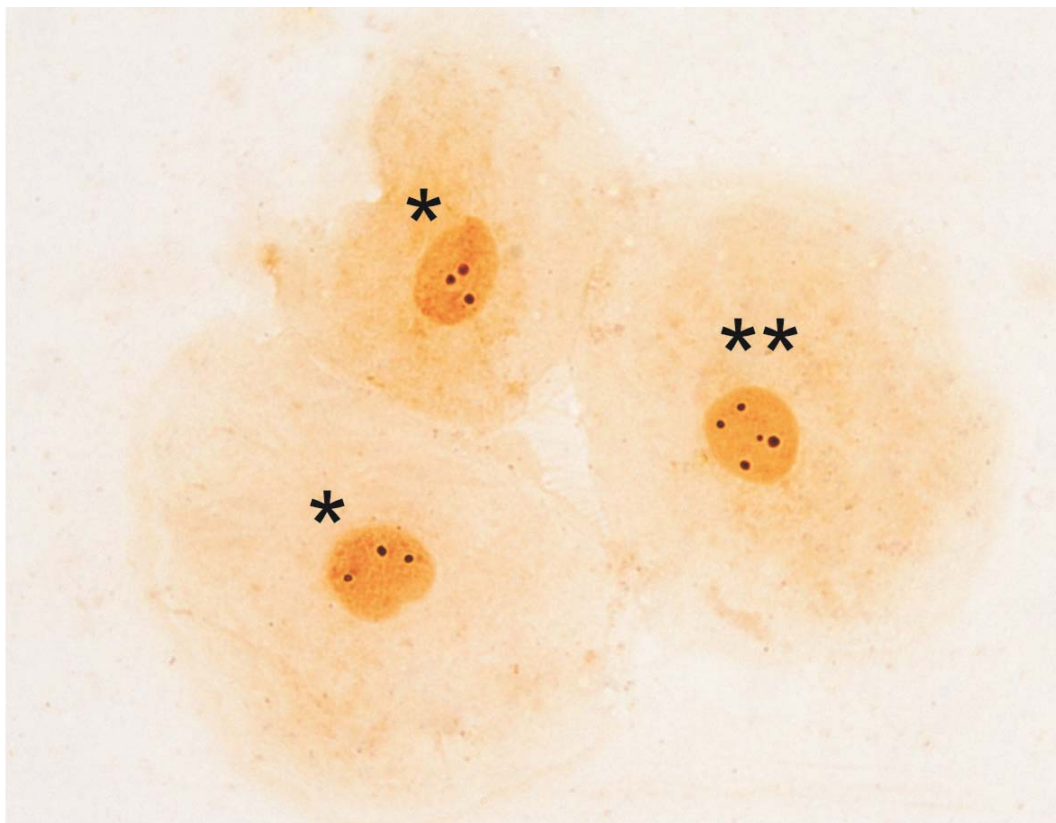


Figure 1. Epithelial cells from tongue border of AS patient presenting 3 (*) and 5 (**) AgNORs. (AgNOR technique, original magnification X1000).

Based on recorded images, the number of AgNOR per nucleus (mAgNOR) was visually counted.¹⁰⁻¹¹ In addition, the percentage of cells with more than 1, 2, 3 e 4 AgNORs/nucleus (pAgNOR>1, pAgNOR>2, pAgNOR>3, pAgNOR>4), were calculated according method recommended by Xie et al³⁰.

2.4 Statistical analysis

Data distribution was analyzed using Shapiro-Wilk test. Parametric tests (Student t test or ANOVA/Tukey) were used when the data followed a Gaussian distribution. When the data did not follow a Gaussian distribution, Kruskal-Wallis, followed by Dunn's multiple comparison tests were used. The level of significance was defined as 5%.

3. Results

Two subjects were not included in study due to presence of oral lesions (ossifying fibroma and leukoplakia). These patients were referred to Stomatology Service Unit at School of Dentistry – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. One patient refused to participate in study. One histological slide from tongue mucosa of one crack group subject was discarded, because it didn't present the required number of cells.

Table 1 depicts the study sample according different variables. Age was similar between the groups ($p=0.113$, ANOVA). It was observed that in both test groups males were more frequent (SA = 61.54% e CrCo = 92,31%).

In relation to educational level, SA and CrCo showed higher proportion of subjects with less than 9 years of study (57.69% and 53.85%, respectively). Few patients in C (2.86%) present poor oral health conditions when compared to SA and CrCO (46.15% and 34.61%, respectively).

Table 1. Description of the sample according to demographics, oral health conditions and removable prosthesis use

Variable	Control n=35	Smoker/alcohol drinker n=26	Crack cocaine user n=26
Age			
Mean (SD)*	40,94 (11,02)	45,85 (10,01)	39,62 (12,79)
Age group			
21 – 33 (n=25)	37,14%	11,54%	34,61%
34 – 47 (n=33)	31,43%	42,31%	42,31%
48 + (n=29)	31,43%	46,15%	23,08%
Total (n=87)	100%	100%	100%
Gender			
Male (n=57)	48,57%	61,54%	92,31%
Female (n=30)	51,43%	38,46%	7,69%
Total (n=87)	100%	100%	100%
Race			
White (n=70)	82,86%	88,46%	69,23%
Non-white (n=17)	17,14%	11,54%	30,77%
Total (n=87)	100%	100%	100%
Monthly incomes (US\$)			
No incomes (n=5)	2,86%	-	15,38%
Low (n=19)	14,29%	30,77%	23,08%
Middle (n=27)	28,57%	34,62%	30,77%
High (n=20)	17,14%	26,92%	26,92%
Missing data (n=16)	37,14%	7,69%	3,85%
Total (n=87)	100%	100%	100%
Educational level			
Elementary school (n=37)	22,86%	57,69%	53,85%
Secondary school (n=29)	48,57%	15,38%	30,77%
Higher education (n=12)	5,71%	23,08%	15,38%
Missing data (n=9)	22,86%	3,85%	-
Total (n=87)	100%	100%	100%
Oral health conditions			
Poor (n=24)	2,86%	46,15%	34,61%
Regular (n=47)	68,57%	34,62%	50%
Good/Very good (n=16)	28,57%	19,23%	3,85%
Missing data (n=3)	-	-	11,54%
Total (n=87)	100%	100%	100%
Removable prosthesis			
Non-user (n=73)	94,29 %	61,54%	92,31%
User (n=14)	5,71%	38,46%	7,69%
Total (n=87)	100%	100%	100%

p=0,113 (ANOVA).

In table 2, SA and CrCo were compared in relation to tobacco, alcohol and other illicit drugs exposition. SA had more exposition to smoking when duration and cumulative exposure (pack years) were taken into account. No statistically significant differences were observed regarding alcohol consumption.

Table 2. Characteristics of SA and GCr according to exposition to tobacco, smoking, alcohol and other drugs.

Exposition	Smoker/alcohol drinker n=26	Crack cocaine user n=26	p
Smoking			
Cigarretes/day			
Mean (SD)	23,54 (14,61)	20,16 (15,69)	0,43 ^a
Duration (years)			
Mean (SD)	27,46 (11,11)	18,32 (8,55)	<0,01 ^a
Pack-Years**			
Mean (SD)	34,85 (29,30)	18,21 (17,37)	0,02 ^a
Smoking status			
Light (n=17)	23,08	42,31%	
Moderate (n=12)	19,23%	26,92%	
Heavy (n=22)	57,69%	26,92%	
Missing data (n=1)	-	3,85%	
Total (n=52)	100%	100%	
Alcohol			
Amount (g/day)			
Mean (SD)	27,52 (24,29)	73,28 (125,22)	0,08 ^a
Duration (years)			
Mean (SD)	21,04 (10,09)	15,92 (10,80)	0,08 ^a
Alcohol drinking status			
Light(n=18)	38,46%	30,77%	
Moderate (n=14)	23,08%	30,77%	
Heavy (n=20)	38,46%	38,46%	
Total (n=52)	100%	100%	
Other drugs use			
Cannabis			
Lifetime	73,08%	100%	
Last 3 months	30,77%	46,15%	
Cocaine			
Lifetime	57,69%	84,62%	
Last 3 months	15,38%	34,62%	
Amphetamine-type stimulants			
Lifetime	15,38%	46,15%	
Last 3 months	3,85%	3,85%	
Inhalants			
Lifetime	23,08%	57,69%	
Last 3 months	0%	0%	
Sedatives and sleeping pills			
Lifetime	42,31%	42,31%	
Last 3 months	19,23%	3,85%	
Hallucinogens			
Lifetime	34,62%	38,46%	
Last 3 months	0%	3,85%	

* Student t test.

The AgNOR quantification in tongue and floor of the mouth cells are shown in Table 3 and Table 4, respectively. When compared to other groups, the majority of evaluated parameters for the tongue mucosa cells presented higher values in SA. Regarding the floor of the mouth cells, an increased amount of AgNORs was found in SA in relation to C, but not statistically higher than CrCo.

Table 3. Distribution of mAgNORs and pAgNOR values on exfoliated cells from the tongue mucosa.

Parameter	n	Means (SD) / Mean rank	p
mAgNOR			
Control	35	2,81 (0,73) ^a	<0,01*
Smoker/alcohol drinker	26	3,34 (0,51) ^b	
Crack cocaine user	25	2,87 (0,51) ^a	
pAgNOR>1			
Control	35	34,81 ^a	<0,01†
Smoker/alcohol drinker	26	60,56 ^b	
Crack cocaine user	25	37,92 ^a	
pAgNOR>2			
Control	35	55,37 (22,38) ^a	<0,01*
Smoker/alcohol drinker	26	76,00 (13,65) ^b	
Crack cocaine user	25	59,76 (16,68) ^a	
pAgNOR>3			
Control	35	25,77 (21,96) ^a	0,01*
Smoker/alcohol drinker	26	40,46 (17,95) ^b	
Crack cocaine user	25	28,24 (15,57) ^{ab}	
pAgNOR>4			
Control	35	36,40 ^a	<0,01†
Smoker/alcohol drinker	26	57,33 ^b	
Crack cocaine user	25	39,06 ^a	

*ANOVA/Tukey. †Kruskal-Wallis/Dunn. Values followed by different letters are different from each other. One histological slide was discarded due to technical reasons.

Table 4. Distribution of mAgNORs and pAgNOR values on exfoliated cells from the floor of the mouth mucosa.

Parameter	n	Means (SD) / Mean rank	p*
mAgNOR			
Control	35	3,18 (0,53) ^a	0,02*
Smoker/alcohol drinker	26	3,55 (0,57) ^b	
Crack cocaine user	26	3,28 (0,39) ^{ab}	
pAgNOR>1			
Control	35	38,66	0,15*
Smoker/alcohol drinker	26	50,90	
Crack cocaine user	26	44,29	
pAgNOR>2			
Control	35	73,31 (16,17)	0,05*
Smoker/alcohol drinker	26	81,77 (10,68)	
Crack cocaine user	26	78,62 (11,73)	
pAgNOR>3			
Control	35	35,14 (18,71) ^a	0,02*
Smoker/alcohol drinker	26	48,31 (19,98) ^b	
Crack cocaine user	26	37,69 (15,58) ^{ab}	
pAgNOR>4			
Control	35	35,33 ^a	0,02†
Smoker/alcohol drinker	26	52,77 ^b	
Crack cocaine user	26	46,90 ^{ab}	

*ANOVA/Tukey. †Kruskal-Wallis/Dunn.

In tables 5 and 6, the influence of different variables, such as demographics, exposition to smoking and alcohol, as well as oral health conditions and removable prosthesis use was assessed. In SA, females had higher AgNOR values than males.

In relation to race, non-whites display higher mAgNOR when compared whites in cells obtained from tongue mucosa of SA group.

Moreover, poor hygiene was associated to higher cell proliferation, particularly in floor of the mouth cells of CrCo group. Even without statistic significance, this relation was also observed in tongue mucosa cells from CrCo and in both sites from SA.

Table 5. mAgNOR values in the exfoliated cells from the tongue mucosa according to demographics, smoke and alcohol consumption, oral health conditions and removable prosthesis use

Variable	Smoker/alcohol drinker		Crack cocaine user	
	Mean (SD)	p	Mean (SD)	p
Age group				
21 – 33	3.05 (0.37)	0.16 *	2.94 (0.58)	0.81 *
34 – 47	3.56 (0.60)		2.79 (0.48)	
48 +	3.21 (0.39)		2.83 (0.51)	
Gender				
Male	3.16 (0.43)	0.02 †	---	---
Female	3.62 (0.52)		---	
Race				
White	3.26 (0.45)	0.02 †	2.88 (0.52)	0.56 †
Non-white	3.99 (0.56)		2.75 (0.49)	
Monthly incomes				
No income	---	0.94 *	2.50 (0.34)	0.28 *
Low	3.30 (0.56)		2.79 (0.39)	
Middle	3.22 (0.39)		3.01 (0.70)	
High	3.26 (0.40)		2.93 (0.41)	
Educational level				
Elementary school	3.25 (0.51)	0.16 *	2.89 (0.54)	0.82 *
Secondary school	3.75 (0.62)		2.75 (0.54)	
Higher education	3.18 (0.22)		2.90 (0.38)	
Smoking status				
Light	3.25 (0.58)	0.90 *	2.82 (0.60)	0.33 *
Moderate	3.58 (0.46)		2.75 (0.25)	
Heavy	3.30 (0.51)		3.11 (0.42)	
Alcohol drinking status				
Light	3.45 (0.52)	0.68 *	2.93 (0.46)	0.70 *
Moderate	3.25 (0.65)		2.96 (0.59)	
Heavy	3.23 (0.44)		2.76 (0.51)	
Oral health conditions**				
Poor	3.44 (0.55)	0.55 *	3.14 (0.55)	0.05 †
Regular	3.31 (0.57)		2.72 (0.41)	
Good/Very good	3.14 (0.24)		---	
Removable prosthesis				
Non-user	3.45 (0.56)	0.18 †	2.82 (0.51)	---
User	3.17 (0.39)		3.19 (0.38)	

*ANOVA / †Student t tests were used depending on the number of categories. Categories with less than three patients were excluded from the statistical analysis. Gender and prosthesis use were not included in the analysis, because CrCo group had only two prosthesis users and two women, respectively.

Table 6. mAgNOR values in the exfoliated cells from the floor of the mouth mucosa according demographics, smoke and alcohol consumption, oral health conditions and removable prosthesis use.

Variable	Smoker/alcohol drinker		Crack cocaine user	
	Mean (SD)	p	Mean (SD)	p
Age group				
21 – 33	3.55 (0.44)	0.05 *	3.28 (0.33)	0.84 *
34 – 47	3.85 (0.63)		3.23 (0.41)	
48 +	3.29 (0.42)		3.34 (0.40)	
Gender				
Male	3.47 (0.59)	0.33 †	---	---
Female	3.69 (0.53)		---	---
Race				
White	3.52 (0.59)	0.37 †	2.30 (0.33)	0.54 †
Non-white	3.84 (0.35)		3.20 (0.51)	
Monthly incomes				
No incomes	---	0.62 *	3.08 (0.23)	0.55 *
Low	3.58 (0.82)		3.40 (0.47)	
Middle	3.62 (0.49)		3.23 (0.52)	
High	3.34 (0.38)		3.31 (0.20)	
Educacional level				
Elementary school	3.55 (0.61)	0.11 *	3.32 (0.37)	0.67 *
Secondary school	4.01 (0.43)		3.17 (0.27)	
Higher education	3.23 (0.43)		3.29 (0.68)	
Smoking status				
Light	3.63 (0.60)	0.06 *	3.26 (0.41)	0.71 *
Moderate	4.03 (0.45)		3.20 (0.41)	
Heavy	3.36 (0.51)		3.36 (0.40)	
Alcohol drinking status				
Light	3.62 (0.54)	0.64 *	3.26 (0.41)	0.71 *
Moderate	3.62 (0.69)		3.20 (0.41)	
Heavy	3.39 (0.57)		3.36 (0.40)	
Oral health conditions				
Poor	3.62 (0.55)	0.85 *	3.54 (0.40)	0.03 †
Regular	3.52 (0.71)		3.21 (0.28)	
Good/Very good	3.46 (0.40)		---	
Removable prosthesis				
Non-user	3.67 (0.33)	0.20 †	3.26 (0.39)	---
User	3.37 (0.60)		3.39 (0.30)	---

*ANOVA followed by Tukey / †Student t tests were used depending on the number of categories. Categories with less than three patients were excluded from the statistical analysis. Gender and prosthesis use were not included in the analysis, because CrCo group had only two prosthesis users and two women, respectively.

4. Discussion

Few studies evaluated oral mucosa of crack users.^{18,19} To the best of our knowledge, this is the first study focusing on cell proliferation in these circumstances. One of the most important results was that crack cocaine users did not present alterations in cell proliferation rate in cells obtained from tongue and floor of the mouth mucosae. Furthermore, an increase in cell proliferation was consistently demonstrated by mAgNOR and by pAgNOR in tongue and in floor of the mouth mucosa of individuals who were smokers and alcohol drinkers.

Cytopathological studies have demonstrated that smoking and alcohol drinking in combination induce alterations on renewal process of the oral epithelium. Under these conditions, literature has shown increase in cell proliferation, in amount of intermediate cells and in keratinization of the oral epithelium.⁹⁻¹¹ Similar finding in relation to maturation process of oral epithelium was found by Woyceichoski et al.¹⁸ studying crack cocaine users. In this study, crack cocaine group was comprised by individuals who have not consumed any kind of drugs, including smoking and alcohol, in the 3 months previous to sample collection. It means these authors ruled out the possibility of persistence of damage induced by tobacco and alcohol and attributed the observed changes exclusively to crack cocaine use. However, it is difficult to assure that, after 3 months of cessation of smoking and alcohol exposition, the known related changes reversed. Woyceichoski et al.¹⁸ included full blood count in their evaluation aiming to exclude anemia, since this is an important alteration usually observed in crack users³³. This evaluation was not possible in the present study and could be considered a limitation. Our data showed that it is difficult to evaluate the effect of crack cocaine *per se*, because crack users consume smoke and alcohol in combination or even other substances, as previously reported by previous

studies.^{18,31-32} However it appears that assess the effect of crack cocaine per se is difficult and, even if it was possible, would create an artificial condition. In addition, they usually present comorbidities which vary individually and depend on lifestyle circumstances.

Cell proliferation assessment based on AgNOR quantification has been used to evaluate clinically healthy oral mucosa of smokers.^{9-12,14} These studies indicate a higher cell proliferation in buccal, tongue and floor of the mouth mucosas of smokers when compared to non-smokers non-drinkers individuals.^{10-12,14} Although frequent, the combination of smoking and alcohol drinking was not extensively evaluated. Paiva et al.¹¹ demonstrated that smoking alone, or in combination to alcohol drinking, increase epithelial proliferation sites of predilection (tongue and floor of the mouth) for oral cancer development. Our results reinforced these findings that could be one of the explanations for multiplicative effect of these factors in relation to oral cancer.³⁴⁻³⁵

In the present study, it was observed that the majority of parameters used for AgNOR quantification revealed increase in epithelial proliferation rate in AS when compared to other groups. Regarding floor of the mouth cells, this increase was observed only in relation to C. CrCo had values higher than C and lower than SA, but these differences were not statistically different. It indicates that crack cocaine use doesn't appear to cause alterations in cell proliferative activity of oral epithelium. Higher proliferation rate presented by SA in relation to CrCo may be explained by higher amount (Pack years) and duration (years) of lifelong exposition. In general, high risk patients for oral cancer present more than 20 years of smoke exposition.^{3,36} Moreover the majority of oral cancer patients smokes more than 20 cigarettes a day. According Moreno-Lopez et al.³⁷ smokers of more than 20 cigarettes a day have

12.57 times higher chances of having oral cancer. In contrast, individuals who consume less than 20 cigarettes a day present 3.15 more chances to develop oral cancer. Hence, taking its smoking pattern into account, crack users assessed here could not be considered as higher risk group for oral cancer. Nevertheless, the cell proliferation increase found in SA patients could indicate early field cancerization changes (Slaughter et al, 1953).³⁸

Regarding alcohol consumption, de Stefani et al.³⁹ demonstrated that consumption of 61g alcohol/day or more is associated to increased risk for oral cancer (odd ratio= 5.6, confidence interval=2.3-13.6). Taking into account that crack users reported here consumed about 70g alcohol/day in average, they could be considered as a high risk group for oral cancer.

Another important issue is the association of crack with alcohol consumption, since it produces cocaethylene. This metabolite is toxic to central nervous⁴⁰ and cardiovascular⁴¹ systems. Further studies, particularly focusing on nuclear changes and DNA damage, could contribute on the assessment of crack-cocaine/alcohol association effects on oral mucosa.

Normally, oral cytopathology studies did not consider demographics, levels of expositions to smoke and alcohol and features related to oral health as possible modifying factors of oral mucosa. In the present study, it was found that gender, race and oral health conditions may be implicated as additional modifiers of oral mucosa besides smoking and drinking. In tongue mucosa cells of SA group, women and non-whites presented higher cell proliferation when compared to males and whites, respectively.

Regarding higher sensitivity of females, our results corroborate previous data. Chen et al.⁴² and Rosenquist⁴³ stated that cigarette smoking is more harmful to lung

and oral cancer in females. According to Gasperino⁴⁴, cigarette smoking may induce production of catechol estrogens (4-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestron), that are mutagenic for proto-oncogene k-ras and tumor suppressor gene p53. However, this mechanism was described to explain gender-related sensitivity was described in bronchial epithelium and it has not been evaluated in oral epithelium so far. Higher sensitivity of females to different noxious agents may also be observed in animal models studies. The treatment with ethanol⁴⁵ and naphthalene⁴⁶ induced more damages to female in comparison to male mice.

The increase in cell proliferation in blacks (the majority of subjects in non-whites) in relation to whites was demonstrated. Literature has reported higher occurrence⁴⁷ and poor prognosis⁴⁸⁻⁴⁹ for head and neck squamous cell carcinoma in relation to whites. Brown et al.⁴⁷ hypothesized that reason could be different patterns of cigarette smoking and/or alcohol consumption, as well as differences in susceptibility to these factors. Apparently, one of the mechanisms involved is polymorphism in relation to glutathione S-transferase, an enzyme that detoxifies xenobiotic substrates and favor whites in terms of defensive capacity.⁵⁰

Other remarkable finding of the present study was observed on floor of the mouth cells of CrCo regarding oral health conditions. Interestingly poor oral health condition was associated to increase in cell proliferation rate, that reinforces that oral health conditions may be consider a risk factor for oral cancer as other studies pointed previously.^{43,51} One possible explanation for that is the microbial production of acetaldehyde, a toxic metabolite from ethanol that presents carcinogenic properties *in vitro*⁵². However, this may not strongly supported by our data, because our evaluation has limitations and was not so accurate to dental conditions evaluation as reported elsewhere by Homann et al.⁵³ More studies should be conducted on oral

dental status and microbial factors influence in oral mucosa, because it could somehow contribute in mechanisms associated to oral carcinogenesis.

In conclusion, this study indicated that crack use doesn't modify cell proliferation rate of oral mucosa epithelium. The data presented here emphasize that cigarette smoking in combination with alcohol consumption remain as the most important factors related to changes in oral mucosa. Further studies are necessary to improve the knowledge of crack effects on oral mucosa, focusing on evaluation of its chronic effects, its potential genotoxicity and regarding to contribution of other factors such as dental status.

Acknowledgements

This study was conducted with the support of grants received from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and from FAPERGS (Foundation of research supporting at Rio Grande do Sul State). The authors would like to thank Red Cross – Rio Grande do Sul section and Ana Carolina Pellicoli and Fernanda Visioli for assistance in sample collection. The authors thank also Isabel da Silva Lauxen and Chris Krebs Danilevicz for excellent technical support and Dr. Fábio Herrmann Coelho de Souza e Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing for their contribution in study design.

5. References:

1. Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer*. 1977; **40**(4):1872-1878.
2. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res*. 1990; **50**(20):6502-6507.
3. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med*. 2004; **33**(9):525-532.
4. Biazevic MG, Castellanos RA, Antunes JL, Michel-Crosato E. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. *Cad Saude Publica*. 2006; **22**(10):2105-2114.
5. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; **83**(1):18–29.
6. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol*. 1999; **21**(2):126-130.
7. Ogden GR, Wight AJ, Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*. 1999; **28**(5):216-220.
8. Burzlaff, JB, Bohrer PL, Paiva RL, Sant'Ana Filho M, da Silva VD, Rados PV. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007; **18**(6):367–375.

9. Sampaio HC, Loyola AA, Gomes RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytology* 1999; **43**(2): 117-1120.
10. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol.* 2001; **37**(5):446-454.
11. Paiva RL, Sant'ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2004; **26**(3):175-180.
12. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez 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. *Med Oral* 2004; **9**(3):197-203.
13. Salehinejad JJ, Kalantari MR, Omid AA, Zare R. Evaluation of AgNOR Staining in Exfoliative Cytology of Normal Oral (Buccal) Mucosa: Effect of Smoking. *J. Mash. Dent Sch.* 2007; **31**(Special Issue):22-24.
14. Campos Fontes P, Marques Corrêa GH, Scholz Issa J, Almeida JD. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008; **30**(1):16-24.
15. Reis SR, Sadigursky M, Andrade MG, Soares LP, Espirito Santo AR, Vilas Boas DS. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; **16**(3):221-225.

16. 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 Cytol* 2005; **49**(3):265-272.
17. International Drug Policy Consortium. A global network promoting objective and open debate on drug policy. Available on <http://idpc.net/alerts/2011/07/crack-hits-brazil-late-gut-hard>. Posted on [22/7/11](#). Accessed on 18/08/2012.
18. Woyceichoski IEC, de Arruda EP, Resende LG, Machado MA, Grégio AM, Azevedo LR et al. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Maxillofac. Pathol.* 2008; **105**(6): 745-749.
19. Lima CF, Oliveira LU, Cabral LA, Brandão AA, Salgado MA, Almeida JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J. Oral Pathol. Med.* 2010; **39**(6): 441-446.
20. Macluskey M, Ogden GR, Green M, Chisholm DM, Schor SL, Schor AM. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. *Oral Oncol.* 1999; **35**(4):409-414.
21. Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J Pathol.* 2000; **191**(4):368-375.
22. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; **53**(1):37-50.
23. Hernandez-Verdun D. The nucleolar organizer regions. *Biol Cell* 1983; **49**(3):191-202.

24. Crocker J. Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE, Crocker J, editors. *Pathology of the nucleus*. Berlin: Springer Verlag, 1990. p. 92-149.
25. Trerè D. Quantitative analysis of AgNOR proteins: a reliable marker of the rapidity of cell duplication and a significant prognostic parameter in tumour pathology. *Adv Clin Path*. 1998; **2**(4):261-270.
26. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissue. *J. Pathol*. 2000; **191**(2):181-186.
27. Carrard VC, Haas AN, Rados PV, Filho MS, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. *Oral Dis*. 2011; **17**(2):171-179.
28. WHO ASSIST Working Group. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility 2002; **97**(9):1183-1194.
29. 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. *Histochem. J*. 1986; **18**(1):5–14.
30. Xie X, Clausen OP, Sudbö 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):2200-2208.
31. Van der Meer Sanchez Z, Nappo SA. Progression on drug use and its intervening factors among crack users. *Rev Saude Publica* 2002; **36**(4):420-430.

32. Gossop M, Manning V, Ridge G. Concurrent use and order of use of cocaine and alcohol: behavioural differences between users of crack cocaine and cocaine powder. *Addiction* 2006; **101**(9):1292-1298.
33. Falk RS, Wang JC, Siegal HA, Carlson RG. Current physical health problems and their predictors among a community sample of crack-cocaine smokers in Ohio. *J Psychoact. Drugs.* 2003; **35**(4):471-478.
34. Hayes RB, Bravo-Otero E, Kleinman DV, Brown LM, Fraumeni JF Jr, Harty LC, Winn DM. Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Cause Control.* 1999; **10**(1):27-33.
35. Szymańska K, Hung RJ, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Curado MP, Koifman S et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Cause Control.* 2011; **22**(7):1037-1046.
36. Poveda-Roda R, Bagán JV, Jiménez-Soriano Y, Margaix-Muñoz M, Sarrión-Pérez G. Changes in smoking habit among patients with a history of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; **15**(5):e721-6.
37. Moreno-Lopez L. A risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.* 2000; **36**(2):170-174.
38. Slaughter M, Danely P, Harry W, Southwick M, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; **6**(5):963-968.
39. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Fierro L, Mendilaharsu M. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and

- pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. *Oral Oncol.* 1998; **34**(2):99-104.
40. Laizure SC, Parker RB. Pharmacodynamic Evaluation of the Cardiovascular Effects after the Coadministration of Cocaine and Ethanol. *Drug Metab Dispos.* 2009; **37**(2):310-314.
41. Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry CW, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH. Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. *Life Sci.* 1991; **48**(18):1787-1794.
42. Chen Y, Horne SL, Dosman JA. Increased susceptibility to lung dysfunction in female smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1991; **143**(6):1224-1230.
43. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl.* 2005;(179):1-66.
44. Gasperino J. Gender is a risk factor for lung cancer. *Med. hypotheses* 2011; **76**(3):328-331.
45. Varlinskaya EI, Petrov ES, Cheslock SJ, Spear NE. A new model of ethanol self-administration in newborn rats: gender effects on ethanol ingestion through a surrogate nipple. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; **23**(8):1368-1376.
46. Oliver JR, Kushwah R, Wu J, Cutz E, Yeger H, Waddell TK, Hu J. Gender differences in pulmonary regenerative response to naphthalene-induced bronchiolar epithelial cell injury. *Cell proliferat.* 2009; **42**(5):672-687.
47. Brown LM, Hoover RN, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, Liff JM, Silverman DT, Hayes RB, Pottern LM. Are racial differences in squamous cell esophageal cancer explained by alcohol and tobacco use? *J Natl Cancer Inst.* 1994; **86**(17):1340-1345.

48. Nichols AC, Bhattacharyya N. Racial differences in stage and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2007; **117**(5):770–775.
49. Molina MA, Cheung MC, Perez EA, Byrne MM, Franceschi D, Moffat FL et al. African American and poor patients have a dramatically worse prognosis for head and neck cancer: an examination of 20,915 patients. *Cancer* 2008; **113**(10):2797–2806.
50. Park LY, Muscat JE, Kaur T, Schantz SP, Stern JC, Richie JP Jr, Lazarus P. Comparison of GSTM polymorphisms and risk for oral cancer between African-Americans and Caucasians. *Pharmacogenetics* 2000; **10**(2):123-131.
51. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikołajczak A et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur. J. Cancer Prev.* 2003; **12**(1):25-33.
52. Obe G, Ristow H. Acetaldehyde, but not ethanol, induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat Res* 1977; **56**(2):211-213.
53. Homann N, Tillonen J, Rintamaki H, Salaspuro M, Lindqvist C et al. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol.* 2001; **37**(2) 153-158.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito deste estudo foi avaliar os efeitos do crack sobre a taxa proliferativa do epitélio bucal. Os resultados obtidos sugerem que o crack não potencializa o aumento da atividade proliferativa do epitélio bucal. Entretanto, a atividade proliferativa similar encontrada entre os grupos fumo-álcool e crack está relacionada ao consumo de fumo e de álcool por ambos os grupos. Além disso, pudemos concluir que a má higiene bucal contribui no aumento da atividade proliferativa quando associada aos principais fatores de risco do câncer bucal. Para um maior entendimento das alterações provocadas pelo crack nas vias proliferativas envolvidas e do seu potencial genotóxico, estudos longitudinais estão sendo realizados.

APÊNDICE A – Carta de Consentimento (Laboratório de Citopatologia Prof. Dr. Onofre F. Quadros – FO/UFRGS)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA

Porto Alegre, 1 de junho de 2010.

DECLARAÇÃO

Declaro que aceito colaborar na execução do projeto de pesquisa intitulado “Estudo dos Efeitos da Cessação de Exposição aos Carcinógenos Externos em Células Epiteliais da Mucosa Bucal”, sob a coordenação do Dr. Vinicius Carrard, o qual foi aprovado na Comissão de Pesquisa e Comitê de Ética dessa Faculdade, onde minha participação envolverá a orientação da parte referente às análises citológicas dos pacientes participantes do estudo. Também declaro que o Laboratório de Citopatologia Prof. Dr. Onofre F. Quadros está a disposição para realização da técnica de AgNOR.

Prof. Dr. Manoel Sant’Ana Filho
Patologia Bucal
Departamento de Odontologia Conservadora

APÊNDICE B – Carta de consentimento (Cruz Vermelha)

**CRUZ VERMELHA BRASILEIRA**

FILIAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – PORTO ALEGRE
Av. Independência, 793 - Fone: (51) 331-5148 / 3391.5953 / 8449.3138
CEP 91035-076 - CNPJ 07.345.851.0001/15 - www.cvbrn.org.br

DECLARAÇÃO

Declaro que aceito colaborar na execução do projeto de pesquisa intitulado "Estudo dos efeitos da cessação de exposição aos carcinógenos externos em células epiteliais da mucosa bucal: fumo, álcool e acetaldeído microbiano", sob a coordenação do Dr. Vinicius Carrard após aprovação em Comissão de Pesquisa e Comitê de Ética, disponibilizando o ambulatório desta instituição para seleção de pacientes para integrarem os grupos experimentais.

Porto Alegre, 16 de junho de 2009


Marilene Eggers Alves
Coord. Ambulatório da CVBRS

CRUZ VERMELHA BRASILEIRA
FILIAL RIO GRANDE DO SUL – PORTO ALEGRE
CEP 91035-076 – Independência, 793 – Fone: 331-5148
UTILIDADE PÚBLICA: DECA, Nº 44943 de 1906/79.

APÊNDICE C - Fichas para cadastramento de pacientes

PARTICIPANTE DA PESQUISA CRUZ
VERMELHA () Sim () Não N° Ética: 17267

FICHA PARA CADASTRAMENTO DOS PACIENTES

Nome (Iniciais): _____ CI _____ Data: ___/___/___

Idade: _____ Gênero: () Masculino () Feminino Cor: _____

Endereço: _____ nº _____ cidade _____

Telefone: _____

N° Registro Cito: _____ Técnica: _____

Nível Socioeconômico:

Escolaridade: () 1º Grau () 2º Grau () 3º Grau () incompleto

Ocupação: _____ Renda: () até R\$ 500,00 () de R\$ 501,00 a R\$ 1000,00
() de R\$ 1001,00 a 1500,00 () acima R\$ 1500,00

História Médica:

Doenças Sistêmicas:

Hipertensão () Não () Sim Diabetes () Não () Sim Hepatite () Não () Sim
Colesterol alto () Não () Sim Outras () Não () Sim Qual(is)? _____

Medicamentos (em caso afirmativo, especificar abaixo)

Antihipertensivo () Não () Sim Diurético () Não () Sim Hipoglicemiante () Não () Sim
Antibiótico () Não () Sim Analgésico () Não () Sim AINE () Não () Sim
Anticoncepcional () Não () Sim Antidepressivo () Não () Sim
Outro(s) () Não () Sim Qual(is)? _____

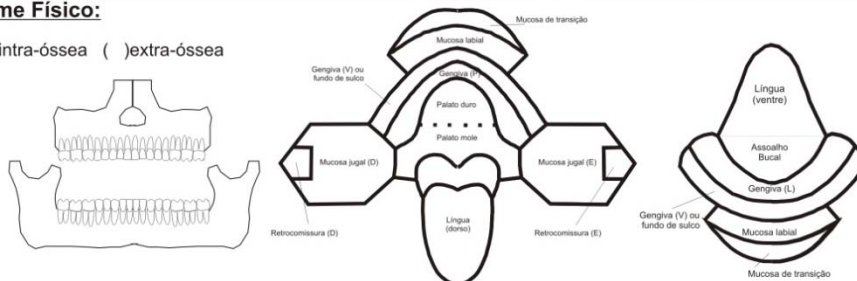
EXAME CLÍNICO:

Uso de prótese:

Não Sim Tipo: _____ Condições: _____
Tempo de uso _____ anos Última troca _____ (meses, anos) Tempo (anos) _____
Remove à noite Não Sim

Exame Físico:

() intra-óssea () extra-óssea



	Lesão fundamental	Tamanho (mm)	Cor	Consistência	Diagnóstico Clínico	Conduta
Lesão 1						
Lesão 2						
Lesão 3						
Lesão 4						

Condição de saúde bucal:

() Pobre	() Regular	() Boa	() Muito boa
Raízes residuais, perda de vários dentes e doença periodontal avançada	Presença de cáries e tártaro, mas poucos dentes perdidos	Muitas restaurações, mas sem cáries e com tártaro.	Ausência de cáries, restaurações ou tártaro

Declaro que fui informado a respeito do meu estado de saúde bucal e que autorizo a utilização de meus dados em atividades de ensino e pesquisa de forma anônima, de forma a garantir minha privacidade.

Assinatura: _____ Assinatura Pesquisador: _____

APÊNDICE D – Técnica citoquímica de AgNOR

A técnica descrita abaixo foi modificada a partir do protocolo de Ploton et al (1986) e seguiu 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 os cortes colocados em câmara úmida fechada e lavados a estufa por 20 minutos a 35°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%, misturado numa proporção de 1:2 partes com solução aquosa de nitrato de Prata em concentração de 50%.
Para 16 lâminas: 10ml de água + 0,2g de gelatina + 100µl de ácido fórmico + 20ml de água + 10g de AgNO₃
- Duas lavagens em água destilada aquecida a 35°C, para facilitar a remoção da gelatina e uma em água destilada na temperatura ambiente.
- Desidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Permount (Fisher ChemAlert®).

A técnica foi adaptada para citologia por Isabel Lauxen e Márcia Oliveira.

Laboratório de Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia da UFRGS Fone: (51) 3308-5023

APÊNDICE E - Termo de consentimento livre e esclarecido

Caro participante,

Estamos realizando um estudo para avaliar o que acontece na boca dos indivíduos quando eles param de fumar e/ou de beber. Este será um dos primeiros estudos sobre esse assunto e tem a possibilidade de contribuir para o entendimento das conseqüências do consumo de fumo e de álcool sobre a mucosa bucal.

É importante que o diário de consumo seja preenchido no final de cada semana, informando a quantidade de fumo ou álcool consumida com honestidade. A idéia do estudo não é fazer nenhuma espécie de julgamento a respeito do seu comportamento e sim entender o que acontece na boca quando a pessoa interrompe os hábitos de fumar ou beber. Em função disso, informações imprecisas podem prejudicar o resultado da pesquisa.

Serão feitas raspagens com o auxílio de uma escova (semelhante a uma escova dental) na língua e abaixo dela, para que seja possível estudar as células da boca. Além disso, será feita coleta de saliva, a partir da qual serão estudadas as bactérias presentes na boca. As coletas são simples, rápidas e indolores e serão repetidas a cada 6 meses. O comparecimento nessas consultas de controle é fundamental, pois ao longo do tempo é que será possível avaliar o que realmente está acontecendo na sua boca. Ainda não se sabe se, ao parar de fumar ou beber, o tecido da boca volta ao normal depois de um tempo ou se permanece alterado por tempo indeterminado.

O estudo proposto também envolve o exame da boca e das gengivas, pois a higiene bucal é outro fator que pode ter relação com o câncer de boca.

Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes da realização de um exame bucal completo. Todas as medidas de biossegurança necessárias tais como uso de materiais descartáveis e instrumentais esterilizados, serão dotadas.

Os benefícios relacionados à participação neste estudo são o exame bucal completo, que inclui um exame detalhado das gengivas, bem como orientação de higiene e diagnóstico a respeito das doenças bucais presentes e necessidades de tratamento. Fica ainda assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas, não sendo permitido acesso por outra pessoa que não o próprio participante ou responsável.

Fica, ainda, assegurada a liberdade dos participantes de recusarem-se a participar ou retirarem-se do estudo a qualquer momento que desejarem, sem que isso traga conseqüências aos mesmos. Entretanto, é importante lembrar que a pessoa que fumou ou bebeu tem uma chance maior de desenvolver câncer de boca e deve ser examinado periodicamente.

Toda e qualquer dúvida no decorrer do estudo poderá ser esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa através dos telefones (51) 9241. 0234 e (51) 8215.5121 (Paula Daniele Matheus). Os pesquisadores envolvidos no estudo estarão sempre à disposição para esclarecimentos.

Possíveis problemas podem ser reportados diretamente ao Comitê de Ética em Pesquisa da FO/UFRGS 3308.5003.

Eu, _____ (participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores.

Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Participante: _____

R.G.: _____

ANEXO A – Ficha para triagem do uso de álcool, tabaco, crack e outras substâncias (ASSIST OMS - modificado)

Nome: _____ Registro _____
Entrevistador: _____ DATA: ____/____/____

ASSIST - OMS

1. Na sua vida qual(is) dessa(s) substâncias você já usou? (somente uso não prescrito pelo médico)	NÃO	SIM
a. derivados do tabaco	0	3
b. bebidas alcoólicas	0	3
c. maconha	0	3
d. cocaína, crack	0	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	3
f. inalantes	0	3
g. hipnóticos/sedativos	0	3
h. alucinógenos	0	3
i. opióides	0	3
j. outras, especificar	0	3

- SE "NÃO" em todos os itens investigue: Nem mesmo quando estava na escola?
- Se "NÃO" em todos os itens, pare a entrevista
- Se "SIM" para alguma droga, continue com as demais questões

3. Durante os três últimos meses, com que frequência você teve um forte desejo ou urgência em consumir? (primeira droga, segunda droga, etc.)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	SEMANALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIA MENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	3	4	5	6
b. bebidas alcoólicas	0	3	4	5	6
c. maconha	0	3	4	5	6
d. cocaína, crack	0	3	4	5	6
e. anfetaminas ou êxtase	0	3	4	5	6
f. inalantes	0	3	4	5	6
g. hipnóticos/sedativos	0	3	4	5	6
h. alucinógenos	0	3	4	5	6
i. opióides	0	3	4	5	6
j. outras, especificar	0	3	4	5	6

NOMES POPULARES OU COMERCIAIS DAS DROGAS

- a. produtos do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda)
- b. bebidas alcólicas (cerveja, vinho, champagne, licor, pinga uísque, vodca, vermouths, caninha, rum, tequila, gin)
- c. maconha (baseado, erva, liamba, diamba, birra, fuminho, fumo, mato, bagulho, pango, manga-rosa, massa, haxixe, skank, etc)
- d. cocaína, crack (coca, pó, branquinha, nuvem, farinha, neve, pedra, caximbo, brêho)
- e. estimulantes como anfetaminas (bolinhas, rebites, bifetamina, moderine, MDMA)
- f. inalante (solventes, cola de sapateiro, tinta, esmalte, corretivo, verniz, tinner, clorofórmio, tolueno, gasolina, éter, lança perfume, cheirinho da lolô)
- g. hipnóticos, sedativos (ansiolíticos, tranquilizantes, barbitúricos, fenobarbital, pentobarbital, benzodiazepínicos, diazepam)
- h. alucinógenos (LSD, chá-de-lírio, ácido, passaporte, mesalina, peiote, cacto)
- i. opiáceos (morfina, codeína, ópio, heroína elixir, metadona)
- j. outras – especificar:

QUESTIONÁRIO PARA TRIAGEM DO USO DE ALCOOL, TABACO E OUTRAS SUBSTÂNCIAS.

2. Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essa(s) substância(s) que mencionou? (primeira droga, depois a segunda droga, etc)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	SEMANALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIA MENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	2	3	4	6
b. bebidas alcoólicas	0	2	3	4	6
c. maconha	0	2	3	4	6
d. cocaína, crack	0	2	3	4	6
e. anfetaminas ou êxtase	0	2	3	4	6
f. inalantes	0	2	3	4	6
g. hipnóticos/sedativos	0	2	3	4	6
h. alucinógenos	0	2	3	4	6
i. opióides	0	2	3	4	6
j. outras, especificar	0	2	3	4	6

- Se "NUNCA" em todos os itens da questão 2 pule para a questão 6, com outras respostas continue com as demais questões

4. Durante os três últimos meses, com que frequência o seu consumo de (primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problema de saúde, social, legal ou financeiro?	NUNCA	1 OU 2 VEZES	SEMANALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIA MENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	4	5	6	7
b. bebidas alcoólicas	0	4	5	6	7
c. maconha	0	4	5	6	7
d. cocaína, crack	0	4	5	6	7
e. anfetaminas ou êxtase	0	4	5	6	7
f. inalantes	0	4	5	6	7
g. hipnóticos/sedativos	0	4	5	6	7
h. alucinógenos	0	4	5	6	7
i. opióides	0	4	5	6	7
j. outras, especificar	0	4	5	6	7

5. Durante os três últimos meses, com que frequência, por causa do seu uso de (*primeira droga, depois a segunda droga, etc*), você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas de você?

	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	5	6	7	8
b. bebidas alcoólicas	0	5	6	7	8
c. maconha	0	5	6	7	8
d. cocaína, crack	0	5	6	7	8
e. anfetaminas ou êxtase	0	5	6	7	8
f. inalantes	0	5	6	7	8
g. hipnóticos/sedativos	0	5	6	7	8
h. alucinógenos	0	5	6	7	8
i. opióides	0	5	6	7	8
j. outras, especificar	0	5	6	7	8

• **FAÇA** as questões 6 e 7 para todas as substâncias mencionadas na questão 1

6. Há amigos, parentes ou outra pessoa que tenha demonstrado preocupação com seu uso de (*primeira droga, depois a segunda droga, etc...*)?

	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

7. Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de (*primeira droga, depois a segunda droga, etc...*) e não conseguiu?

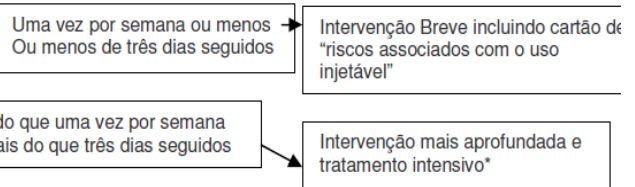
	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

Nota Importante: Pacientes que tenham usado drogas injetáveis nos últimos 3 meses devem ser perguntados sobre seu padrão de uso injetável durante este período, para determinar seus níveis de risco e a melhor forma de intervenção.

8- Alguma vez você já usou drogas por injeção?
(Apenas uso não médico)

NÃO, nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses

Guia de Intervenção para Padrão de uso injetável





PONTUAÇÃO PARA CADA DROGA

	Anote a pontuação para cada droga. SOME SOMENTE das Questões 2, 3, 4, 5, 6 e 7	Nenhuma intervenção	Receber Intervenção Breve	Encaminhar para tratamento mais intensivo
Tabaco		0-3	4-26	27 ou mais
Alcool		0-10	11-26	27 ou mais
Maconha		0-3	4-26	27 ou mais
Cocaína		0-3	4-26	27 ou mais
Anfetaminas		0-3	4-26	27 ou mais
Inalantes		0-3	4-26	27 ou mais
Hipnóticos/sedativos		0-3	4-26	27 ou mais
Alucinógenos		0-3	4-26	27 ou mais
Opióides		0-3	4-26	27 ou mais

Cálculo do escore de envolvimento com uma substância específica.
Para cada substância (de 'a' a 'j') some os escores obtidos nas questões 2 a 7 (inclusive).
Não inclua os resultados das questões 1 e 8 aqui.
Por exemplo, um escore para maconha deverá ser calculado do seguinte modo: Q2c + Q3c + Q4c + Q5c + Q6c + Q7c.
Note que Q5 para tabaco não é codificada, sendo a pontuação para tabaco = Q2a + Q3a + Q4a + Q6a + Q7a

Fuma () Fumava () Tipo _____ Qtde _____ Parou há _____ Por quanto tempo _____
 Bebe () Bebia () Tipo _____ Qtde _____ Parou há _____ Por quanto tempo _____
 Outros _____ Qtde _____ Parou há _____ Por quanto tempo _____

ANEXO B – Comitê de Ética

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

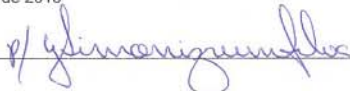
Número: 17267
Título: Estudo dos Efeitos da Cessação de Exposição aos Carcinógenos Externos em Células Epiteliais da Mucosa Bucal: Fumo, Álcool e Acetaldeído Microbiano

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

MANOEL SANTANA FILHO - coordenador desde 08/10/2009
ISABEL DA SILVA LAUXEN - pesquisador desde 08/10/2009
VINICIUS COELHO CARRARD - pesquisador desde 08/10/2009

O mesmo foi aprovado pelo Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs, em reunião realizada em 18/03/2010 - Sala 3 do CEPE, andar térreo do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho nacional de Saúde.

Porto Alegre, Terça-Feira, 23 de Março de 2010.



JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

1