

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

JÚLIA MORAIS MARTINS

ESTUDO DO EFEITO DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A
VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL POR
MEIO DA TÉCNICA DE AgNOR

Porto Alegre

2013

JÚLIA MORAIS MARTINS

ESTUDO DO EFEITO DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A
VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL POR
MEIO DA TÉCNICA DE AgNOR

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção
do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre

2013

IP – Catalogação na Publicação

Martins, Júlia Morais

Estudo do efeito da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal / Júlia Morais Martins. – 2013.
32 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados

1. Odontologia. 2. Tabagismo. 3. Proliferação. 4. AgNOR. I. Rados. Pantelis Varvaki. II.

Ao querido amigo e colega Cauã Coutinho, por ter feito parte das nossas vidas mesmo que por um breve período de tempo. Tua falta será sentida para sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jane e Claudemir, pelo apoio incondicional e pela valorização da minha educação.

Ao meu irmão e minha cunhada, Diego e Kelly, que são exemplos a serem seguidos, e que nos presentearam uma sobrinha maravilhosa, Maria Clara.

Ao meu namorado, David, pela cumplicidade e carinho.

Aos amigos, pela paciência, compreensão e, principalmente, pelos momentos de alegria.

À equipe do Laboratório de Patologia Bucal e ao meu orientador, Prof. Pantelis, pelos conhecimentos compartilhados e momentos vividos.

Aos colegas, que fizeram esta experiência ser única.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito de qualidade.

RESUMO

MARTINS, Júlia M. **Estudo do efeito da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal.** 2013. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, POA.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de proliferação celular pela técnica de AgNOR sobre as células epiteliais descamadas da mucosa bucal clinicamente normal de pacientes que cessaram o hábito tabágico. Foram incluídos na pesquisa 99 indivíduos avaliados em um momento inicial (T1), após uma média de 6 meses (T2) e 12 meses (T3). Os participantes foram divididos em Grupo Controle (N=44), que nunca fumaram ou pararam de fumar há mais de 10 anos e não bebem; Grupo Abandono de Fumo (N=22), que no momento inicial da pesquisa (T1) ainda fumavam, mas cessaram o hábito tabágico ao longo do tempo de acompanhamento (em T2 e T3); e Grupo Fumo (N=33), indivíduos que fumaram por todo o tempo do acompanhamento da pesquisa. A avaliação da proliferação celular foi realizada através de esfregaços citopatológicos, obtidos nos sítios borda de língua e assoalho de boca, e que após, foram submetidos à técnica de AgNOR. Dois parâmetros de avaliação foram utilizados, a média de AgNOR (mAgNOR) e o da porcentagem de células com mais de 1 e mais de 3 AgNORs (pAgNOR>1 e pAgNOR>3). Em T1, os grupos expostos ao fumo (GAF e GF) apresentavam velocidade de proliferação mais elevada, se comparados ao GC. Na avaliação longitudinal, o GF manteve os valores mais elevados em todos os tempos. Já no GAF, ambos os parâmetros avaliados reduziram ao longo do tempo de acompanhamento, sugerindo que os pacientes que cessam o hábito tabágico diminuem a velocidade de proliferação celular, apresentando valores semelhantes aos do GC. Além disso, os resultados sugerem que a variação individual da mAgNOR de pacientes que nunca fumaram ao longo de um ano de acompanhamento é de 20%, e os pacientes expostos ao fumo que mostraram limites de variações mais amplos, devem ser acompanhados de forma individualizada.

Palavras-chave: Odontologia. Tabagismo. Proliferação. AgNOR.

ABSTRACT

MARTINS, Júlia M. **Effect of smoking and smoking cessation on the rate of proliferation of cells of the oral mucosa.** 2013. 33f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, POA.

The aim of this study was to evaluate the pattern of cell proliferation by AgNOR technique on exfoliated epithelial cells from clinically normal oral mucosa of patients who ceased the smoking habit. The study included 99 subjects who were evaluated at an early time (T1), and after an average of 6 months (T2) and 12 months (T3). Participants were divided into Control Group (N = 44) who had never smoked or stopped smoking for over 10 years and do not drink; Group Abandonment of Tobacco (N = 22), which at the start of the study (T1) were still smoking but ceased the smoking habit over the time of follow-up (T2 and T3) and Group Smoking (N = 33), individuals who smoked all the time of the follow-up survey. The evaluation of cell proliferation was performed by smears obtained at the sites edge of the tongue and floor of the mouth, and then, they were subjected to AgNOR technique. Two parameters were used, the mean AgNOR (mAgNOR) and the percentage of cells with more than 1 and more than 3 AgNORs (pAgNOR > 1 and pAgNOR > 3). In T1, the groups exposed to smoke (GAT and GS) had higher proliferation rates as compared to the CG. In the longitudinal evaluation, the GS maintained the highest values at all times. In the GAF both parameters evaluated reduced over the time monitored, suggesting that patients who cease smoking habit decreases the speed of cell proliferation, presenting similar values to CG. Furthermore, the results suggest that individual variation mAgNOR of patients who never smoked over a year of follow up is 20%, and patients exposed to smoke that showed wider variations limits must be accompanied individually.

Keywords: Dentistry. Smoking. Proliferation. AgNOR.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	07
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	14
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A denominação genérica “Câncer de Boca” é utilizada para referência de qualquer lesão maligna da cavidade bucal (RAPOPORT, 1997). O número de óbitos ocorridos em decorrência do câncer bucal em 2010 no Brasil foi um total de 4.891, sendo 3.882 homens e 1.009 mulheres; e a mais recente estimativa prevê que ocorram cerca de 14.170 novos casos no ano de 2012 em nosso país, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

Do ponto de vista epidemiológico, o câncer de boca ocorre com mais frequência em homens, na faixa etária acima dos 40 anos, e os sítios anatômicos mais acometidos são o vermelhão do lábio inferior, borda de língua e o assoalho de boca (NEVILLE, 2009; ZAVRAS et al., 200; REIS, 1997). O carcinoma espinocelular é a neoplasia mais prevalente nesta localização, representando 90% à 95% das lesões malignas (DANTAS, 2003).

Os principais fatores de risco para o câncer da cavidade bucal são o tabagismo e o etilismo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). O fumo é responsável por cerca de 42% dos óbitos por essa neoplasia. Já o etilismo pesado corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). O sinergismo entre fumo e álcool na etiologia do câncer ocorre pelo aumento da permeabilidade da mucosa bucal, facilitando a penetração de carcinógenos. Além disso, o álcool é responsável por um aumento na proliferação epitelial e pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (CARRARD, 2008).

No tabaco, são identificadas cerca de 60 substâncias tóxicas que apresentam ação carcinogênica, como hidrocarbonetos policíclicos e nitrosaminas específicas do tabaco (HOFFMANN; WYNDER, 1986). A mucosa bucal sofre com a ação do fumo através da queima do tabaco, que é um agente iniciador (FRANKS, 1996), provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular, o que poderia levar ao aparecimento da doença (OGDEN; WIGHT, 1998).

Atualmente, sabe-se que o hábito tabágico é a maior causa prevenível de doenças, e é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (WINN, 2001). Considerando a influência do tabaco sobre o

desenvolvimento de lesões bucais potencialmente malignas e malignas, somado à facilidade de acesso e de coleta de material para a análise destas lesões, a citologia esfoliativa é uma técnica útil no monitoramento de pacientes com alterações iniciais da mucosa bucal (ALMEIDA, 1994). É um método não invasivo, simples e de baixo custo e tem sido utilizado para avaliar as mudanças ocorridas na mucosa clinicamente normal de indivíduos expostos à ação do cigarro, do álcool e outras substâncias (OGDEN et al., 1999; SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA FILHO, 2001; BOHRER, 2005; GEDOZ et al., 2007; BURZLAFF et al., 2007).

A chave para a cura do câncer de boca é a detecção e tratamento nas fases iniciais da doença (TAYBOS, 2003). Segundo Scully et al. (1992), mudanças genéticas acumuladas que precedem a transformação maligna podem ser identificadas através de marcadores moleculares ou mudanças celulares. O estudo de Califano et al. (1996) descreve os eventos genéticos ocorridos em cada etapa do processo de malignização, observando eventos cromossômicos envolvidos nos genes de regulação do ciclo celular (p6 e p53) e proto-oncogenes (cyclin D1) nas diferentes etapas do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço e em lesões benignas. Ele também observa que as anormalidades histopatológicas no entorno de lesões malignas e pré-malignas são geralmente derivadas de uma única célula mutada, e que os eventos genéticos subsequentes produzem diferentes alterações fenotípicas, resultando em uma variedade de pontos de crescimento tumoral em uma mesma área. Sabe-se também que durante a progressão da lesão, a célula exibe uma variedade de alterações genéticas e bioquímicas onde o fator mais marcante é a alteração de proliferação (KOTELNIKOV, 1995).

Altas taxas de proliferação celular aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer, uma vez que as células em divisão tornam-se mais propensas a mutações (OIJEN et al., 1998). Segundo Piche et al. (2000), a taxa de proliferação é determinante para a progressão tumoral. Para avaliar a proliferação celular, podem ser utilizados diferentes marcadores. A técnica de impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) tem sido amplamente utilizada para avaliar a velocidade de proliferação celular em cortes histológicos de lesões potencialmente malignas e tumorais (XIE et al., 1997; ELANGO VAN et al., 2008; CHATTOPADHYA et al., 2002; HILDEBRAND et al., 2010; CALDEIRA et al.,

2011). Por meio desta técnica, um grupo de proteínas presentes nas Regiões Organizadores Nucleolares (NOR), são impregnadas pela prata de forma seletiva. As NORs estão localizadas no nucléolo da célula durante a intérfase (COSTA, 1999). Elas são alças de DNA, nos quais RNA ribossômico é codificado, e estão localizadas nos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22. (SCHLIEPHAKE, 2003). O número de AgNORs presentes no núcleo está diretamente relacionado à taxa de síntese de RNAr, portanto células com alta atividade proliferativa apresentam aumento da quantidade de AgNORs (TRERÉ, 2000; DERENZINI et al., 2000; DERENZINI; PLOTON, 1991; CROCKER, 1989). Esta técnica tem sido utilizada para diferenciar lesões benignas e malignas, para estabelecer prognósticos e determinar a atividade proliferativa de células (PILLAI et al., 2005).

A relação entre o número de AgNORs e atividade de proliferação celular foi amplamente investigada em tumores humanos. Correlações significativas entre número AgNORs e a atividade de proliferação celular foram reportadas em linfomas não Hodgkin (DERVAN et al., 1989), câncer de mama (RUSCHOFF et al., 1990; KAKEJI et al., 1991), câncer gástrico (XIE et al., 1997), câncer no cérebro (XIE et al., 1996) e recentemente, em lesões epiteliais orais (PILLAI et al, 2005).

Pillai et al. (2005) utilizou o método de quantificação de AgNORs através de cortes histológicos de mucosa bucal sem alterações clínicas, lesões potencialmente malignas (leucoplasia) e malignas (carcinoma espinocelular) para avaliar seu potencial como marcador biológico para a progressão tumoral. O grupo que apresentou a menor mAgNOR foi o grupo de sujeitos que não apresentavam lesões (1.53 ± 0.39), e o que apresentou o maior mAgNOR foi o grupo de indivíduos portadores de lesões malignas (4.65 ± 0.98). O grupo dos pacientes que apresentavam leucoplasias foi subdividido em não-displásicas (mAgNOR= 2.19 ± 0.28) e displásicas (mAgNOR= 2.63 ± 0.14). Os autores concluíram que a correlação entre a mAgNOR por núcleo e o estágio de progressão tumoral foi altamente significativa, e pode ser utilizada como marcador para detecção precoce de lesões potencialmente malignas.

Chern et al. (1997) utilizou a impregnação por prata das regiões organizadoras nucleares em espécimes histológicos pulmonares com diagnósticos considerados suspeitos para malignidade, utilizando como grupo controle, espécimes malignos. A contagem de AgNOR foi significativamente maior em lesões

malignas. Neste estudo, a especificidade e a sensibilidade do escore AgNOR foi de 88% e 80%, respectivamente. Em casos de um claro diagnóstico citológico, a sensibilidade e a especificidade foram de 92% e 100%, respectivamente.

Mourad et al. (1994) introduziu um novo método para quantificação de AgNOR, o pAgNOR, no qual obtém-se as porcentagens de núcleos com mais de um, mais de dois, mais de três e mais de quatro AgNORs. Xie et al. (1997) avaliou o valor diagnóstico e o prognóstico da contagem de AgNOR em espécimes histológicos bucais, comparando os dois métodos de contagem (mAgNOR e pAgNOR) em epitélios sem alterações celulares e arquiteturais, em epitélios com displasia, e em carcinomas espinocelulares. Em ambos os métodos, os valores foram significativamente diferentes entre epitélio histopatológico normal, displasia e carcinoma espinocelular. Um caso específico, que evoluiu de displasia epitelial para carcinoma espinocelular, apresentou os maiores valores de mAgNOR e de pAgNOR > 1. No epitélio normal, 70% dos núcleos mostraram apenas 1 ou 2 AgNORs; já em carcinoma espinocelular, 60% dos casos exibiram mais que 4 AgNORs. O autor também concluiu que, depois de ajustado para todas as variáveis, pAgNOR > 1 foi o parâmetro mais eficiente em prever o período livre de doença e tempo de sobrevivência do paciente. Portanto, estes autores sugerem que pAgNOR é uma ferramenta útil na distinção entre epitélio normal, epitélio displásico e carcinoma espinocelular em mucosa bucal, e mAgNOR tem forte valor prognóstico em carcinoma espinocelular.

A quantificação de AgNOR também é considerado um método auxiliar para monitorar indivíduos que apresentam risco para o desenvolvimento do câncer de boca, expostos a carcinógenos como o tabaco (ORELLANA-BUSTOS et al., 2004; PAIVA et al., 2004).

Sampaio et al. (1999) avaliaram o grau de proliferação das células da mucosa jugal de pacientes fumantes e não fumantes. A partir da contagem de AgNORs, os autores observaram um aumento do número de AgNORs e da porcentagem de núcleos com mais de 5 AgNORs (pAgNOR > 5) em fumantes, sugerindo que há um aumento da velocidade de proliferação nas células da mucosa bucal normal destes indivíduos.

Cançado, Sant'Anna Filho e Yurgel (2001) também avaliaram o grau de proliferação da mucosa bucal normal de pacientes fumantes e não fumantes através

da técnica de AgNOR. Os autores observaram um aumento da atividade proliferativa nos sítios borda de língua e assoalho de boca de pacientes fumantes, e sugerem que o hábito tabágico induz alterações nos parâmetros de regulação celular. Além disso, foi verificado que as células do assoalho de boca têm uma maior taxa de proliferação, se comparadas às da borda de língua, o que sugere, segundo os autores, que a mucosa não-ceratinizada é mais suscetível aos carcinógenos presentes no fumo, em comparação com a mucosa ceratinizada. Estes autores ainda sugerem que a citologia esfoliativa associada técnica de AgNOR pode ser utilizada para a detecção precoce do câncer bucal em pacientes expostos a fumo.

Fontes et al. (2008) comparou, através da técnica de AgNOR associada à citologia esfoliativa, a mucosa da borda de língua de pacientes fumantes e não-fumantes, com ênfase na atividade proliferativa. A mAgNOR diferiu significativamente, sendo maior em pacientes fumantes. Este estudo sugere uma maior atividade proliferativa em pacientes fumantes, comparados aos não fumantes, mesmo na ausência de lesões clínicas. O mesmo resultado foi observado por Orellana-Bustos et al. (2004).

Soares Pinto et al. (2003) também quantificaram as AgNORs em esfregaços obtidos do lábio inferior, borda de língua e assoalho de boca em fumantes e não-fumantes. Os autores observaram um aumento do número de AgNORs em assoalho bucal de fumantes, possivelmente devido ao tamanho da amostra.

Gedoz et al. (2005) avaliaram a taxa de proliferação celular da mucosa normal dos sítios lábio inferior, borda de língua e assoalho de boca de pacientes fumantes e fumantes/etilistas, através da técnica de AgNOR, por um período de 24 meses, considerando a mAgNOR por núcleo, a mensuração área dos pontos de AgNOR por núcleo e o percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 AgNOR ($pAgNOR > 3$ e $pAgNOR > 5$). O grupo fumo e o grupo fumo/álcool apresentaram um aumento de todas as variáveis analisadas nos três sítios anatômicos. Um indivíduo do grupo de fumantes que cessou o hábito tabágico, teve as contagens de AgNOR diminuídas; e o indivíduo do grupo fumantes/etilistas que cessou o hábito de ingerir bebida alcoólica teve os parâmetros de contagem de AgNOR aumentados, sugerindo que este paciente compensou a ausência do consumo de álcool pelo aumento do consumo de cigarro. Os autores ainda sugerem que a técnica de AgNOR pode ser utilizada para monitorar indivíduos expostos à carcinógenos, de

forma individualizada e pode ter um papel importante na decisão do indivíduo de abandonar os hábitos de risco, e que são necessários mais estudos para que se comprove a efetividade da indicação desta análise.

Ahmed et al. (2009), avaliou a atividade proliferativa e atipia celular da mucosa clinicamente normal de indivíduos expostos ao cigarro e à *toombak* (tipo específico de tabaco, utilizado diretamente em contato com a mucosa (IDRIS, 1998)) nos sítios de assoalho de boca e língua, utilizando a técnica de AgNOR e morfometria nuclear. Foi observado que a contagem de mAgNOR em pacientes fumantes é maior em assoalho de boca do que a borda de língua, e que a atipia celular é mais frequente nestes indivíduos. Através da mensuração da área nuclear e da contagem de AgNOR, observou-se que indivíduos tabagistas tem atividade proliferativa significativamente aumentada, o que promove alterações nas células epiteliais que podem progredir para uma displasia celular. Outro achado deste estudo é a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs (pAgNOR>3) foi maior em indivíduos expostos à tabaco. Os autores concluem que a exposição ao fumo é um fator de risco para o desenvolvimento de alterações de proliferação das células epiteliais da mucosa bucal e que a citologia esfoliativa pode ser o método de escolha para preservação de lesões na mucosa bucal.

O mesmo autor, em estudo realizado em 2010, avaliou novamente atipia celular e mAgNOR, na mucosa de indivíduos expostos ao cigarro, ao álcool, à refeições e bebidas quentes e à pimenta, utilizando a citologia esfoliativa nos sítios borda de língua e assoalho de boca, através da aplicação das técnicas AgNOR e cálculo da área nuclear, através de morfometria nuclear. A mAgNOR do grupo de pacientes fumantes foi significamente maior, do ponto de vista estatístico, se comparada à todos os outros grupos. Mas os maiores valores de mAgNOR foram encontrados em indivíduos que apresentavam atipia celular, e esta correlação foi estatisticamente significante. O autor sugere que a forte correlação entre atipia celular e a mAgNOR possibilita que a citologia esfoliativa possa ser uma técnica acessível para controle de populações de alto risco (AHMED, 2010).

Orellana-Bustos et al. (2004), Ogden et al. (1990) e Paiva et al. (2004) sugerem que a análise das AgNORs em citopatologia pode ser um método auxiliar para monitorar indivíduos que apresentam risco para o desenvolvimento do câncer de boca, já que se trata de uma técnica eficaz e pode ser repetida diversas vezes.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos da suspensão do consumo de fumo sobre a velocidade de proliferação em células epiteliais descamadas da mucosa bucal clinicamente normal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar quantitativamente o padrão de proliferação celular pela técnica de AgNOR em um momento inicial e após um período de 6 e 12 meses de suspensão da exposição ao fumo sobre as células epiteliais descamadas da mucosa bucal normal.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Estudo do efeito da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal clinicamente normal por meio da técnica de AgNOR.

Júlia Morais MARTINS¹, Bruna Jalfim MARASCHIN², Raíssa Ananda STRAPASSON³, Fernanda VISIOLI⁴, Manoel SANT'ANNA FILHO⁵, Marli Maria KNORST⁶, Pantelis Varvaki RADOS⁷

¹ Aluna de graduação – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Mestranda em Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Aluna de graduação – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴ Doutora em Odontologia, Professora de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵ Doutor em Odontologia, Professor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁶ Doutora em Medicina, Professora Associada do Departamento de Medicina Interna. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷ Doutor em Odontologia, Professor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

Diferentemente de outros tipos de neoplasia, o Carcinoma Espinocelular não possui um agente ou fator causador claramente isolado e a hereditariedade não desempenha um papel etiológico importante.¹ Dentre os fatores de risco, os mais importantes são o fumo e o álcool.² A mucosa bucal sofre com a ação do fumo através da queima do tabaco, que é um agente iniciador ³, provocando mutações

nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular, o que poderia levar ao aparecimento da doença⁴. Segundo Scully et al. (1992) , mudanças genéticas acumuladas que precedem a transformação maligna podem ser identificadas através de marcadores moleculares ou mudanças celulares.⁵ O estudo de Califano et al. (1996) descreve os eventos genéticos ocorridos em cada etapa do processo de malignização, observando eventos cromossômicos envolvidos nos genes de regulação do ciclo celular (p6 e p53) e proto-oncogenes (cyclin D1) nas diferentes etapas do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço e em lesões benignas.⁶ Sabe-se que durante a progressão da lesão, a célula exibe uma variedade de alterações genéticas e bioquímicas, onde o fator mais marcante é a alteração de proliferação.⁷ E uma maior taxa de proliferação celular aumenta a suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer, uma vez que as células em divisão tornam-se mais propensas a mutações.⁸

Muitos estudos têm utilizado a técnica de AgNOR para comparar e avaliar o grau de alteração da mucosa bucal de pacientes fumantes e não fumantes.⁹⁻¹⁴ Através desta técnica, um grupo de proteínas argirofílicas, que estão presentes nas Regiões Organizadores Nucleolares (NOR), responsáveis pela síntese de RNA ribossômico, são seletivamente impregnadas por prata. O aumento do número de AgNORs é observado em células com alta atividade proliferativa.¹⁵⁻¹⁷ Estes estudos observaram um aumento da velocidade de proliferação celular em pacientes fumantes.

Sudbo et al. (2005), através da análise genética das células da mucosa bucal normal de pacientes fumantes que cessaram o hábito tabágico, observaram que os indivíduos fumantes apresentavam anomalias genéticas que tendiam a retornar ao padrão genético normal quando os mesmos deixavam de fumar.¹⁸ Até o momento não existe na literatura consultada evidências que mostrem o comportamento proliferativo celular da mucosa bucal clinicamente normal de pacientes que cessaram o hábito tabágico através da técnica de AgNOR, e se as alterações celulares provocadas pelo fumo regridem ao padrão de normalidade ao longo do tempo. Este estudo visa avaliar de forma quantitativa o padrão de proliferação celular pela técnica de AgNOR em um momento inicial e após um período de 6 e 12 meses de suspensão da exposição ao fumo sobre as células epiteliais descamadas da mucosa bucal normal.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo é longitudinal com grupo controle para os dados basais.

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no programa de abandono do hábito de fumar do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e pacientes em atendimento clínico na FO-UFRGS (Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e que concordaram em participar do estudo. Os critérios de seleção do Grupo Controle foram: indivíduos que não fumavam ou cessaram o hábito tabágico há mais de 10 anos, que não consumiam bebida alcoólica e que não apresentassem lesões clinicamente visíveis em mucosa bucal (exceto doença periodontal) no momento do exame e da coleta inicial. Para o Grupo Abandono de Fumo e Grupo Fumo, os critérios de seleção foram: indivíduos que fumavam, que participavam do Grupo de Abandono ao Tabagismo do HCPA e que não apresentavam lesões clinicamente visíveis em mucosa bucal (exceto doença periodontal), no momento do exame e da coleta inicial.

Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa foram avaliados em um momento inicial (T1), e após uma média de 6 meses (T2) e 12 meses (T3). Os participantes foram divididos em Grupo Controle (N=44), que são indivíduos que nunca fumaram ou pararam de fumar há mais de 10 anos e não bebiam; Grupo Abandono de Fumo (N=22), que no momento inicial da pesquisa (T1) ainda fumavam, mas cessaram o hábito tabágico ao longo do tempo de acompanhamento (em T2 e T3); Grupo Fumo (N=33), que são indivíduos que fumaram por todo o tempo do acompanhamento da pesquisa.

Os participantes eram entrevistados previamente a cada coleta citopatológica, onde os dados com relação ao hábito tabágico e consumo de álcool eram autorreportados. Nos pacientes fumantes, informações quanto à quantidade de cigarros por dia consumidos e o tempo de duração do hábito eram obtidas, e posteriormente o cálculo de packyears (número de carteiras de cigarro por ano) era realizado.

Esfregaços citopatológicos foram obtidos nos sítios de borda de língua e assoalho de boca, utilizando o seguinte protocolo clínico: 1) Exame clínico da mucosa. Os indivíduos portadores de próteses totais ou removíveis foram instruídos a removê-las; 2) Bochecho com água previamente à coleta citopatológica; 3) Raspado citológico mediante a utilização de escova citológica dos seguintes sítios

buciais: borda de língua e mucosa do assoalho de boca. Foram realizados dois raspados em cada sítio em cada indivíduo; 4) Distensão das células na lâmina; 5) Armazenamento das lâminas em frasco porta-lâminas, fixadas em álcool 96° GL.; e 6) Identificação das lâminas com o número de registro do paciente.

A parte técnica foi realizada na Faculdade de Odontologia - UFRGS, no laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan. O material foi submetido à técnica de AgNOR, onde as lâminas foram submetidas à técnica de impregnação pela prata conforme o protocolo descrito por Ploton et al. 1986.

O método de captura das imagens para avaliação quantitativa correspondeu as primeiras 50 células nucleadas distendidas e não sobrepostas visualizadas em aumento aproximado de 1000x com lente de imersão. Esta captura utilizou uma câmara de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell® (modelo Dimension 5150), utilizando o software Qcapture® (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005)¹.

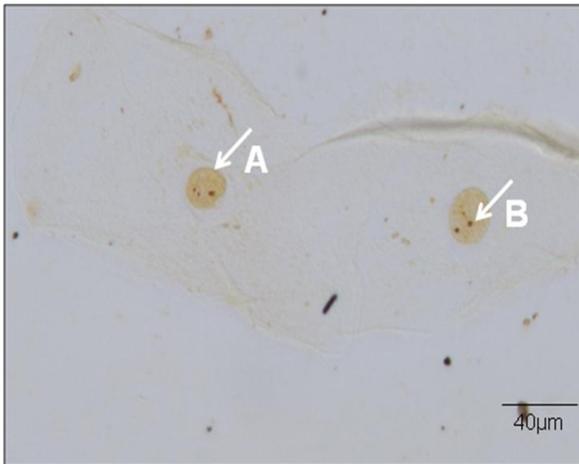


Figura 1 – Células da mucosa bucal, do sítio borda de língua de paciente do GAF em aumento de 1000x. Na seta A, está indicado o núcleo com contorno definido; na seta B, está indicado um núcleo contendo dois AgNORs. Fonte: FO-UFRGS.

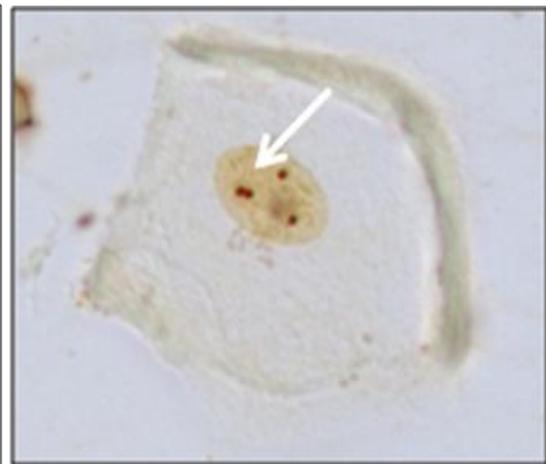


Figura 2 – Célula da mucosa bucal, do sítio borda de língua de paciente do GAF em aumento original de 1000x. Na seta, está indicado um agregado dentro de um núcleo contendo três AgNORs. Fonte: FO-UFRGS

A partir destas imagens capturadas, foram realizadas as contagens das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1998)¹⁹ (Figura 1). No caso da existência de agregados (pontos pretos unidos ou sobrepostos), estes foram

¹ Equipamento presente na Unidade de Morfometria e Histometria, FO-UFRGS e foi adquirido com apoio financeiro da FAPERGS, PROAP04/2005 nº do Processo 0410882.

considerados como uma estrutura única (Figura 2). A partir da quantificação das NORs, foram calculados os índices de mAgNOR, sendo as AgNORs quantificadas divididas pelo número de células (50); e também o índice pAgNOR, que é a porcentagem de células com mais de 1 e 3 AgNORs (pAgNOR>1 e pAgNOR>3).

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS em 25/06/2008, projeto número 08-262. Todos os pacientes que participaram desta pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Informado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi realizada, através do *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. São Diego, Califórnia, USA). O teste realizado é do tipo T não paramétrico.

RESULTADOS

Noventa e nove indivíduos foram avaliados no momento inicial. Destes, dez não retornaram para avaliação longitudinal, mas foram incluídos na análise em T1, e portanto, fazem parte do Grupo Fumo.

Tabela 1 – Características da amostra.

	GC (N=44)	GAF (N=22)	GF (N=33)
MÉDIA DE IDADE	41,8±11,1	54,14±5	58,6±3,5
GÊNERO	61% SEXO FEMININO	77% SEXO MASCULINO	59% SEXO MASCULINO
TOTAL DE CONSUMIDORES DE ÁLCOOL	0	13	17
MÉDIA DE CIGARROS/DIA	0	29±7,9	22,7±11,4

A média de idade dos participantes do Grupo Controle (41,8±11,1) foi menor do que a média de idade dos Grupos Abandono de Fumo (54,14±5) e Fumo (58,6±3,5). A maioria dos indivíduos do GC é do sexo feminino (61%); e no GAF os indivíduos do sexo masculino correspondem à maioria (77%), bem como no GF (59%). A maioria dos indivíduos deste estudo é da raça branca (85%). (Tabela 1)

A média de cigarros consumidos no momento inicial pelo GAF foi de 29±7,9; e de 22,7±11,4 no GF. Dos 34 participantes que não cessaram o hábito tabágico, 21 participaram do estudo longitudinal; destes, 13 diminuíram o consumo e 8 permaneceram fumando a mesma quantidade de cigarros ao longo do tempo. Os pacientes que diminuíram, passaram a consumir uma média de 9,23±10,2 cigarros por dia. (Tabela 1)

No GC nenhum paciente era consumidor de bebida alcoólica. Sete indivíduos do GAF consumiam algum tipo de bebida alcoólica; seis costumavam beber e cessaram o hábito no mínimo 4 anos antes da coleta inicial, e nove pacientes nunca fizeram uso de bebida alcoólica. Oito integrantes do GF consumiam algum tipo de bebida alcoólica no momento da coleta inicial; nove costumavam beber e cessaram

o hábito no mínimo 10 anos antes da primeira coleta; e 16 indivíduos nunca consumiram bebida alcoólica. (Tabela 1)

Cada participante da pesquisa gerava quatro lâminas, das quais duas (uma de cada sítio anatômico) eram impregnadas por prata através da técnica de AgNOR. O tempo dispensado na captura das imagens de cada lâmina foi de aproximadamente 20 minutos, somado ao tempo necessário para a contagem das AgNORs, que foi de aproximadamente 5 minutos, o tempo gasto em cada indivíduo foi de 50 minutos.

Não houve diferença estatística na mAgNOR no T1 entre indivíduos do sexo masculino e feminino ($p=0,56$), nem entre pacientes consumidores de bebida alcoólica e não consumidores ($p=0,53$), em ambos os sítios analisados

Tabela 2 – Média de AgNOR dos Grupos Controle, Abandono de Fumo e Fumo, em ambos os sítios analisados em T1, T2 e T3.

		mAgNOR		
		GC (n=44)	GAF (n=22)	GF (n=33)
BL	T1	2,32±0,3	2,66±0,3*	2,80±0,4*
	T2	2,21±0,4	2,21±0,5	2,66±0,5
	T3	2,23±0,3	2,06±0,4**	2,85±0,3
AB	T1	2,75±0,2	2,89±0,4*	3,11±0,4*
	T2	2,72±0,5	2,58±0,5	3,01±0,3
	T3	2,72±0,4	2,51±0,6**	3,31±0,2

* $p<0,05$; ** $p<0,001$

Nos três tempos analisados, a mAgNOR do sítio assoalho de boca foi estatisticamente maior se comparada à borda de língua ($p<0,001$) em todos os grupos.

No momento inicial (T1), GAF e GF possuíam mAgNOR mais elevado do que o GC em ambos os sítios analisados ($p<0,05$). Ao longo do acompanhamento, o GC manteve os valores de mAgNOR constantes; o GAF teve uma diminuição em mAgNOR nos sítios analisados; o GF apresentou, em T3, valores de mAgNOR

semelhantes aos do momento inicial (T1), havendo uma flutuação no tempo intermediário de acompanhamento (Tabela 2).

Em T3, o GAF apresentou mAgNOR estatisticamente menor, se comparado ao valor encontrado em T1 ($p < 0,001$), e semelhante ao GC, tanto em borda de língua ($p = 0,07$) e assoalho de boca ($p = 0,5$). Já o GF manteve as maiores médias por todo o estudo, inclusive em T3, nos dois sítios analisados (Tabela 2).

Tabela 3 – Variação individual da mAgNOR (%)

	BORDA DE LÍNGUA			ASSOALHO DE BOCA		
	MIN	MÁX	MED	MIN	MÁX	MED
GC	2	29	14	1	23	9
GAF	1	58	25	1	56	19
GG	0	25	12	0	46	11

A variação individual da mAgNOR ao longo do tempo de acompanhamento nos indivíduos do GC foi de 2% à 29% no sítio borda de língua; e de 1% à 23% no sítio assoalho de boca. No GAF essa variação foi de 1% à 58% no sítio borda de língua; e de 1% à 56% no sítio de assoalho de boca. Já no GF, a variação foi de 0% à 25% na borda de língua e de 0% à 46% em assoalho de boca. (Tabela 3)

Tabela 4 – Parâmetro pAgNOR>1 nos Grupos Controle, Abandono de Fumo e Fumo, em ambos os sítios analisados, em T1, T2 e T3.

		pAgNOR>1 (%)		
		GC (n=44)	GAF (n=22)	GF (n=34)
BL	T1	77,4±13,3	88,8±8,5	86,6±8,5
	T2	76±13	70,9±14,1	81,2±14,5
	T3	78±11,4	63±16,4**	86,9±7,6
AB	T1	92±5,1	91±11	94,2±9,4
	T2	89,7±7,8	83,2±17,1	93,8±10,6
	T3	89,6±10,1	79,8±18,4**	96,1±3,2

** p<0,001

Tabela 5 – Parâmetro pAgNOR>3 nos Grupos Controle, Abandono de Fumo e Fumo, em ambos os sítios analisados, em T1, T2 e T3.

		pAgNOR>3 (%)		
		GC (n=44)	GAF (n=22)	GF (n=34)
BL	T1	11,7±8,6	19±12,5*	25,87±13,8*
	T2	9,8±6,1	11,6±13,2	20,6±12,7
	T3	11,8±5,9	10,4±11,5**	27,4±12,7
AB	T1	19,3±10,8	25,2±12,7	38,3±13,3
	T2	18,5±13,5	19,1±16,7	32,2±13,6
	T3	22,5±10,4	18,4±15**	40,9±10,2

* p>0,05; ** p<0,001

No parâmetro pAgNOR, observa-se que o GC manteve os valores semelhantes nos três tempos, ao contrário do GAF, que diminuiu o pAgNOR>1 e o pAgNOR>3 até níveis semelhantes aos de pacientes que nunca fumaram nos dois sítios analisados (p<0,001). Já o GF apresentou o pAgNOR>1 e >3 maiores nos três tempos, se comparado aos outros grupos (Tabelas 4 e 5).

Foi observada uma correlação estaticamente significativa positiva entre a duração do hábito tabágico e a mAgNOR no sítio borda de língua ($p < 0,05$). Quando considerada a quantidade de cigarros consumidos no dia e a quantidade de carteiras de cigarro consumidas por ano, não houve correlação com os parâmetros analisados.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de uma lesão clínica potencialmente maligna ou maligna é precedido por alterações celulares subclínicas cumulativas que estão relacionadas à proliferação celular.⁷ Este estudo demonstrou de forma significativa que pacientes que fumam tem maiores taxas de velocidade de proliferação celular, o que condiz com os estudos presentes na literatura^{11,13,14}. Além disso, no período de acompanhamento de um ano, foi observado que indivíduos que cessam o hábito tabágico apresentam uma diminuição da velocidade de proliferação celular, retornando aos padrões semelhantes aos de pacientes que nunca fumaram.

Tanto mAgNOR quanto pAgNOR estavam aumentados no sítio de assoalho de boca no três tempos analisados, como ocorreu no estudo de Cançado, Sant'Anna Filho e Yurgel, onde os autores do estudo sugerem que a mucosa não-ceratinizada é mais suscetível à ação de carcinógenos e que, por isso, apresenta maior velocidade de proliferação.¹² Além disso, está estabelecido na literatura que a boca apresenta variações no padrão de citologia esfoliativa, dependendo do sítio anatômico onde o material é coletado.²²

A citologia esfoliativa, associada à técnica de AgNOR tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de técnicas que visem o diagnóstico precoce de alterações bucais, identificando pacientes de risco que devem ser acompanhados de forma mais criteriosa.⁸⁻¹⁴ No presente estudo, a variação individual da mAgNOR ao longo do tempo dos pacientes do GC, GAF e GF foi calculada. A variação do GC foi de, em média, 20%. Já no GF, houve uma grande diferença entre as variações dos indivíduos da amostra, onde alguns indivíduos variaram até 46%. Esta amplitude maior de variação nos indivíduos expostos permite propor a aplicabilidade da técnica de mAgNOR associada à citopatologia com uma nova abordagem de acompanhamento de indivíduos expostos aos fatores de risco para o carcinoma espinocelular da mucosa da boca. Considerando que o carcinoma espinocelular é uma doença individual, dependente da susceptibilidade do hospedeiro, o modelo proposto poderá ser empregado com foco singular.

Este estudo encontrou uma relação estatisticamente positiva entre a duração do hábito tabágico e a mAgNOR do sítio borda de língua ($p < 0,05$). Na literatura, há evidências entre a quantidade de cigarros consumidos diariamente e atividade proliferativa,^{22,21} o que não foi observado neste estudo. Apesar desta relação ter sido

significativa, não interferiu na diminuição progressiva da velocidade de proliferação dos pacientes que cessaram a exposição ao carcinógeno.

A interferência do álcool no processo de carcinogênese não está esclarecido na literatura. Os estudos consultados apresentam resultados controversos. Mas estudos que acompanham indivíduos fumantes e bebedores, apresentam as maiores taxas de proliferação neste grupo, sugerindo um sinergismo entre estes carcinógenos.^{10,13,21} No presente estudo, o GF apresenta um maior número de indivíduos que bebem ou costumavam beber, isto pode explicar o fato de que os valores de mAgNOR e pAgNOR serem maiores do que o GAF em T1. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados entre indivíduos que fumavam e que fumavam e bebiam, possivelmente devido ao reduzido tamanho da amostra que era exposta ao álcool.

CONCLUSÕES

1. Indivíduos fumantes possuem maior velocidade de proliferação celular da mucosa bucal;
2. Indivíduos que cessam o hábito tabágico diminuem a velocidade de proliferação celular até assemelhar-se à de pacientes que nunca fumaram no período de acompanhamento;
3. A variação individual da mAgNOR pode ser um parâmetro útil na detecção de pacientes considerados de risco para o desenvolvimento de lesões na mucosa bucal;
4. A continuidade deste modelo de acompanhamento longitudinal poderá trazer novas contribuições para o entendimento e a prevenção do câncer de boca.

REFERÊNCIAS

1. Carli ML et al. Características clínicas, epidemiológicas e microscópicas do câncer bucal diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. Rev Bras Cancerol. 2009; 55(3):205-2011.
2. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer, Câncer de Boca, Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. São Paulo; 2012. p. 40-1. [acessado em 2012 out 26]. Disponível em: <http://www.INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.gov.br/estimativa/2012>.
3. Franks LM et al. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 1996. Cap. 1, p.1-20.
4. Ogden GR, et al. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. J Oral Pathol Med. 1998;28(5):216-20.
5. Scully C. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. Br Dent J. 1992 Jul;173(2):53-59.
6. Califano J, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. 1996 Jun;56(11):2488-92.
7. Kotelkinov VM, et al. Cell kinetics of head and neck cancers. Clin Cancer Res. 1995;1(5): 527-37.
8. Oijen MG, et al. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. Oral Oncol. 1998 Jul;34(4):297-303.
9. Sampaio HC, et al. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Acta Cytol. 1999 Mar-Apr;43(2):117-20.
10. 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. Anal Quant Cytol Histol. 2007 Aug;29(4):231-8.
11. Fontes PC, et al. Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. Head Neck Pathol. 2008;2:157-62.
12. Cançado RP, et al. Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral Oncol 2001; 37:446-54.
13. Ahmed AGA, et al. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, pepper and hot meals, using the AgNOR and Papanicolau staining techniques. Diagn Cytopathol. 2009; 38(7): 489-95.
14. Ahmed AGA, et al. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to *toombak* and smoking. Rare Tumors. 2009; 1(18): 50-2.
15. Trerè D. Agnor staining and quantification. Micron. 2000;31:127-31.
16. Derenzini M, et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. J Pathol. 2000 Jun;191(2):181-6.
17. Derenzini M, et al. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. Int Rev Exp Pathol. 1991; 32:149-92.

18. Sudbo J, et al. Risk markers of oral cancer in clinically normal mucosa as an aid in smoking cessation counseling. *J Clin Oncol*. 2005 Mar;9(23):1957-33.
19. Crocker J, et al. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*. 1989 Jul;158(3):185-8.
20. Bohrer PL, et al. Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa clinicamente normal exposta à carcinógenos. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
21. Burzlaff JB, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*. 2007 Dec;18(6):367-75.
22. Kapczinski MP. Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através da citologia esfoliativa. 1997. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Odontologia.
23. Zimmermann ER, et al. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res*. 1965 Jul-Aug;44:627-31.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi realizado ao longo de três anos, dos quais em um, fui bolsista de iniciação científica. Neste período tive a oportunidade de conviver com professores e colegas mais experientes, o que me proporcionou muito conhecimento e a vivência muitas experiências traduzidas em aprendizado. Além disso, criei vínculos que tornaram-se amizades. E o resultado final desta jornada foi descrita neste trabalho de conclusão de curso.

Com muita satisfação, participei desde o início dos diferentes processos de concretização desta pesquisa, trabalhando na captação de indivíduos para o estudo, captura de imagens, contagem das AgNORs, tabulação dos resultados e análise estatística e discussão. Os resultados encontrados foram conclusivos e positivos. Mas acima de tudo, este trabalho marca o término de um período de grande amadurecimento pessoal e profissional da minha vida.

A finalização deste curso de graduação com uma pesquisa que tem o potencial para contribuir no estabelecimento de uma técnica clinicamente aplicável que vise a detecção ainda mais precoce de alterações celulares de indivíduos considerados de risco para o desenvolvimento de Carcinoma Espinocelular, possibilitando que estas lesões sejam prevenidas ou diagnosticadas prematuramente, é muito gratificante. Também representa o esforço de todo grupo que estive envolvida em contribuir para melhorar a qualidade de vida das pessoas.

Finalmente, me sinto honrada de ter tido a oportunidade de cursar a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial o curso de Odontologia, e ter a oportunidade de devolver à sociedade aquilo que ela investiu na minha formação.

REFERÊNCIAS

- Almeida JD, et al. Exfoliative cytology as a diagnostic method in Stomatology. J Dent Res. 1994;73:765.
- Ahmed AGA, et al. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, pepper and hot meals, using the AgNOR and Papanicolau staining techniques. Diagn Cytopathol. 2009; 38(7): 489-95.
- Ahmed AGA, et al. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to *toombak* and smoking. Rare Tumors. 2009; 1(18): 50-2.
- Bohrer PL, et al. Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa clinicamente normal exposta à carcinógenos. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Burzlauff JB, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. Cytopathology. 2007 Dec;18(6):367-75.
- Caldeira PC, et al. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. J Oral Pathol Med. 2011; 40 (4):305–11.
- Califano J, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res. 1996 Jun;56(11):2488-92.
- Cançado RP, Sant’Anna Filho M, Yurgel LS. Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral Oncol. 2001 Jul; 37(5):446-54.
- Carli ML, et al. Características clínicas, epidemiológicas e microscópicas do câncer bucal diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. Rev Bras Cancerol. 2009; 55(3):205-2011.
- Chern JH, et al. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. Chest. 1997 Jun;111(6):1591-96.
- Chattopadhyay A, et al. AgNOR count as objective marker for dysplastic features in oral leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2002; 31(9): 512-17.
- Costa AL, et al. PCNA/ AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 1999 Nov; 28(10):438–441.
- Crocker J, et al. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol. 1989 Jul;158(3):185-8.

Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol.* 1991; 32:149-92.

Derenzini M, Trerè D. AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralb Pathol.* 1994 Mar;140(1): 7-10.

Derenzini M, et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol.* 2000 Jun;191(2):181-6.

Dervan PA, et al. Breast carcinoma kinetics. argiophilic nuclear organizer regions count correlate with Ki-67 scores. *Am J Clin Pathol.* 1989 Oct;92(4):401-7.

Elangovan, T, et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: A quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res.* 2008 Apr-Jun;19(2):141-6.

Fenoglio-Preiser CM. Selection of appropriate cellular and molecular biologic diagnostic tests in the Evaluation of cancer. *Cancer.* 1992 Mar;69(6 Suppl): 1607-32.

Franks LM, et al. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3 rd ed. Oxford: Oxford University Perr. 1996. Cap. 1, p.1-20.

Fontes PC, et al. Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head Neck Pathol.* 2008 Sep; 2(3):157–62.

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. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007 Aug;29(4):231-8.

Hashibe M, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Feb;18(2):541-50.

Hildebrand L, et al. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(2):28-34.

Hoffmann D, et al. Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. *IARC Sci Publ.* 1986;(74):145-65.

Idris AM, et al. The swedish snus and the Sudanese *toombak*: are they different? *Oral Oncol.* 1998 Nov;34(6):558-66.

Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer, Câncer de Boca, Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. São Paulo; 2012. p. 40-1. [acesso em 2012 out 26]. Disponível em: http://www.INSTITUTO_NACIONAL_DO_CÂNCER.gov.br/estimativa/2012

Junqueira, Carneiro. A célula cancerosa. In: *Biologia celular e molecular.* 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. Cap. 19, p.292-301.

Takeji Y, et al. Predictive value of Ki67 and argiophilic nucleolar organizer regions staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer res.* 1991;51:3503-6.

Kotelnikov VM, et al. Cell kinetics of head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 1995;1(5): 527-37.

Mourad WA, et al. Argyophilic Nucleolar Organizer Regions in breast carcinoma: quantification with special reference to staining patterns. *Zentralbl Pathol.* 1994;140:23-30.

Ogden GR, et al. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med.* 1998;28(5):216-20.

Oijen MG, et al. Increased number of proliferating cells in oral epithelium form smokers and ex-smokers. *Oral Oncol.* 1998 Jul;34(4):297-303.

Orellana-Bustos AL, et al. Evaluation of keratinization and AgNOR count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral.* 2004;9:197-203.

Paiva RL, et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A Citopathologic Study. *Anal Quant Cytol and Hystol.* 2004;26:175-180.

Piche A, et al. Prognostic relevance of AgNOR in tumor pathology. *Micron.* 2000;31(2):131-41.

Pillai K, et al. Significance of silver-stained Nucleolar Organizer Regions in early diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *In vivo.* 2005 Jul-Aug;19(4): 807-12.

Rapoport A. *Câncer da boca.* 1ª ed. São Paulo: Pancast. São Paulo. p. 19-20.

Reis SRA. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e orofaringe: fumo, álcool e outros determinantes. *RPG.* 1997;4:127-32.

Ruschoff J, et al. Assessment of nucleolar organizer regions by automatic image analysis in breast cancer: correlation with DNA content, proliferation rate, receptor status and histopathological grading. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990;116:480-5.

Sampaio HC, et al. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytol.* 1999 Mar-Apr;43(2):117-20.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Jun;32(3):233-45.

Schwartz JL, et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral Oncol.* 2003;39:842-54.

Scully C. Oncogenes, onco-supressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J.* 1992 Jul;173(2):53-59.

Soares-Pinto TA, et al. Avaliação quantitativa de núcleo/citoplasma e AgNORs em células da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. *Rev Fac Odontol.* 2003;44:17-21.

Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci.* 2003 Oct;326(4):179-82.

Trerè D. Agnor staining and quantification. *Micron.* 2000;31:127-31.

Xie X, et al. Nucleolar organizer regions and prognosis in glottic squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 1997;19:20–6.

Xie X, et al. Prognostic value of two AgNOR quantification methods in glottic and oral carcinomas. *Head Neck Can.* 1996:453-8.

Zavras AI, et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol.* 2001;37:28-35.

Winn DM. Tobacco use and oral diseases. *J Dent Educ.* 2001;65:306–12.