

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

BRUNA JALFIM MARASCHIN

**AVALIAÇÃO LONGITUDIANAL DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS
DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTO E NÃO EXPOSTOS AO TABACO E QUE
CESSARAM O HÁBITO TABÁGICO.**

PORTO ALEGRE

2013

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

BRUNA JALFIM MARASCHIN

AVALIAÇÃO LONGITUDIANAL DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTO E NÃO EXPOSTOS AO TABACO E QUE CESSARAM O HÁBITO TABÁGICO.

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE

2013

Agradeço,

Ao pessoal lá de casa, pelo apoio em todos os momentos. À minha **mãe** pelo colo aconchegado e exemplo de mulher que és, ao meu **pai** pelas palavras sábias e pela perseverança que tem na vida, e ao meu **irmão** por me mostrar que não devemos desistir dos nossos sonhos. Agradeço o incentivo e os esforços desmedidos para que a Odontologia fosse possível na minha vida. Muito Obrigada!

Ao **Cristiano**, Cris, pela inesgotável paciência, pelas conversas reconfortantes, pelo companheirismo, e por ter sido tão compreensivo nesta reta final. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À **Joca**, que sempre esteve ao meu lado, e me considera como se fosse da família.

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

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

Aos "**patológicos**", aqueles que entendem as minhas angústias e felicidades. De colegas a amigos, muito obrigada pelo apoio constante.

Às amigas **Cátia**, **Cauana** e **Greice**, colegas e amigas para a vida toda. Obrigada por compreenderem a minha ausência durante este período.

Aos **amigos** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha irmã de alma, **Vivi**, pelos inúmeros conselhos, incansáveis conversas, e por ser parte fundamental nesta caminhada, e peça indispensável na minha vida. Ao amigo **Peu**, pelo apoio, carinho, e as conversas sobre a vida. Aos dois pela **Maria** linda.

À **Júlia**, **Raíssa** e **Leonardo**, pela ajuda em todas as fases deste trabalho, que foi essencial para a sua concretização.

À professora **Fernanda** Visioli, que esteve presente em todas as etapas desta jornada, sempre disposta a ajudar. Compreendendo os questionamentos que surgiram, tentando acalmar o coração ansioso. Muito obrigada pelo carinho e atenção que despendestes na construção desta dissertação.

Ao professor **Vinícius** Carrard, por estar sempre disposto a ajudar, e pela colaboração na elaboração deste trabalho.

Aos professores **Anna** Fossatti, **Laura** de Campos Hildebrand, **Márcia** Gaiger de Oliveira, **Manoela** Domingues Martins, **Marcelo** Lammers, **Marco** Antonio Trevizani Martins, pelos ensinamentos compartilhados.

À **Alessandra** e **Chris**, pelo carinho, amizade, e pelos ensinamentos laboratoriais.

À equipe do Setor de Pneumologia do HCPA por terem possibilitado este trabalho, em especial à professora **Marli** Maria Knorst.

À **Adriana** Aguiar, pelo auxílio prestado.

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

OBJETIVO: O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar, através da citopatologia e da técnica de AgNOR, as taxas de proliferação celular da borda de língua e assoalho de boca de indivíduos que abandonaram o hábito tabágico e de indivíduos que nunca fumaram, ao longo de um ano. O segundo objetivo foi avaliar a influência da condição de higiene bucal na velocidade de proliferação da mucosa bucal de sujeitos não expostos ao tabaco e ao álcool. **MÉTODOS:** Foram incluídos na amostra inicial 99 indivíduos. As coletas foram realizadas em borda de língua e assoalho de boca, em um momento inicial (baseline), após em média 6 meses (6 meses) e após 12 meses (12 meses). Os participantes foram divididos em três grupos de acordo com os seguintes critérios: Grupo Controle (GC) (n=44): indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS (FO-UFRGS), que nunca fumaram, e que ingeriam até 2 doses (28g) de álcool por semana. Grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo (GAT) (n=22): indivíduos em acompanhamento no Grupo de Apoio ao Fumante do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GAF-HCPA), que fumavam no momento do início do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico, alcoólistas ou não. Grupo de Tabagistas (GT) (n=33): indivíduos em acompanhamento no GAF-HCPA, que fumavam no momento do início do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo do acompanhamento, alcoólistas ou não. As amostras foram sujeitadas à técnica de AgNOR e quantificadas por três examinadores previamente calibrados. A média de AgNOR por núcleo (mAgNOR) e a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs (pAgNOR>3) foram calculados nas 50 primeiras células, nucleadas, não sobrepostas, e bem distendidas. Os dados da condição de higiene bucal (perda dentária, sangramento gengival e profundidade de sondagem) foram obtidos nos registros dos prontuários disponíveis na FO-UFRGS. **RESULTADOS:** Na coleta baseline, os grupos expostos ao fumo (GAT e GT) apresentaram os valores da velocidade de proliferação celular maiores quando comparados aos indivíduos do GC. Ao longo do tempo, os indivíduos do GAT apresentaram uma redução da taxa de proliferação celular em ambos os sítios analisados, até atingir valores semelhantes aos do GC. Os resultados deste estudo, ainda, sugerem que a variação individual de mAgNOR dos indivíduos do GC, ao longo de um ano de acompanhamento, é de no máximo 23% para o sítio borda de língua, e de 18% para o sítio assoalho de boca. Indivíduos com mais de 3 dentes perdidos apresentam valores superiores de mAgNOR quando comparado com sujeitos com menos de 3 dentes perdidos, no sítio borda de língua (p<0.01). **CONCLUSÕES:** Indivíduos não expostos ao tabaco e ao álcool apresentam a contagem de AgNOR similar ao longo de 12 meses de acompanhamento, com variações pouco significativas. A partir dos resultados deste estudo pode-se concluir que a cessação do hábito tabágico reduz a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal.

OBJECTIVE: The primary aim of this study was to assess, through cytopathology and AgNOR staining technique, the cell proliferation patterns of the border tongue and floor of mouth of pattern who abandoned the smoking habit, over a year. A secondary aim was to investigate the influence of oral health status on cell proliferation rates in the oral mucosa of individuals not exposed to tobacco and alcohol. **METHODS:** The initial sample comprised 99 individuals. Samples were collected from border tongue and floor of the mouth at initial moment (baseline), after 6 (6 months) and 12 months (12 months). The subjects were divided into three groups, according to the following criteria: Control Group (CG), n = 44: individuals who presented at the clinic of the School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, seeking dental treatment, who never smoked and who drank up to 2 servings (28g) of alcohol per week. Abandonment of Tobacco Group (ATG), n=22: individuals in monitoring at the HCPA Group of Smokers, who smoked at the baseline time, and over time cease the smoking habit, alcoholics or not. Smokers Group (SG), n = 33: individuals in monitoring at the HCPA Smoking Support Group, who smoked at baseline, and that did not stop the smoking habit during the research, alcoholics or not. The samples were subjected to the AgNOR technique and quantified by three calibrated examiners. Mean AgNORs per nucleus (mAgNOR) and the percentage of cells with more than three AgNORs per nucleus (pAgNOR>3) were calculated from the first 50 well-arranged, non-overlapping nucleated cells. Oral health data (missing teeth, gingival bleeding and probing depth) were collected from each patient's record. **RESULTS:** At baseline collection the exposed groups to tobacco (ATG and SG) had higher proliferation rate, compared to the CG. Over time, individuals of ATG showed a reduction in cell proliferation in both sites analyzed, reaching values similar to the CG. The present findings show that that individuals not exposed to carcinogens maintain a relatively steady cell proliferation rate in the oral mucosa, with up to 23% of variation in the border of tongue and 18% in the floor of the mouth. Furthermore, it was observed that individuals, not exposed to tobacco and alcohol, with more than three missing teeth presented significantly higher mAgNOR in the border of the tongue ($p<0.01$). **CONCLUSIONS:** Individuals not exposed to tobacco and alcohol maintain the count of AgNOR similar over 12 months, with a scarcely variation. More over the smoking habit cassation decreases the proliferation rate of oral mucosa over 1 year of follow-up.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	8
2. OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GERAL:	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
3. ARTIGO CIENTÍFICO 1	23
4. ARTIGO CIENTÍFICO 2	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
ANEXOS	58

*Artigo Científico formatado de acordo com as instruções da revista *Archives of Oral Biology*.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O consumo de tabaco é responsável diretamente pela morte de 5 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, e indiretamente mata mais 600.000 pessoas,¹ sendo o câncer culpado por um terço dessas mortes.² Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC) bucal – que representa aproximadamente 94% de todas as neoplasias malignas de boca – e das lesões potencialmente malignas da cavidade bucal são o tabagismo e o etilismo.³ Na região sul do Brasil, o CEC bucal ocupa a sexta posição das lesões malignas mais prevalentes em homens. Estimou-se para 2012 a ocorrência de 14.170 novos casos de câncer de boca no país.⁴

Homens acima dos 40 anos que fumam e bebem são considerados a população de risco para o desenvolvimento destas lesões.⁵ Os sítios de acometimento mais comuns dos CECs e das lesões potencialmente malignas são lábio inferior, assoalho de boca e borda de língua.⁶

O tabaco e as substâncias que derivam dele após a sua combustão estão fortemente relacionados com a carcinogênese de diversos tipos de tumores malignos. Mais de 60 substâncias carcinogênicas foram encontradas na fumaça do cigarro, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as nitrosaminas, e as aminas aromáticas, considerados carcinógenos potentes, que são capazes de formar tumores em animais após terem sido submetidos a pequenas doses.⁷ A combustão do tabaco causa estresse oxidativo nos tecidos, ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de resposta antioxidante. Nestas situações, espécies reativas de oxigênio podem interagir e danificar proteínas, lipídios, carboidratos e o próprio DNA (Ácido desoxirribonucleico). Estes danos podem resultar em eventos iniciadores da carcinogênese.^{8,9}

O etanol é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como carcinógeno humano, e atua como fator de risco independente para o câncer de boca.¹⁰ Após a sua

ingestão, o álcool é convertido em acetaldeído pela enzima álcool-desidrogenase (ADH), que por sua vez é capaz de provocar alterações no DNA, como a quebra de sua dupla fita. Estudos demonstraram que o etanol, quando em contato com a mucosa bucal, provoca alterações na homeostase do tecido epitelial, causando o aumento da permeabilidade da mucosa e a facilitação da penetração de agentes carcinogênicos, como o tabaco, atuando assim como agente facilitador.¹¹ O etanol provoca o aumento da descamação das camadas superficiais do epitélio, causando a sua atrofia,¹² e de maneira compensatória ocorre o aumento da proliferação celular das camadas mais profundas do epitélio, a fim de que seja mantida a homeostase e a integridade tecidual. Isto poderia favorecer mutações e o acúmulo de danos, levando ao desenvolvimento de câncer.¹³ O álcool em associação ao tabaco provoca um efeito multiplicativo, e não aditivo, sobre a mucosa bucal, em relação ao risco de desenvolvimento do câncer de boca.³

A cessação do hábito tabágico e do consumo de etanol é o método mais eficaz para prevenção do desenvolvimento de lesões malignas e potencialmente malignas da cavidade bucal.¹⁴ Marron et al. (2010), em uma revisão sistemática da literatura, concluíram que entre 1 e 4 anos após a cessação do hábito tabágico se observa a diminuição no risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, e em torno de 20 anos após a suspensão do tabagismo o risco para o desenvolvimento do câncer de cavidade bucal é muito similar ao de indivíduos que nunca haviam fumado.¹⁵

O rastreamento da população garante a redução da incidência de câncer. Uma vez que os indivíduos de maior risco para o desenvolvimento de câncer de boca são identificados, é indispensável que seja realizada a inspeção visual da mucosa destes de maneira sistemática. Segundo Sankaranarayanan et al. (2005), baseados em seus achados, esta prática pode prevenir a morte de pelo menos 37.000 pessoas ao ano pelo acometimento do câncer de boca em todo o mundo.¹⁶

Através da inspeção visual da mucosa bucal, apenas as alterações clinicamente visíveis são identificáveis, porém diversas modificações a nível celular e molecular já estão acontecendo e acumulando-se antes mesmo do aparecimento de qualquer alteração clinicamente detectável.¹⁷ Reconhecer estas transformações parece ser importante, pois a detecção possibilita a mudança de comportamento do indivíduo investigado, e quando possível a reversão do estado da doença em uma fase inicial.³ A inspeção visual, por si só, não é capaz de estabelecer o real prognóstico das lesões e da mucosa examinadas,¹⁸ e a associação de outros métodos, como marcadores moleculares, é importante para o rastreamento efetivo dos indivíduos de risco para o câncer de boca.¹⁹

A citopatologia é um método de diagnóstico que consiste na remoção das células mais superficiais da mucosa por meio de raspados, para posterior análise microscópica.²⁰ O seu emprego tem maior aplicação clínica no controle do câncer ginecológico. Para este tipo específico de doença a citopatologia contribuiu de maneira significativa com a diminuição da morbidade e mortalidade nas últimas décadas.²¹ Nos países nórdicos, por exemplo, houve uma redução de 80% na mortalidade e de 40% na incidência do câncer cervical graças ao monitoramento realizado em mulheres através da citopatologia.²² Na cavidade bucal, durante alguns anos o emprego da citopatologia esteve em alta e direcionado para diagnóstico do câncer bucal. Entretanto, a técnica apresentava limitações, devido aos altos índices de falsos positivos e falsos negativos. O seu papel diagnóstico era indicativo e não definitivo. Logo, a citopatologia caiu em desuso pela perda de credibilidade em seu potencial para diagnóstico.²³

Na segunda metade da década de 90 do século passado, porém, surgiram os primeiros estudos, que utilizaram a citopatologia como recurso para detectar alterações precoces na mucosa bucal devido à exposição ao tabaco e ao álcool, principalmente quando lesões não podiam ser clinicamente detectadas. Estes estudos associaram métodos quantitativos à citopatologia para avaliar o processo de maturação epitelial,²⁴⁻²⁶ proliferação celular,²⁷⁻³² e dano celular.³³⁻³⁶

As técnicas quantitativas associadas à citopatologia parecem ser boas aliadas à inspeção visual no rastreamento dos indivíduos de risco para o desenvolvimento do câncer de boca. Além de serem técnicas de fácil execução e baixo custo, agregaram valor ao exame citopatológico, uma vez que aprimoram a acurácia do poder diagnóstico deste tipo de exame.²³ Diversas técnicas quantitativas são empregadas associadas à citopatologia para a avaliação da mucosa de indivíduos expostos aos fatores de risco e sem lesões clínicas. Destacam-se a técnica de Micronúcleos^{33,37,38} e a técnica de AgNOR.²⁷⁻³²

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.³⁹ Segundo Piche et al. (2000), a taxa de proliferação é determinante para a progressão tumoral.⁴⁰ Para avaliá-la pode-se utilizar diversos marcadores conhecidos, como o PCNA, Ki-67, BrdU e a técnica de AgNOR. A impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) tem sido utilizada para avaliar a velocidade de proliferação celular em cortes histológicos de lesões potencialmente malignas e tumorais.⁴¹⁻⁴⁶ Contudo, poucos estudos avaliaram a taxa de proliferação celular de lesão bucais através da citologia esfoliativa associada à técnica de AgNOR.^{47,48}

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são alças de DNA que, em humanos, localizam-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22.⁴⁹ As NORs são unidades funcionais que compõem parte do nucléolo e realizam a síntese de RNAr (Ácido Ribonucleico Ribossômico). Composto o nucléolo existe também um grupo peculiar de proteínas ácidas, que possuem afinidade tintorial pela prata, e são rapidamente visualizadas ao serem impregnadas pela prata, sendo então denominadas proteínas AgNORs, que podem ser observadas pela microscopia óptica como pontos pretos no interior do núcleo.^{50,51} Estas proteínas foram identificadas como nucleolinas, e possuem função regulatória sobre a síntese de RNAr.⁵³ Durante a interfase, as NORs e as proteínas argirófilas agrupam-se formando o nucléolo. O número das AgNORs, durante a interfase,

varia de acordo com a velocidade de duplicação celular. Quanto mais acelerado o ciclo celular, menores são as chances das NORs – individualizadas em cada cromossomo durante a mitose – agruparem-se durante a interfase. Ainda, as células com alta taxa de duplicação aumentam a demanda de biogêneses ribossomal, refletindo a alta atividade metabólica.⁵²⁻⁵⁴

As AgNORs podem ser quantificadas através da contagem do número de pontos,²⁷⁻³² da mensuração da área dos pontos,^{30,32,55} e do percentual do número de pontos por núcleo.²⁷⁻³² O parâmetro mais utilizado nos trabalhos relacionados com a avaliação da mucosa clinicamente normal exposta a carcinógenos é a média de número de pontos por núcleo – mAgNOR.²⁷⁻³² Há divergências que este seja o melhor parâmetro para avaliação das AgNORs, já que Ceccarelli et al. (2000) relata uma série de estudos com resultados contraditórios, cujo critério de avaliação utilizado foi mAgNOR, e justifica, argumentando que este é um parâmetro de quantificação impreciso e pouco reproduzível.⁵⁶ Entretanto, todos os estudos citados foram realizados utilizando cortes histológicos, e sabe-se que a impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares, quando associada à citopatologia, é mais precisa, já que se pode analisar todo o núcleo, e não apenas uma parte dele como nos cortes histológicos.⁵⁷

A avaliação do percentual de AgNORs por núcleo (pAgNOR) foi introduzida por Mourad et al. (1992), e modificada por Xie et al. em 1997, que realizaram um trabalho com espécimes histológicos bucais.^{41,58} Os autores avaliaram a taxa de proliferação celular utilizando dois parâmetros, mAgNOR e pAgNOR, de epitélios sem alterações celulares e arquiteturais, de epitélios displásicos, e de carcinomas espinocelulares. Os resultados permitiram o estabelecimento de duas conclusões: pAgNOR>1 é capaz de realizar a distinção entre os três grupos estudados, e mAgNOR tem forte valor prognóstico para os casos de carcinoma espinocelular. A partir deste ponto, grande parte dos estudos de citologia e AgNOR utilizam, também, pAgNOR como método de quantificação das AgNORs.²⁷⁻³²

Estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de identificar um método capaz de monitorar pacientes de risco para o desenvolvimento do câncer de boca. A metodologia mais indicada seria aquela que fosse não invasiva, uma vez que estes pacientes deverão ser submetidos a ela com determinada frequência. Idealmente, deverá ser de custo baixo e de fácil execução. Dessa forma, a citopatologia associada à técnica de AgNOR é uma promissora alternativa.

Em estudo realizado com 40 indivíduos, Sampaio et al. (1999) compararam a taxa de proliferação celular entre fumantes e não-fumantes. A partir de células coletadas da mucosa jugal, realizou-se a impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares e a quantificação das AgNORs, e os autores constataram que indivíduos fumantes apresentavam números mais elevados nos parâmetros mAgNOR e pAgNOR>5, sendo as diferenças estatisticamente significantes. Concluíram, assim, que o tabaco tem influência sobre a velocidade de proliferação da mucosa bucal.⁵⁶

Cançado et al. (2001), realizaram estudo utilizando metodologia semelhante ao descrito anteriormente, entretanto com uma amostra composta por 60 indivíduos fumantes e 60 não-fumantes. Os autores optaram por investigar o padrão de proliferação celular dos sítios borda de língua e assoalho bucal, utilizando três parâmetros para a quantificação das AgNORs, mAgNOR, pAgNOR>3 e, pAgNOR>5. Pode-se observar um aumento da atividade proliferativa das células esfoliadas dos indivíduos fumantes, de ambos os sítios estudados, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Ainda, notou-se no grupo fumante que o sítio assoalho de boca apresentava uma taxa de proliferação celular aumentada quando comparada com o sítio borda de língua. Esse achado sugere que a mucosa não-ceratinizada apresenta maior suscetibilidade à ação dos carcinógenos em comparação com a mucosa ceratinizada.²⁷

O padrão de maturação celular é distinto para cada sítio da cavidade bucal. Assim, cada um pode ter diferentes taxas de proliferação celular.²⁶ Além disso, os principais sítios de acometimento do câncer de boca, relacionados com o uso de tabaco e álcool, são a borda de língua e o assoalho de boca.³² Justifica-se desta forma a análise da proliferação celular destes dois locais.

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. A amostra avaliada era constituída por 13 indivíduos fumantes e 9 não-fumantes. Foi utilizada a mAgNOR para a avaliação da taxa de proliferação celular. Os autores observaram aumento estatisticamente significativo nos valores de mAgNOR apenas em assoalho bucal de fumantes, quando comparado ao grupo controle de não-fumantes.⁵⁵

Orellana-Bustos et al. (2004) avaliaram as taxas de proliferação celular da mucosa bucal exposta aos carcinógenos do tabaco. Através da quantificação das AgNORs das células esfoliadas da borda de língua, observaram que os indivíduos fumantes apresentavam maior atividade proliferativa da mucosa bucal quando comparados com as células da mucosa de indivíduos não fumantes, corroborando com os achados dos estudos acima citados. Os autores concluem que, por se tratar de um método não invasivo e de fácil aplicação, a análise das taxas de proliferação celular, através da citopatologia associada à técnica de AgNOR, pode ser um método auxiliar no monitoramento de indivíduos de risco para o desenvolvimento do câncer de boca.²⁹

Paiva et al. (2004) avaliaram, além dos pacientes fumantes, aqueles que utilizavam concomitantemente ao tabaco a bebida alcoólica. Os autores observaram os mesmos resultados que os estudos realizados previamente com relação à taxa de proliferação da mucosa de pacientes fumantes. Mas puderam constatar, no entanto, que os indivíduos que faziam uso das duas

substâncias, etanol e tabaco, apresentavam maior taxa de proliferação celular quando comparados com o grupo controle e com o grupo de fumantes.³⁰

Gedoz et al. (2005) foram os primeiros autores a avaliar longitudinalmente a taxa de proliferação celular da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos, através da citopatologia associada à técnica de AgNOR. Os sítios de eleição para o estudo foram lábio inferior, borda de língua e assoalho de boca. Realizaram-se esfregaços citopatológicos em um primeiro momento e após 24 meses. A partir das quantificações das AgNORs (mAgNOR, pAgNOR>3, pAgNOR>5), pode-se observar que indivíduos fumantes e indivíduos fumantes e etilistas apresentaram uma variação da taxa de proliferação celular ao longo dos 24 meses, sendo que as últimas análises apresentavam números maiores quando comparadas às primeiras. Durante o intervalo entre uma coleta e outra, um indivíduo fumante cessou o hábito tabágico, e apresentou as contagens de AgNOR diminuídas. Os fumantes-etilistas mais uma vez apresentavam maior atividade proliferativa da mucosa bucal quando comparados com fumantes e não-fumantes. Os indivíduos não-fumantes e não-etilistas não apresentaram variação da taxa de proliferação celular ao longo do tempo. Os autores ressaltam que devido a grande variabilidade individual frente a um mesmo estímulo, o tabaco e o fumo, esta metodologia deve ser empregada para monitorar indivíduos expostos a carcinógenos, de forma individualizada.³²

Fontes et al. (2008) investigaram a influência do número de cigarros fumados e do tempo de hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação das células esfoliadas da borda de língua de indivíduos com a mucosa bucal clinicamente normal, através da técnica de AgNOR. Os autores não observaram diferença entre as variáveis estudadas e a velocidade de proliferação celular. Os demais achados deste estudo estão de acordo com os já mencionados, ou seja, indivíduos fumantes apresentam maior taxa de proliferação celular da mucosa bucal quando comparados com indivíduos não expostos a carcinógenos, mesmo na ausência de lesões clínicas.³¹

Tabela 1. Principais estudos de citopatologia bucal e AgNOR realizados em indivíduos expostos e não expostos ao tabaco com a mucosa clinicamente normal.

Estudo	Tipo de Estudo	Grupos avaliados	n	Parâmetros avaliados	Sítios Avaliados	Principais achados
Sampaio et al. 1999 ²⁹	Transversal	Fumantes Não Fumantes	Fumantes=20 Não-fumantes=20	mAgNOR pAgNOR>5	Mucosa Jugal	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>5 em fumantes
Cançado et al. 2001 ²⁷	Transversal	Fumantes Não Fumantes	Fumantes=60 Não-fumantes=60	mAgNOR pAgNOR>3 pAgNOR>5	Borda de Língua Assoalho de boca	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes
Soares Pinto et al. 2003 ²⁵	Transversal	Fumantes Não Fumantes	Fumantes=13 Não-fumantes=9	mAgNOR	Lábio Inferior Borda de Língua Assoalho de boca	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR em assoalho bucal de fumantes
Orellana-Bustos et al. 2004 ²⁹	Transversal	Fumantes Não Fumantes	Fumantes=30 Não-fumantes=30	mAgNOR	Borda de Língua	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR em assoalho bucal de fumantes
Paiva et al. 2004 ³⁰	Transversal	Fumantes Fumantes/etilistas Não Fumantes	Fumantes=25 Fumantes/etilistas=18 Não Fumantes=17	mAgNOR pAgNOR>3 pAgNOR>5	Borda de Língua Assoalho de boca	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes e fumantes/etilistas
Gedoz et al. 2007 ³²	Longitudinal (24 meses)	Fumantes Fumantes/etilistas Não Fumantes	Fumantes=25 Fumantes/etilistas=18 Não Fumantes=17	mAgNOR pAgNOR>3 pAgNOR>5	Lábio Inferior Borda de Língua Assoalho de boca	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e em borda de língua e assoalho de boca de fumantes e fumantes/etilistas ao longo do tempo. pAgNOR>3 aumento significativo em borda de língua em fumantes.
Fontes et al. 2008 ³¹	Transversal	Fumantes Não-Fumantes	Fumantes=25 Não-fumantes=25	mAgNOR pAgNOR>3	Borda de Língua	Aumento estatisticamente significativo de mAgNOR e pAgNOR>3 em borda de língua e assoalho de boca de fumantes

Um marcador capaz de identificar a desregulação da proliferação celular antes do aparecimento de lesões seria um forte candidato para auxiliar o monitoramento de indivíduos de risco para o câncer de boca. A quantificação de AgNORs ao longo do tempo, realizada de forma individual e sistemática, pode ser uma maneira de realizar esta identificação. Estudos longitudinais em indivíduos expostos cronicamente aos carcinógenos bucais precisam ser realizados para estabelecer um protocolo de aplicação desta metodologia.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o padrão de proliferação celular da mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos não expostos ao tabaco e ao álcool através da citopatologia associada à técnica de AgNOR.
- Avaliar os efeitos da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal clinicamente normal através da citopatologia associada à técnica de AgNOR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar durante 1 ano de acompanhamento a taxa de proliferação celular (mAgNOR e pAgNOR>3) da mucosa da borda de língua e assoalho de boca de indivíduos expostos e não expostos ao tabaco e ao álcool.
- Avaliar durante 1 ano de acompanhamento a taxa de proliferação celular (mAgNOR e pAgNOR>3) da mucosa da borda de língua e assoalho de boca de indivíduos que cessaram o hábito tabágico durante o estudo.

REFERÊNCIAS

1. Öberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet*. 2011; 77: 139-146.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *Plos Medicine*. 2006; 3: 2011-2030.
3. Warnakulasuriya S. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: prevention. *Periodontology* 2000. 2011; 57: 38–50.
4. Brasil. Ministério da saúde. Secretária de assistência a, s.; instituto nacional do câncer. Estimativas da incidência de mortalidade por cancer no Brasil. INCA, 2012. 118 ISBN 9788573180756.
5. Dietrich T, Reichart P, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol*. 2004; 40: 158–163.
6. Neville BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *Cancer J Clin*. 2002; 52: 195-215.
7. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews*. 2003; 3: 733-744.
8. Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer – a brief overview. *Oral Oncol*. 2001; 37: 205-210
9. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011; 57: 19-37.
10. Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, FengZhang Z. Alcohol Consumption and Cancer of the Oral Cavity and Pharynx from 1988 to 2009: An Update. *Eur J Cancer Prev*. 2010; 19: 431–465.
11. Simanowski UA, Stickel F, Maier H, Gartner U, Seitz HK. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol*. 1995, 12:111-115.
12. Ogden GR, Wight AJ, Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28: 216-220.
13. Carrard VC, Sant'Ana Filho M, 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*. 2004; 34:233-338.
14. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45: 309-316.
15. Marron M et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol*. 2010;39:182–196
16. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B, Rajan B. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 365: 1927–1933.
17. Scully C. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J*. 1992; 173:53-59.

18. Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic AIDS for the detection of oral cancer. *Oral Oncol.* 2008; 44: 10–22.
19. Kujan O, Glenny AM, Duxbury J, Thakker N, Sloan P. Evaluation of Screening Strategies for Improving Oral Cancer Mortality: A Cochrane Systematic Review. *J Dent Educ.* 2005; 69: 255-265
20. Cohen L. Some observations on the use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21:458-464.
21. Nieminen P, Kallio M, Anttila A, Hakama M. Organised vs. spontaneous pap-smear screening for cervical cancer: a case-control study. *Int. J. Cancer.* 1999; 83: 55–58
22. International Agency on Research for Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention Cervix Cancer Screening. *IARC Press.* 2005; 10: 1-313.
23. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26:201-215.
24. Zimmermann ER, Zimmermann AL. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res.* 1965; 44: 627-631.
25. Silva MCA, Rados PV. Citopatologia: um Recurso Auxiliar na Prevenção do Câncer Bucal em Pacientes do Sexo Masculino. *Rev. Fac. Odontol.* 1997; 38: 3-10.
26. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology.* 2007; 18: 367-375
27. Cançado RP, Yurgel LS, Sant’Ana Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol.* 2001; 37: 446-454.
28. Cançado RP, Yurgel LS, Sant’Ana Filho M. Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers’ normal buccal mucosa. *Tob Induc Dis.* 2004; 2: 43-49
29. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, 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: 197-203.
30. Paiva RL, Sant’Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26: 175- 180.
31. Fontes PC, Correa GHM, Issa JS, Brandão AAH, Almeida JD. Comparison of Exfoliative Pap Stain and AgNOR Counts of the Tongue in Smokers and Nonsmokers. *Head and Neck Pathol.* 2008; 2: 157-162.
32. Gedoz L, Lauxen I, Sant’Ana Filho M, Rados PV. 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; 29: 231-238.
33. 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: 265-72.

34. Suhas S, Ganapathyb KS, Gayatridevic, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res.* 2004; 561: 15- 21.
35. Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Santo ARE, Bôas DSV. Genotoxic Effect of Ethanol on Oral Mucosa Cells. *Pesq. Odontol. Bras.* 2002; 16: 221-225.
36. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992; 271: 69-77.
37. Stich HF, Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett.* 1984; 241-253.
38. Bansal H, Sandhu VS, Bhandari R, Sharma D. Evaluation of micronuclei in tobacco users: a study in Punjabi population. *Contemp Clin Dent.* 2012; 3: 184-187
39. van Oijen MGCT, Gilsinga MMA, Rijkse G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium form smokers and ex-smokers. *Oral Oncol.* 1998; 34: 297-303.
40. Piche A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNOR in tumor pathology. *Micron.* 2000; 31: 131-141.
41. Xie X, Clausen OPF, Sudbo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 1997; 79: 2200-2208.
42. Chattopadhyay A, Ray JG, Caplan DJ. AgNOR count as objective marker for dysplastic features in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31: 512-517.
43. Chattopadhyay A, Ray JG. AgNOR cut-point to distinguish mild and moderate epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 78–82.
44. Elangovan T, Mani, NJ, Malathi, N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: A quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res.* 2008; 19: 141-146.
45. Hildebrand L, Carrard V, Lauxen I, Quadros O, Chaves A, Sant'Ana Filho M. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15: 328-334.
46. Caldeira PC, Aguiar MCF, Mesquita RA, Carmo MAV. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40: 305-311.
47. Remmerbach TW, Weidendach H, Müller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol.* 2003; 25: 139-146.
48. Sharma A, Saxena S. Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion. *Indian J Dent Res.* 2012; 23: 251-256.
49. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization os Nucleolar Oraganizer Regions in Mammalian Cromosomes Using Silver Staining. *Chromosoma.* 1975; 53: 37-50.
50. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol.* 1991; 32: 142-192.

51. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000; 31: 127-131.
52. Derenzini M. The AgNORs. *Micron*. 2000; 31: 117-120.
53. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochst RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J of Patho*. 1998; 152: 1291-1297.
54. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol*. 2000; 191: 181-186.
55. Soares Pinto TA, Rados PV, Sant'Ana Filho M, Barbachan JJD. Avaliação quantitativa de núcleo/citoplasma e AgNORs em células da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*. 2003; 44: 12-16.
56. Ceccarelli D, Trerè D, Santini M, Taffurelli P, Chieco M, Derenzini M. AgNORs in breast tumours. *Micron*. 2000; 31: 143-149
57. Sujathan K, Kanan S, Pillai KR, Chandralekha B, Amma NS, Nair MK. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol*. 1996; 40: 724-728.
58. Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, Shoukri MS, Cox CE, Nicosia V, Rowlands DT. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma Correlation with DNA flow cytometry histopathology and lymph node status. *Cancer*. 1992; 69: 1739-1744
59. Sampaio HC, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Acta Cytol*. 1999; 43: 117-120.

3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

AGNOR QUANTIFICATION IS USEFUL TO MONITOR PROLIFERATIVE ACTIVITY IN CLINICALLY NORMAL ORAL MUCOSA

Bruna Jalfim Maraschin ^a, Júlia Morais Martins ^a, Raíssa Ananda Strapasson ^a, Manoel Sant'Ana Filho ^a, Vinicius Coelho Carrard ^a, Fernanda Visioli ^a, Marli Maria Knorst ^b, Pantelis Varvaki Rados, ^{a,*}

^aDepartment of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bDepartament of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author at: Street Ramiro Barcelos 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55-51-3308.5011, Fax: +55-51-3308.5023
E-mail address: pantelis@ufrgs.br

Key-words: Cytology; Cell proliferation, AgNORs, Longitudinal Study, Oral mucosa

Source of funding: Coordination for the Improvement of the Higher Level Personnel (CAPES) of the Ministry of Education of Brazil.

Objectives: The aim of the present study was evaluated proliferation rates of cells exfoliated from oral mucosa in subjects not exposed to tobacco or alcohol. *Design:* The initial sample comprised 44 volunteer no-smokers and no-drinkers, which smears were collected from the border of the tongue and floor of the mouth. The two oral sites selected were sampled at three moments (baseline, and after 3 and 6 months). Samples were subjected to the AgNOR technique, and were quantified by three previously calibrated examiners. Mean AgNORs per nucleus (mAgNOR) and the percentage of cells with more than three AgNORs per nucleus (pAgNOR>3) were calculated from the first 50 well-arranged, non-overlapping nucleated cells. Generalized linear model followed by Bonferroni correction was used to analyze the effects of gender, age, and oral health status on cell proliferation rates. Analysis of variance for repeated measures was used to compare groups over time. *Results:* Females and males maintain a relatively steady cell proliferation rate in the oral mucosa, with up to 19% of variation in the border of the tongue and 14% in the floor of the mouth. No relationship was identified between cell proliferation rates age, and gender. It was observed that individuals with more than three missing teeth presented significantly higher mAgNOR in the border of the tongue (p<0.01). *Conclusions:* Oral cytopathology can be used in the clinical monitoring of cell proliferation, serving as strategy to detect early cellular changes and prevent the development of oral cancer.

1. INTRODUCTION

Oral cytopathology has been used to assess early changes caused by smoking, drinking or occupational exposure to different carcinogenic substances, particularly when lesions cannot be detected clinically.¹⁻⁹ Previous studies have successfully employed quantitative methods to evaluate

the epithelial maturation process,^{9,10} cell proliferation,^{5,6,8,11-13} and cytogenetic damage^{7,14,15} in the oral mucosa.

Increased cell proliferation is one of the most important events in tumor progression,^{16,17} and it can be measured using the AgNOR staining technique. AgNORs (silver-stained nucleolar organizer regions) are acid non-histone proteins that regulate ribosomal DNA transcription.¹⁸ These proteins can be silver-stained using a histochemical technique, and are then visualized as black dots inside the nucleus. Because AgNORs are directly and strongly related to cell proliferation,^{19,20} some studies have used AgNOR quantification to assess groups of patients at high risk for oral cancer, especially heavy smokers and/or drinkers, aiming to identify early changes and monitor cell proliferation rates in the oral mucosa of these individuals.^{4,5,8,11-13}

Oral cytopathology studies often include non-smokers, non-drinkers as a control group, a strategy supported by the fact that smoking tobacco and drinking alcohol are among the main risk factors for oral cancer. The use of these substances also causes changes in cell maturation and proliferation, and induce cytogenetic damage in normal appearing oral mucosa.^{5,8,9,13}

Notwithstanding, to the best of the authors' knowledge, so far no study has evaluated over time the variation of cell proliferation in clinically normal oral mucosa in individuals who do not smoke or regularly drink alcohol. In general, it is assumed that this group of individuals is at low risk for oral cancer and therefore does not present significant fluctuations in the turnover of oral mucosa over time. In contrast, smokers, drinkers have shown variations in cell proliferation rates in longitudinal evaluations.⁸ It remains unclear whether these differences are related to exposure patterns, to the normal range of cellular proliferation rates, or even individual characteristics.

The primary aim of this study was to evaluate, using oral cytopathology, cell proliferation patterns, over time, in subjects not exposed to tobacco or alcohol. A secondary aim was to

investigate the influence of demographic characteristics (age, gender) and oral health status (missing teeth, gingival bleeding and probing depth,) on cell proliferation rates in the oral mucosa of these individuals, as well as the occurrence of turnover variations over time.

2. MATERIAL and METHODS

The present study was conducted in accordance with the ethical guidelines set forth in the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the local Ethics Committee, and all patients signed an informed consent form prior to their inclusion in the study.

2.1 Study design and participants

This was a clinical and longitudinal study. The initial sample comprised 44 volunteer patients who presented at the clinic of the School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, seeking dental treatment for diverse reasons. The sample included 27 women and 17 men, aged 26 to 65 years (41.84 ± 11). Exclusion criteria were being aged under 18 years old, clinically detectable oral lesions (except periodontal disease), history of malignant oral lesions, use of tobacco, and alcohol intake greater than 2 doses per week (28 g).

Prior to cytopathological sampling, all patients underwent a thorough clinical examination of the oral cavity, and those with detectable oral lesions were referred to the Oral Pathology Clinic of the University and excluded from the present analysis. Oral health data (missing teeth – data obtained from DMFT index, gingival bleeding and probing depth) were collected from each patient's record.

2.2 Sample collection, slide preparation and evaluation

Selected subjects rinsed their mouths with filtered water for 1 minute;⁷ users of removable dentures were first asked to remove the appliances. Subsequently, samples were collected from the border of the tongue and floor of the mouth with the aid of a previously sterilized cytology brush. Smears were applied to a glass slide previously washed with detergent and clean water. Slides were then fixed in 99.3% alcohol.⁸

The two oral sites selected for investigation border of tongue and floor of mouth were sampled at three moments, namely, at baseline and after 3 and 6 months. At each collection, patients were asked to answer a questionnaire containing questions about smoking and drinking habits, as well as about their general health status.

Samples were subjected to the AgNOR technique following the protocol described by Ploton et al. (1986).²¹ AgNORs were quantified according to the criteria established by Crocker et al. (1989).²²

Images were captured by blinded examiners using the Qcapture® software version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., 2005), with the aid of an Olympus® video camera (QColor 5, Coolet, RTV) coupled to an Olympus binocular microscope (CX41RF, Olympus Optical Co.) and a Dell computer (Dimension 5150). The first 50 well-arranged, non-overlapping nucleated cells were captured at 1000x magnification using immersion oil.⁸

AgNOR dots per nucleus were quantified on the images captured. Mean AgNORs per nucleus (mAgNOR) in each sample,^{5,12} and the percentage of cells with more than three AgNORs per nucleus (pAgNOR>3) were calculated according to the methodology proposed by Cançado et al. (2001) and Fontes et al. (2008).^{5,13} AgNOR quantification was performed by three previously calibrated examiners (ICC \geq 0,95). Fluctuation in proliferative activity over time was assessed by comparing the number of AgNORs at the different collection time points. For this analysis, the 26 individuals who attended all three collections were divided into two groups according to gender. mAgNOR and pAgNOR>3 were determined for each oral site evaluated in both groups

2.3 Non-response analysis

The sample of subjects who were lost of follow-up was assessed. Information collected from those included the subject's sex, age, missing teeth, gingival bleeding, probing depth, mAgNOR and pAgNOR>3 from border of tongue and floor of mouth.

2.4 Data analysis

For oral health data the cut-off to levels establishment for gingival bleeding and missing teeth was based on the 50th percentile and was defined as 34% and 3 respectively. For probing depth individuals were classified into two groups: ≤ 3 and > 3 mm.

2.5 Statistical analysis

Based on data distribution, a generalized linear model followed by Bonferroni correction was used to analyze the effects of gender, age, and oral health status on cell proliferation rates. Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures were used to compare groups over time. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Significance was set at 5%.

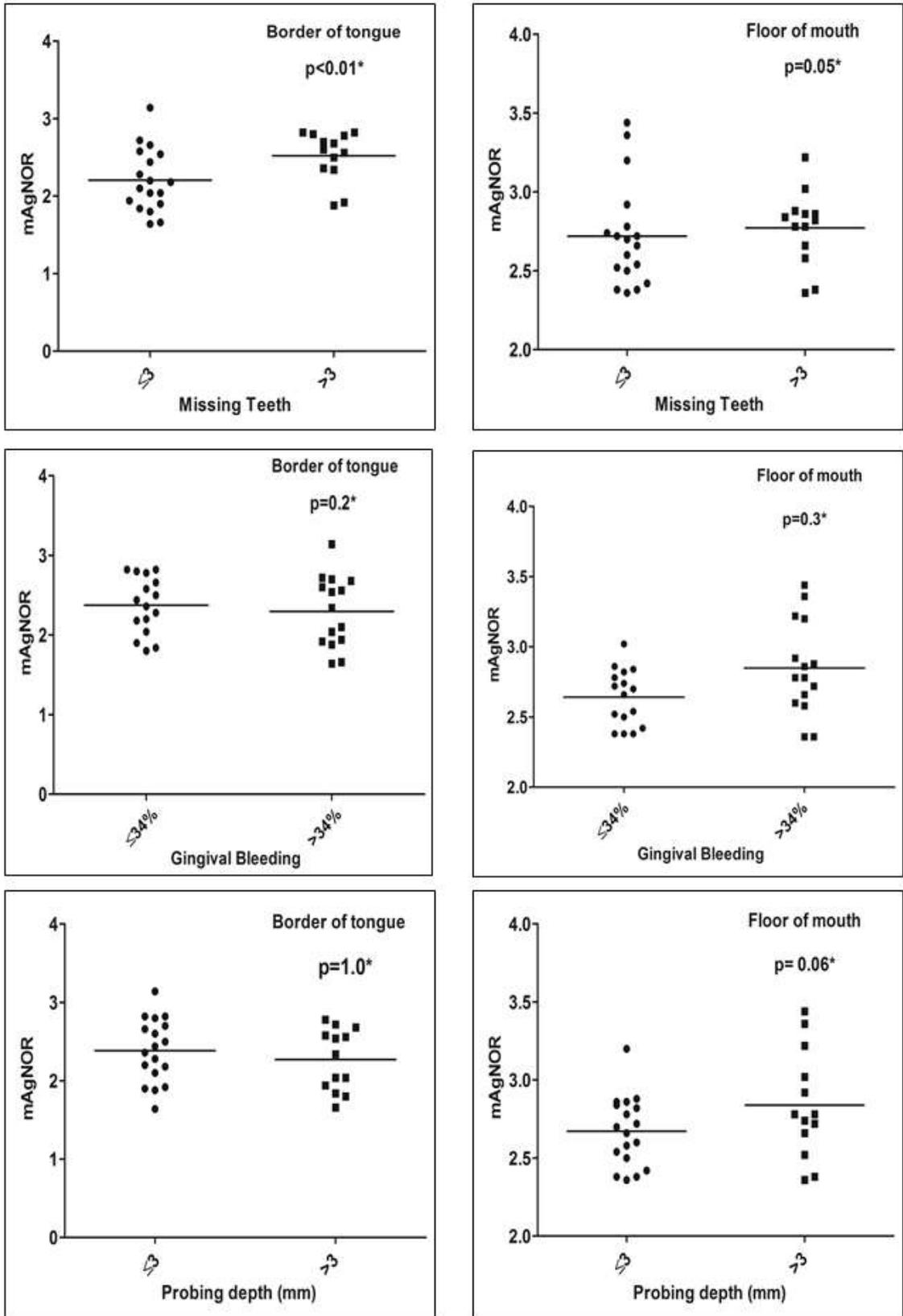
3. RESULTS

Of the 44 patients initially enrolled, 27 were reevaluated at 3 months and 26 at 6 months. There was a higher frequency of females at all three collections (61.36% at baseline, 62.96% at 30 days, and 61.53% at 60 days). The investigators tried to contact the 18 subjects lost to follow-up via both telephone and regular mail, with no success. The analysis of the non-response subjects indicated that the no-respondents were similar to the study group in all variables assessment (data not shown).

Overall mAgNOR (for the whole sample) was 2.32 ± 0.39 in the border of the tongue and 2.75 ± 0.29 in the floor of the mouth at the baseline collection.

For analysis of the impact of age, gender and oral health status on cell proliferation, 24 subjects who presented complete information recorded were included. Age and gender, did not have significant effects on the rates of cell proliferation in either of the sites evaluated (data not shown). Regarding oral health status, after adjustment for age and gender, it was possible to observe that individuals with more than three missing teeth presented significantly higher mAgNOR values in the border of the tongue ($p < 0.01$) (Figure 1).

Figure 1. mAgNOR in cells exfoliated from tongue border and floor of the mouth according to health status conditions, after adjustment for gender and age.



*GENERALIZED LINEAR MODEL. mAgNOR: mean AgNOR per nucleus

Fluctuation in proliferative activity over time did not show statistically significant differences in the 26 individuals who attended all collection sessions, regardless of gender (Tables 1 and 2). Mean individual fluctuation in mAgNOR values over 6 months was in border of tongue 16.2%, with a maximum of 29% and a minimum of 2% (95% confidence interval: 13.3 to 19%). In the floor of the mouth, mean individual fluctuation over 6 months was 12.4% (maximum 23%, minimum 1%; 95% confidence interval: 10 to 14%) (data not shown).

Table 1. AgNOR values (mean and standard deviation) in cells exfoliated from tongue border and floor of the mouth of females subjects in different period of evaluation.

Variable	TONGUE BORDER				FLORR OF MOUTH			
	BASELINE (n=16)	3 months (n=16)	6 months (n=16)	p	BASELINE (n=16)	3 months (n=16)	6 months (n=16)	p
mAgNOR								
Mean (SD)	2,39 (0,37)	2,21(0,38)	2,28 (0,31)	0,05*	2,76 (0,28)	2,82 (0,43)	2,85 (0,33)	0,53*
pAgNOR>3								
Mean (SD)	12,56 (8,81)	10,25 (6,92)	10,25 (6,89)	0,37*	19,25 (9,63)	21,38 (13,89)	23,06 (13,01)	0,22*

*ANOVA. mAgNOR: mean AgNORs per nucleus; pAgNOR>3: percentage of cells with more than three AgNORs per nucleus

Table 2. AgNOR values (mean and standard deviation) in cells exfoliated from tongue border and floor of the mouth of males subjects in different period of evaluation

Variable	TONGUE BORDER				FLORR OF MOUTH			
	BASELINE (n=16)	3 months (n=16)	6 months (n=16)	p	BASELINE (n=16)	3 months (n=16)	6 months (n=16)	p
mAgNOR								
Mean (SD)	2,28 (0,45)	2,16 (0,31)	2,15 (0,35)	0,47*	2,64 (0,13)	2,50 (0,22)	2,51 (0,23)	0,25*
pAgNOR>3								
Mean (SD)	11,00 (10,17)	7,20 (5,35)	9,20 (4,91)	0,30*	14,40 (6,98)	11,20 (6,48)	13,60 (9,32)	0,60*

*ANOVA mAgNOR: mean AgNORs per nucleus; pAgNOR>3: percentage of cells with more than three AgNORs per nucleus

4. DISCUSSION

Oral cytopathology studies have long used AgNOR staining methods to investigate cell proliferation patterns in smokers and alcohol drinkers.^{5,8,9,13} Notwithstanding, proliferative activity in clinically normal oral mucosa and its variation over time have never been evaluated. The present study was designed to assess the normal fluctuation in cell proliferation, based on AgNOR counts, in oral mucosa not exposed to tobacco or alcohol. This aspect is important so that we can safely determine when an increased number of AgNORs poses risks to a patient's health.

According to Gedoz et al. (2007), the rate of cell proliferation in smokers and drinkers increases over time, even though it is not clear whether such oscillation is physiological or a result of cumulative damage induced by carcinogens.⁸ The present findings show that individuals not exposed to carcinogens maintain a relatively steady cell proliferation rate in the oral mucosa, with up to 19% of variation in the border of the tongue and 14% in the floor of the mouth. Also, both females and males failed to present significant changes in AgNOR parameters in the sites assessed. These findings may suggest that variations over 19% and 14% in mAgNOR values in the border of the tongue and floor of the mouth, respectively, are not physiologically determined, but rather may be indicating early carcinogenic alterations.

The absence of differences in cell proliferation rates between females and males is an important contribution of the present findings to the existing literature, as most studies designed to assess the effect of carcinogenic substances on the oral mucosa limit their sample to male subjects, based on the assumption that female hormones may influence the oral mucosa and thus produce biased results.^{8,12,13} Indeed, this assumption is supported by some studies that have demonstrated increased cell proliferation rates in periodontal keratinocytes in the presence of sex hormones.²³⁻²⁵ However, the mechanisms through which oral mucosal tissue responds to sex hormones remains

unclear.²⁷ The present findings seem to suggest that it is possible to assess cell proliferation in mixed groups.

Similarly to gender, age also had no effect on AgNOR quantification results. Our findings are in accordance with those reported by Çelenligil-Nazliel et al. (2000), and Carrard et al. (2004), who assessed the oral mucosa of mice using AgNOR quantification on histological slides and showed that the proliferative activity of epithelium does not change with aging.^{27,28} Moreover, Cançado et al. (2001) conducted a cytopathological study associated with AgNOR quantification and concluded that age cannot be related to changes in cell proliferation rates in the oral mucosa of humans.⁵ Conversely, Orellana-Bustos suggested that older individuals present epithelial atrophy and smaller proliferation activity due to a decrease in metabolic activity, based on the findings of Hill and Squier (1994).^{11,29} The discordant findings available in the literature about cell proliferation and aging may reflect differences in techniques, anatomic sites, age groups, and experimental models.

Finally, our findings are in agreement with previous studies that have demonstrated an association between poor oral hygiene and a higher risk of cancer development in different oral sites.³⁰ Zheng et al. (1990) and Hiraki et al. (2008) found significant relationships between the incidence of oral cancer on the one hand and tooth loss and poor oral hygiene on the other, regardless of age and consumption of tobacco or alcohol.^{31,32} One possible explanation for this relationship could be the fact that individuals with poor oral hygiene have higher levels of nitrate-reducing oral bacteria, greater endogenous nitrosamine formation, and, consequently an increased risk of developing cancer.³³

Many studies have investigated the association between oral hygiene and head and neck cancer (HNC).³⁰⁻⁴² Although these studies suggested that poor oral hygiene may contribute to an increased risk of HNC, their results are not entirely congruent. Additional factors, as the use of

alcohol and tobacco, may modify the relationship between oral hygiene and HNC. However when the correlation between poor oral hygiene and the cell proliferation of oral mucosa in individuals not exposed to risk factors was evaluated, was found that those with the worst oral conditions showed higher rates of cell proliferation when compared with individuals with better oral health status. One possible explanation for this association could be the fact that poor oral hygiene may lead to the development of chronic inflammation. Chronic inflammation may contribute to carcinogenesis⁴³ and may be a mediator through which poor oral hygiene promotes the oncogenesis of HNC.

In summary, this study showed that non-drinkers and non-smokers maintain a relatively constant rate of cell proliferation over time, with a maximum variation of 19% in border of tongue, and 14% in floor of the mouth, in the number of AgNORs over 6 months, suggesting that patients with greater variations should be more closely monitored. Our results reaffirm the clinical relevance of oral cytopathology in the clinical monitoring of cell proliferation over time, once individuals not exposed maintain the count of AgNOR similar through time, with a variation scarcely representative.

REFERENCES

1. Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, et al. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research* 1996; **371**(3-4): 237-248.
2. Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. The Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Cells: Application to Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Mutation Research* 1999; **1**(442): 29-35.
3. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe, JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Analytical and quantitative cytology and histology* 1999; **21**(2): 26-30.
4. Sampaio HC, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytologica* 1999; **43**(2): 117-120.
5. Cançado RP, Yurgel LS, Sant'Ana Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncology* 2001; **37**(5): 446-454.
6. Cançado RP, Yurgel LS, Sant'Ana Filho M. Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers' normal buccal mucosa. *Tobacco Induced Disease*. 2004; **2**(1): 43-49.
7. Bohrer PL, Sant'Ana Filho M, Paiva RL, Lauxen I, Rados PV. Assessment of Micronucleus Frequency in Normal Oral Mucosa of Patients Exposed to Carcinogens. *Acta Cytologica* 2005; **49**(3): 265-272.
8. Gedoz L, Lauxen I, Sant'Ana Filho M, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. *Analytical and quantitative cytology and histology* 2007; **29**(4): 231-238.
9. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007; **18**(6): 367-375.
10. Zimmermann ER, Zimmermann AL. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *Journal of Dental Research* 1965; **44**(4): 627-631.
11. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Medicina Oral* 2004; **9**(3): 197-203.
12. Paiva RL, Sant'ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados P.V. AgNOR quantification in cells of normal mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Analytical and quantitative cytology and histology* 2004; **26**(3): 175-180.

13. Fontes PC, Correa GHM, Issa JS, Brandão AAH, Almeida JD. Comparison of exfoliative pap stain and agnor counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head and Neck Pathology* 2008; **2**(3): 157-162.
14. Suhas S, Ganapathyb KS, Gayatridevic, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Researchs*. 2004; **561**(1-2): 15- 21.
15. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. *Mutation Research* 1992; **271**(1): 69-77.
16. Tomatis L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. *Environmental Health Perspectives* 1993; **101**(5): 149-152.
17. Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, et al. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *The Journal of Pathology*. 2000; **191**(4): 368-375.
18. Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M.; Trère D. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. *Journal of Clinical Pathology* 2004; **57**(7): 755-761.
19. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *International Review of Experimental Pathology* 1991; **32**: 142-192.
20. Trère D. AgNOR Staining and quantification. *Micron* 2000; **31**(2): 127-131.
21. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *The Histochemical Journal* 1986; **18**(1): 5-14.
22. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*. 198; **158**:185–188.
23. Ziskin DE, Blackberg SN, Slanetz CA. Effects of subcutaneous injections of estrogenic and gonadotropic hormones on gums and oral mucous membranes of normal and castrated rhesus monkeys. *Journal of Dental Research* 1936; **15**(6): 407-428.
24. Richman MJ, Abarbanel AR. Effect of estradiol and diethylstilbestrol upon the atrophic human buccal mucosa with a preliminary report on the use of estrogens in the management of senile gingivitis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1943; **3**(4):224-226.
25. Litwack D, Kennedy JE, Zander HA. Response of Oral Epithelia to Ovariectomy and Estrogen Replacement. *Journal Periodontal Research* 1970; **5**(4): 263-268.

26. Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1994; **5**(1): 27–53.
27. Çelenligil-Nazliel H, Ayhan A, Uzun H, Ruacan S. The effect of age on proliferating cell nuclear antigen expression in oral gingival epithelium of healthy and inflamed human gingiva. *Journal of Periodontology* 2000; **71**(10):1567-174.
28. Carrard VC, Sant’Ana Filho M, Rados PV, Chaves ACM, Lauxen IS. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol*. 2004; **34**(2-3): 233–238.
29. Hill MW, Squier CA. Epithelial proliferation and turnover in oral epithelia and epidermis. In: Squier CA, Hill MW editors. *The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin*. Boca Raton: CRC Press. 1994; 75-83.
30. Vellya AM, Franco EL, Schlecht N, et al. Relationship between dental factors and tract cancer risk of upper aerodigestive. *Oral Oncology* 1998; **34**(4):284-291.
31. Zheng T, Boyle P, Hu H, Duan J, Jiang P, Ma D, et al. Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes and Control* 1990; **1**(3):235-241.
32. Hiraki A, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Tajima K. Teeth Loss and Risk of Cancer at 14 Common Sites in Japanese. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2008; **17**(5):1222-1227.
33. Nair J, Ohshima H, Nair UJ, Bartsch H. Endogenous formation of nitrosamines and oxidative DNA-damaging agents in tobacco users. *Critical Review in Toxicology* 1996; **26**(2):149-161.
34. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O’Shea R, Brasure J, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *European Journal of Cancer Oral Oncology* 1992; **28B**(1):9-15.
35. Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncology* 2000; **36**(2):170-174.
36. Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *British Journal of Cancer* 2001; **85**(1):46–54.
37. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A, et al. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *International Journal of Cancer* 2002; **98**(3): 440–445.

38. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus:
39. Sato F, Oze I, Kawakita D, Yamamoto N, Ito H, Hosono S, et al. Inverse association between toothbrushing and upper aerodigestive tract cancer risk in a Japanese population. *Head & Neck* 2011; **33**(11):1628-1637.
40. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *American Journal of Epidemiology* 2007; **166**(10):1159-1173.
41. Subapriya R, Thangavelu A, Mathavan B, Ramachandran CR, Nagini S. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case-control study. *European Journal Cancer Prevention* 2007; **16**(3):251-256.
42. Divaris K, Olshan AF, Smith J, Bell ME, Weissler MC, Funkhouser WK, et al. Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer Causes Control* 2010; **21**(4): 567–575.
43. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**(6917):860-867.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

A CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO NORMALIZA A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO CELLULAR DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL – 12 MESES DE ACOMPANHAMENTO.

Bruna Jalfim Maraschin, M.Sc.^a; Júlia Morais Martins,^a Raíssa Ananda Strapasson,^a; Manoel Sant'Ana Filho, M.Sc, Ph.d^a; Vinicius Coelho Carrard, M.Sc, Ph.d^a; Fernanda Visioli, M.Sc Ph.d^a; Marli Maria Knorst, M.Sc, Ph.d^b; Pantelis Varvaki Rados, M.Sc, Ph.d^{a*}

^aDepartamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

^bDepartamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2400, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Autor de correspondência: Rua Ramiro Barcelos 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.
Tel.:51-3308.5011, Fax: 51-3308.5023
Endereço eletrônico: pantelis@ufrgs.br

Palavras-Chaves: Citologia, Proliferação Celular, AgNORs, Estudo Longitudinal, Mucosa Bucal; Cessão do fumo

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação do Brasil.

OBJETIVO: O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da citopatologia e da técnica de AgNOR, as taxas de proliferação celular da borda de língua e assoalho de boca de indivíduos que abandonaram o hábito tabágico, ao longo de um ano. **MÉTODOS:** Foram incluídos na amostra inicial 99 indivíduos. As coletas foram realizadas em um momento inicial (baseline), após em média 6 meses (6 meses) e após 12 meses (12 meses). Os participantes foram divididos em três grupos de acordo com os seguintes critérios: Grupo Controle (n=44): indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, que nunca fumaram, e que ingeriam até 2 doses (28g) de álcool por semana. Grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo (n=22): indivíduos em acompanhamento no Grupo de apoio ao fumante do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GAF-HCPA), que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico, alcoolistas ou não. Grupo de Tabagistas (n=33): indivíduos em acompanhamento no GAF-HCPA, que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo da pesquisa, alcoolistas ou não. As amostras foram sujeitadas à técnica de AgNOR e quantificadas por três examinadores previamente calibrados (ICC \geq 0,95). A média de AgNOR por núcleo (mAgNOR) e a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs (pAgNOR $>$ 3) foram calculados nas 50 primeiras células, nucleadas, não sobrepostas, e bem distendidas. **RESULTADOS** Na coleta baseline, os grupos expostos ao fumo (GAT e GT) apresentaram os valores da velocidade de proliferação celular maiores quando comparados aos indivíduos do GC. Ao longo do tempo, os indivíduos do GAT apresentaram uma redução da taxa de proliferação celular em ambos os sítios analisados, até atingir valores semelhantes aos do GC. **CONCLUSÕES:** Indivíduos não expostos ao tabaco e ao álcool apresentam a contagem de AgNOR similar ao longo de 12 meses de acompanhamento, com variações pouco significativas. A partir dos

resultados deste estudo pode-se concluir que a cessação do hábito tabágico reduz a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal.

INTRODUÇÃO

O tabaco causa diretamente a morte de 5 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, e o câncer causado pelo seu uso é responsável por um terço desses óbitos.¹ O Carcinoma Espinocelular bucal, que representa 94% de todas as neoplasias malignas de boca, tem como principais fatores de risco o tabaco e o álcool.² A mucosa bucal sofre com a ação do fumo através da queima do tabaco, que é um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular, o que poderia desencadear o início da doença.³

Considerando a influência do tabaco na ocorrência do câncer de boca, e a facilidade de acesso à mucosa bucal, a citopatologia tem sido empregada no monitoramento de alterações precoces causadas pelo fumo e pelo álcool, especialmente, quando a mucosa bucal parece estar clinicamente saudável.⁴⁻¹⁰

Elevadas 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.¹¹ Segundo Piche et al. (2000), o aumento da proliferação celular é determinante para a progressão tumoral,¹² e esta pode ser mensurada através da técnica de AgNOR (regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata). As NORs são um grupo de proteínas argirófilas, que possuem função regulatória sobre a síntese de RNAr (Ácido Ribonucleico Ribossômico), e estão diretamente envolvidas com as regiões organizadoras nucleolares (NORs). Ao serem impregnadas pela prata tornam-se facilmente visualizadas por microscopia óptica como pontos pretos no interior do núcleo, e passam a ser denominadas AgNORs.^{13,14} O número de AgNORs é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular,^{13,14} assim, alguns estudos utilizaram a citopatologia associada à técnica de AgNOR para avaliar a mucosa bucal de indivíduos de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, e verificaram que fumantes apresentam taxas de proliferação celular maiores que os não fumantes.^{5, 6, 9, 15, 16, 17}

Entretanto, não há relatos na literatura que avaliem o efeito da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação da mucosa bucal. Ainda permanece incerto se após a cessação da agressão a mucosa bucal voltará a apresentar taxas de proliferação celular semelhantes à de indivíduos que nunca fumaram.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da citopatologia e da técnica de AgNOR, as taxas de proliferação celular da borda de língua e assoalho de boca de indivíduos que abandonaram o hábito tabágico, ao longo de um ano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes éticas estabelecidas na Declaração de Helsinki. A metodologia aplicada foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Amostra

Este foi um estudo clínico, longitudinal, controlado. A amostra inicial foi constituída por 99 voluntários, que participavam do Programa de Apoio ao Fumante do HCPA (PAF-HCPA), coordenado pelo Serviço de Pneumologia do HCPA, ou que recebiam atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS).

O protocolo clínico e terapêutico estabelecido no PAF-HCPA consistia em uma abordagem cognitivo-comportamental com sessões estruturadas (4 sessões semanais e duas sessões quinzenais). O uso de medicação – bupropiona e/ou adesivos de nicotina – era indicado quando o indivíduo apresentasse dependência moderada ou alta à nicotina ou sintomas de abstinência em tentativas prévias de abandono do hábito tabágico.

Os critérios de inclusão foram ter 18 anos ou mais, ausência de lesões bucais detectáveis (com exceção de doença periodontal), não apresentar histórico prévio de lesões malignas bucais, ser fumante ou não, ser alcoolista ou não ingerir mais do que 28g de álcool por semana (2 doses). Os participantes foram distribuídos em três grupos de acordo com os seguintes critérios (Figura 1):

Grupo Controle (GC): indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, que nunca fumaram, e que ingeriam até 2 doses (28g) de álcool por semana.

Grupo de indivíduos que Abandonaram o Tabagismo (GAT): indivíduos em acompanhamento no GAT-HCPA, que fumavam no momento do início do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico, alcoolistas ou não.

Grupo de Tabagistas (GT): indivíduos em acompanhamento no GAT-HCPA, que fumavam no momento do início do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo do acompanhamento, alcoolistas ou não.

Coleta das Amostras, Técnica de AgNOR e Análises

Antes das coletas citopatológicas, todos os participantes foram submetidos a exame clínico da cavidade bucal, e aqueles com lesões bucais detectáveis foram encaminhados à Clínica de Patologia Bucal da UFRGS.

Os participantes eram instruídos a bochechar água filtrada durante 1 minuto,⁸ e usuários de próteses removíveis deveriam removê-las previamente. Após, as amostras eram coletadas da borda de língua e assoalho bucal com o auxílio de uma escova citológica estéril. Os esfregaços eram distendidos em lâminas histológicas de vidro, previamente limpas com detergente e água corrente, e após fixadas em álcool absoluto 99,3%.⁹

Os dois sítios investigados, borda de língua e assoalho de boca, foram submetidos a coletas citopatológicas em três momentos: coleta inicial (Baseline), após em média 6 meses (6 meses), e após 12 meses (12 meses) (Figura 2). Em cada coleta os indivíduos participantes deveriam responder um questionário sobre o uso de tabaco (número de cigarros fumados/dia e tempo de duração do hábito), hábitos etilistas (quantidade de bebida ingerida por semana), além de informações relativas à saúde geral. O status de fumo auto-reportado é considerado pela literatura como um método adequado para a obtenção deste dado. Estudos que validaram esta metodologia demonstraram que o status de fumo auto-reportado apresenta altos níveis de sensibilidade e especificidade (87% e 89% respectivamente).¹⁸

As amostras foram submetidas à técnica de AgNOR seguindo o protocolo descrito por Ploton et al. (1986).¹⁹ AgNORs foram quantificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989).²⁰

As imagens foram capturadas por examinadores cegados, com a utilização do software Qcapture® software version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., 2005), com auxílio de uma vídeo-câmera Olympus® (QColor 5, Colet, RTV), que estava acoplada a um microscópio binocular (CX41RF, Olympus Optical Co.) e a um computador Dell (Dimension 5150). As primeiras 50 células nucleadas, bem distendidas e não sobrepostas, foram capturadas com aumento de 1000x utilizando óleo de imersão.⁹

O número de AgNORs por núcleo foi quantificado a partir das imagens capturadas. A média de AgNORs por núcleo (mAgNOR) em cada amostra e a porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo (pAgNOR>3) foram calculados.^{6,17} A quantificação das AgNORs foram realizadas por três examinadores previamente calibrados (ICC \geq 0,95).

A flutuação da atividade proliferativa ao longo do tempo foi realizada comparando o número de AgNORs quantificados em cada uma das 3 coletas realizadas. Para esta análise, trinta e sete indivíduos, que participaram de todas as coletas, foram incluídos e divididos de acordo com o respectivo grupo.

Análise Estatística

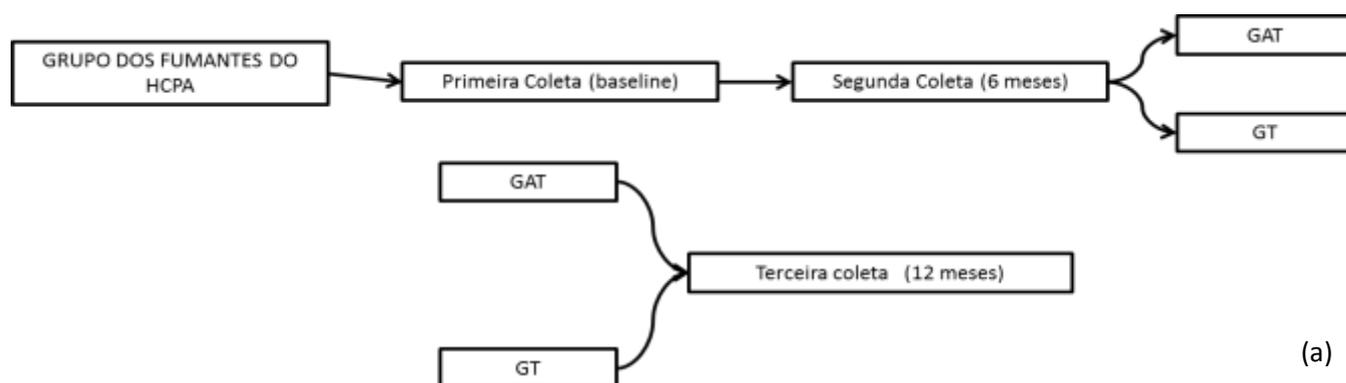
De acordo com a distribuição dos dados, o modelo linear generalizado seguido pela correção de Bonferroni foi utilizado para avaliar a influência do sexo, da idade, do hábito tabágico e etílico sobre a taxa de proliferação celular. Testes paramétricos (teste t de Student ou ANOVA/Tukey) foram utilizados para a análise dos dados que seguiam a distribuição Gaussiana. Dados que não seguiam esta distribuição foram analisados através do teste de Mann-Whitney e pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn de comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Todas as análises foram realizadas no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18,0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Figura 1. Critérios de inclusão no estudo de acordo com os grupos estabelecidos.

Grupos	
	GC indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, que nunca fumaram, e que ingeriam até 2 doses (28g) de álcool por semana.
	GAT indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do HCPA, que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que ao longo do tempo cessaram o hábito tabágico, alcoolistas ou não
	GT indivíduos em acompanhamento no Grupo dos Fumantes do HCPA, que fumavam no momento do inicial do trabalho, e que não cessaram o hábito tabágico ao longo do tempo, alcoolistas ou não.

GC: grupo controle; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo; GT: grupo de tabagistas.

Figura 2. Representação esquemática da seqüência das coletas realizadas ao longo dos 12 meses de acompanhamento nos grupos estudados.



(a) GC: grupo controle; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo; GT: grupo de tabagistas. Após a coleta de 6 meses os indivíduos foram incluídos no GAT ou no GT de acordo com a cessação ou não do hábito de fumar.



(b) Representação gráfica das coletas realizadas nos indivíduos do GC nos 3 momentos estudados.

RESULTADOS

Dos 99 indivíduos que compunham a amostra inicial (54 indivíduos do sexo masculino e 45 do sexo feminino), 68 (68.6%) foram reavaliados no segundo momento (39 indivíduos do sexo masculino e 29 do sexo feminino), e 37 (37.7%) na terceira coleta (16 indivíduos do sexo masculino e 21 do sexo feminino). Aqueles que não participaram do estudo longitudinal foram contatados por telefone e carta, porém sem sucesso. A distribuição da amostra nos respectivos grupos ao longo do tempo pode ser observada na Tabela 1.

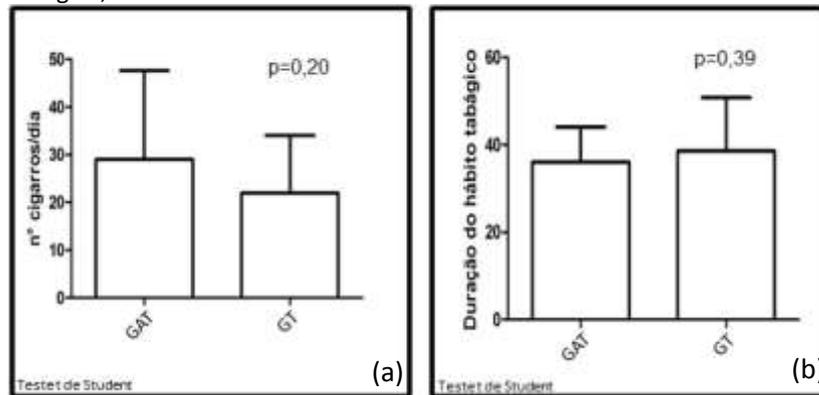
Tabela 1. Distribuição da amostra de acordo com sexo e grupo, nos três momentos estudados.

	GAT			GT			GC			n
	M	F	n total	M	F	n total	M	F	n total	
Baseline	17	5	22	20	13	33	17	27	44	99
6 meses	16	5	21	13	8	21	10	16	26	68
12 meses	7	4	11	5	6	11	4	11	15	37

M: masculino; F: feminino; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo; GT: grupo de tabagistas; GC: grupo controle.

A média de idade dos indivíduos foi de 41,84 (11,29) anos no GC, de 54,14 (6,72) para o GAT, e de 58,55 (8,94) para o GT. A diferença da média de idade dos indivíduos do GC foi menor e diferente da média de idade dos indivíduos do GAT e GT ($p < 0,01$). A média da duração do hábito tabágico do GAT foi de 36,09 (7,99) anos, e do GT foi de 38,64 (12,14). Entre os indivíduos do GAT e GT 12 (6,6%) eram etilistas. A média de cigarros fumados por dia no GAT foi de 29,05 (18,55), e do GT foi de 22,03 (12,02) (Figura 1).

Figura 1. Valores do nº de cigarros fumados por dia e duração do hábito tabágico, dos indivíduos dos GAT e GT na coleta baseline.



GAT: grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo. GT: grupo de tabagistas. (a) número de cigarros consumidos por dia pelos indivíduos dos GAT e GT. (b) Duração do hábito tabágico dos indivíduos do GAT e GT. (n = 55; as barras indicam o desvio padrão).

Para a análise do impacto da idade, do gênero, do consumo de bebida alcoólica, da duração do hábito tabágico, e do número de cigarros fumados por dia sobre a velocidade de proliferação da mucosa bucal, 53 indivíduos do GAT e GT que apresentavam estas informações registradas no momento da primeira coleta foram incluídos na análise. Após a correção dos dados, observou-se que indivíduos do sexo feminino apresentaram taxas de proliferação celular maiores do que indivíduos do sexo masculino no sítio assoalho de boca ($p_{AgNOR} > 3$; $p < 0,01$). As demais variáveis analisadas não puderam ser relacionadas com a proliferação celular da mucosa bucal.

Nove participantes do GT relataram terem reduzido o número de cigarros fumados por dia, ao longo de 1 ano de acompanhamento. Entretanto, não se observou a diminuição dos valores de proliferação celular entre a primeira e última coleta destes indivíduos, em ambos os sítios analisados. A média de cigarros/dia consumidos passou de 14 (6,07) para 6,6 (3,64), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Não foi possível observar diferença entre a proliferação celular de indivíduos etilistas e não etilistas no momento da primeira coleta ($p = 0,53$). Além disso, não foi possível a realização de testes estatísticos, devido ao tamanho amostral, para verificar se os usuários de etanol pertencentes ao GAT apresentaram menor redução da proliferação celular ao longo do tempo, quando comparados aos indivíduos do GAT não etilistas.

Indivíduos do GC apresentaram taxas de proliferação celular inferiores às taxas de proliferação dos indivíduos do GAT e GT, em ambos os sítios analisados, na primeira avaliação realizada. Ao longo

do tempo os participantes do GC e do GAT obtiveram taxas de proliferação celular semelhantes entre si, em borda de língua e assoalho de boca, para os parâmetros analisados (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Valores de mAgNOR (média e desvio padrão) das células descamadas da borda de língua e assoalho de boca dos GC GAT e GT, em diferentes tempos de avaliação.

		mAgNOR									
		GC	p	n	GAT	p	n	GT	p	n	p
BL	Baseline	2,32 (0,39) ^{Aa}	0,56*	44	2,66 (0,38) ^{Ba}	0,01*	22	2,80 (0,44) ^{Ba}	0,45*	33	<0,01*
	6 meses	2,23 (0,32) ^{Aa}		26	2,21 (0,50) ^{Ab}		21	2,66 (0,53) ^{Ba}		21	<0,01**
	12 meses	2,32(0,40) ^{Aa}		15	2,06 (0,48) ^{Ab}		11	2,85 (0,36) ^{Ba}		11	<0,01*
AB	Baseline	2,75(0,29) ^{Aa}	0,48*	44	2,89 (0,44) ^{A,Ba}	0,09**	22	3,11 (0,44) ^{Ba}	0,42**	33	<0,01**
	6 meses	2,72 (0,34) ^{Aa}		26	2,58 (0,56) ^{Aa}		21	3,10 (0,47) ^{Ba}		21	<0,01**
	12 meses	2,84 (0,34) ^{Aa}		15	2,51 (0,61) ^{Aa}		11	3,31(0,21) ^{Ba}		11	<0,01*

GC: grupo controle; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram do tabagismo; GT: grupo de tabagistas. Letras maiúsculas nas linhas (análise inter-grupo). Letras minúsculas nas colunas (análise intra-grupo). Letras diferentes representam diferença significante. mAgNOR: média de AgNOR por núcleo. *ANOVA/TUKEY **KRUSKAL-WALLIS/DUNN

Tabela 3. Valores de pAgNOR>3 (média e desvio padrão) das células descamadas da borda de língua e assoalho de boca dos GC, GAT e GT, em diferentes tempos de avaliação.

		pAgNOR>3 (%)									
		GC	p	n	GAT	p	n	GT	p	n	p
BL	Baseline	11,73 (8,65) ^{Aa}	0,57*	44	19,00 (12,59) ^{A,Ba}	0,07**	20	25,88 (13,86) ^{Ba}	0,20*	20	<0,01**
	6 meses	9,84 (6,11) ^{Aa}		26	11,61 (13,62) ^{Aa}		18	20,62 (12,71) ^{Ba}		18	<0,01**
	12 meses	12,00 (8,24) ^{Aa}		15	10,45 (11,52) ^{Aa}		11	27,45 (12,78) ^{Ba}		11	<0,01**
AB	Baseline	19,34 (10,82) ^{Aa}	0,35**	44	25,29 (12,74) ^{Aa}	0,34**	20	38,39 (13,32) ^{Ba}	0,13*	20	<0,01**
	6 meses	19,42 (12,45) ^{Aa}		26	19,16 (16,79) ^{Aa}		18	32,29 (13,63) ^{Ba}		18	<0,01**
	12 meses	24,27 (13,46) ^{Aa}		15	18,45 (15,00) ^{Aa}		11	40,91 (10,25) ^{Ba}		11	<0,01**

GC: grupo controle; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram do tabagismo; GT: grupo de tabagistas. Letras maiúsculas nas linhas (análise inter-grupo). Letras minúsculas nas colunas (análise intra-grupo). Letras diferentes representam diferença significante. pAgNOR>3: porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo.*ANOVA/TUKEY **KRUSKAL-WALLIS/DUNN

Os valores médios da flutuação individual de mAgNOR e pAgNOR>3, ao longo de 1 ano, em borda de língua e assoalho de boca, podem ser observados na Tabela 4. Indivíduos do GAT apresentam os maiores valores de variação máxima de mAgNOR em ambos os sítios avaliados. Os indivíduos do GC apresentaram os limites superiores do intervalo de confiança de 23% para a borda de língua e 18% para o assoalho de boca. Os indivíduos do GT apresentam as variações da borda de língua similares à variação do GC, entretanto, em assoalho de boca esta variação é consideravelmente maior.

Tabela 4. Valores da variação (Variação Mínima, Variação Máxima, Média, Desvio padrão, Limite Inferior do IC 95% e Limite Superior do IC 95%) de mAgNOR e pAgNOR>3 das células descamadas da borda de língua e assoalho de boca dos GC, GAT e GT.

GRUPO		mAgNOR BL	mAgNOR AB	pAgNOR> 3 BL	pAgNOR> 3 AB
GC	Variação Mínima	2%	7%	10%	14%
	Variação Máxima	41%	24%	100%	73%
	Média	17%	14%	64%	52%
	Desvio padrão	0,11	0,06	0,28	0,15
	Limite Inferior do IC 95%	11%	11%	47%	44%
	Limite Superior do IC 95%	23%	18%	80%	61%
GAT	Variação Mínima	1%	1%	0%	0%
	Variação Máxima	49%	57%	100%	100%
	Média	24%	16%	42%	53%
	Desvio padrão	0,17	0,19	0,31	0,35
	Limite Inferior do IC 95%	13%	3%	24%	31%
	Limite Superior do IC 95%	36%	29%	67%	76%
GT	Variação Mínima	4%	4%	14%	4%
	Variação Máxima	31%	47%	83%	83%
	Média	13%	18%	45%	41%
	Desvio padrão	0,07	0,13	0,24	0,21
	Limite Inferior do IC 95%	8%	9%	29%	26%
	Limite Superior do IC 95%	18%	27%	62%	55%

GC: grupo controle; GAT: grupo de indivíduos que abandonaram o tabagismo; GT: grupo de tabagistas. IC: Intervalo de confiança. mAgNOR BL: média de AgNORs por núcleo das células esfoliadas da borda de língua. mAgNOR AB: média de AgNORs por núcleo das células esfoliadas do assoalho de boca. pAgNOR>3 BL: porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo das células esfoliadas da borda de língua. pAgNOR>3 AB: porcentagem de células com mais de 3 AgNORs por núcleo das células esfoliadas do assoalho de boca.

DISCUSSÃO

A citopatologia bucal associada à técnica de AgNOR vem sendo utilizada para a avaliação das taxas de proliferação da mucosa bucal cronicamente exposta ao tabaco e ao álcool.^{6,9,15-17} Já está bem estabelecido na literatura que fumantes apresentam a proliferação celular aumentada quando comparada com não fumantes.^{5-9,15-17} Entretanto, não há estudos que avaliaram o efeito do abandono do tabagismo sobre a proliferação da mucosa bucal. É de se esperar que ao cessar a agressão resulte em uma diminuição dos valores de proliferação celular. Este estudo foi arquitetado para analisar de maneira longitudinal o comportamento proliferativo da mucosa bucal de indivíduos que pararam de fumar, através de citopatologia associada à técnica de AgNOR. A partir dos dados deste trabalho observou-se que houve uma redução significativa da proliferação celular da mucosa bucal dos indivíduos que pararam de fumar.

De acordo com Marron et al. (2010), após 20 anos da cessação do hábito tabágico, o risco para o desenvolvimento do câncer de cavidade bucal é muito similar ao de indivíduos que nunca fumaram.²¹ Diversas alterações subclínicas somam-se para que ocorra o desenvolvimento das lesões malignas. Uma das mais importantes é a desregulação da proliferação celular.¹² Neste estudo, constatou-se que fumantes apresentam maiores taxas de proliferação celular quando comparados com indivíduos não expostos a carcinógenos bucais, corroborando com os achados da literatura.^{5-9,15-17} Além disso, verificou-se que após um ano da cessação do hábito tabágico a taxa de proliferação da mucosa bucal diminui, e passa a apresentar valores semelhantes à de indivíduos que nunca fumaram. Demonstrando, assim, que em um ano de cessação do tabagismo um dos principais fatores relacionados à carcinogênese volta a apresentar valores considerados normais.

Apesar de estabelecido na literatura que o etanol atua como agente carcinogênico independente,²² e que a ingestão crônica de álcool acarreta no aumento da proliferação da mucosa bucal,²³ neste estudo não foi possível observar o efeito do álcool sobre a velocidade de proliferação celular, possivelmente por que apenas 12 indivíduos em um universo de 99 eram etilistas.

O presente estudo demonstrou que indivíduos em abandono do hábito tabágico apresentam uma variação individual maior do que àqueles do GC e do GT, para o parâmetro mAgNOR em ambos os sítios analisados. Estes dados indicam que a citopatologia associada à técnica de AgNOR é sensível para a detecção das alterações na velocidade de proliferação celular de indivíduos que deixam de expor-se a agentes carcinogênicos. O limite superior do intervalo de confiança da variação média de mAgNOR entre os indivíduos do GC foi de 23% em borda de língua e de 18% em assoalho de boca,

sendo estes valores considerados os limites normais de variação da proliferação celular ao longo de 1 ano. Isto sugere que variações acima destes valores não são fisiológicas, e indivíduos que os apresentarem devem ser mantidos em monitoramento sistemático. Os resultados do GT apontam que o sítio assoalho de boca é mais suscetível ao tabaco que a borda de língua, possivelmente por ser uma mucosa não ceratinizada. Os dados relativos à pAgNOR apresentaram comportamento semelhante a mAgNOR, observando-se diminuição dos valores de pAgNOR>3 no GAT. No entanto, este parâmetro apresenta maior dispersão com maior desvio padrão. Isso dificulta a utilização deste parâmetro como instrumento para a análise da variação individual da velocidade de proliferação celular.

Indivíduos do gênero feminino, do GAT e GT, apresentaram valores de proliferação celular em assoalho de boca maiores que indivíduos do gênero masculino, quando o parâmetro analisado foi pAgNOR>3. Alguns estudos que avaliam a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal optam por incluir na amostra analisada apenas indivíduos do gênero masculino,^{9,16} pois acredita-se que os hormônios femininos possam interferir na proliferação da mucosa bucal. Esta suposição é baseada em estudos que demonstram que estes hormônios possuem influência sobre a proliferação celular de ceratinócitos periodontais.²⁴⁻²⁶ Entretanto, Cançado et al (2001) avaliaram a proliferação celular da mucosa bucal de indivíduos de gêneros opostos, através da citopatologia e da técnica de AgNOR, e não observam diferença entre elas.⁶ Há a necessidade de novos estudos para confirmar ou não a influência hormonal sobre a proliferação da mucosa bucal.

A quantidade de cigarros fumados por dia não apresentou influência sobre a proliferação da mucosa bucal, e estes resultados estão de acordo com os achados na literatura.^{17,18} Entretanto, sabe-se que quanto maior o número de cigarros fumados por dia, maiores são as chances de desenvolver carcinoma da pulmão.²⁷ Além disso, indivíduos que são considerados fumantes pesados desenvolvem tumores pulmonares com taxas de proliferação celular (Ki-67) superiores a de indivíduos não fumantes e fumantes leves.²⁸ O tempo de hábito tabágico também não pode ser relacionado com a proliferação da mucosa da boca, e corroboram com os achado de Fontes et al. (2008).¹⁷

A idade dos indivíduos não possui efeitos sobre a taxa de proliferação celular da mucosa bucal, assim como descrito por Cançado et al.(2001).⁶ Carrard et al. (2004) conduziu um estudo em que verificou a influência da idade sobre a velocidade de proliferação celular, através da quantificação de AgNORs em cortes histológicos de línguas de camundongos, e constatou que a proliferação celular do epitélio e a idade do indivíduo não apresentam relação.²³

Em resumo, os fumantes apresentam a velocidade de proliferação celular maior quando comparados aos indivíduos do GC. Os indivíduos do GAT apresentaram uma diminuição da proliferação celular até valores semelhantes aos sujeitos do GC, em um período de 12 meses de acompanhamento. Demonstrando que a cessação do hábito tabágico reduz a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal. Os resultados do presente estudo ainda apontam que o monitoramento da velocidade de proliferação celular da mucosa bucal deve ser realizado de maneira individualizada e sistemática.

REFERÊNCIAS

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLOS MEDICINE*. 2006; 3: 2011-2030.
2. Warnakulasuriya S. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: prevention *Periodontology* 2000 2011; 57: 38–50.
3. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3 rd ed. Oxford: Oxford University Press. 1996. Cap. 1, p.1-20.
4. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe, JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol*. 1999; 21: 26-30.
5. Sampaio HC, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytol*. 1999; 43: 117-120.
6. Cançado RP, Yurgel LS, Sant’Ana Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol*. 2001; 37: 446-454.
7. Cançado RP, Yurgel LS, Sant’Ana Filho M. Comparative Analyses Between the Smoking Habit Frequency and the Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Smokers’ Normal Buccal Mucosa. *Tob Induc Dis*. 2004; 2: 43-49.
8. Bohrer PL, Sant’ana Filho, M, Paiva RL, Lauxen I, Rados, PV. Assessment of Micronucleus Frequency in Normal Oral Mucosa of Patients Exposed to Carcinogens. *Acta Cytol*. 2005; 49: 265-272.
9. Gedoz L, Lauxen I, Sant’Ana Filho M, Rados PV. 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; 29: 231-238.
10. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*. 2007; 18: 367-375.
11. van Oijen MGCT, Gilsinga MMA, Rijksenb G, Hordijk GJ, Slootwega PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium form smokers and ex-smokers. *Oral Oncol*. 1998; 34:297-303.
12. Piche A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNOR in tumor pathology. *Micron*. 2000; 31:131-141.
13. Derenzini M, Ploton D. Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. *Int Rev Exp Pathol*. 1991; 32: 142-192.
14. Trère D. AgNOR Staining and Quantification. *Micron*. 2000; 31: 127-131.
15. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, 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: 197-203.
16. Paiva RL, Sant’Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004; 26: 175- 180.
17. Fontes PC, Correa GHM, Issa JS, Brandão AAH, Almeida JD. Comparison of Exfoliative Pap Stain and AgNOR Counts of the Tongue in Smokers and Nonsmokers. *Head and Neck Pathol*. 2008; 2: 157–162.

18. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, Diehr P, Koepsell T, Kinne S. The Validity of Self-Reported Smoking: A Review and Meta-Analysis. *Am J Public Health*. 1994; 84:1086-1093
19. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *The Histochemical Journal* 1986; 18:5-14.
20. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*. 198; 158:185–188.
21. Marron M, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *International Journal of Epidemiology*. 2010; 39:182–196.
- 22 International Agency on Research for Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2010; 96: 1-1440
- 23 Carrard VC, Sant’Ana Filho M, Rados PV, Chaves ACM, Lauxen IS. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol*. 2004; 34: 233–238.
- 24 Ziskin, DE, Blackberg SN, Slanetz CA. Effects of Subcutaneous Injections of Estrogenic and Gonadotropic Hormones on Gums and Oral Mucous Membranes of Normal and Castrated Rhesus Monkeys. *J Dent Res*. 1935; 15: 407-428.
- 25 Richman MJ, Abarbanel AR. Effect of Estradiol and Diethylstilbestrol upon the Atrophic Human Buccal Mucosa with a Preliminary Report on the Use of Estrogens in the Management of Senile Gingivitis. *JCEM*. 1943; 3: 224-226.
- 26 Litwack D, Kennedy JE, Zander HA. Response of Oral Epithelia to Ovariectomy and Estrogen Replacement. *J Periodont Res*. 1970; 5: 263-268.
- 27 Doll R, Hill AB. Smoking and Carcinoma of the Lung. *Br Med J*. 1950; 2:739–748.
- 28 Mitsutoshi Shiba et al. Ki-67 Immunostaining and Other Prognostic Factors Including Tobacco Smoking in Patients with Resected Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer*. 2000; 89:1457-1465.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A citopatologia é alvo de diversos estudos sobre o câncer e a sua prevenção. Em especial, a citopatologia bucal, aos poucos, está demonstrando que apresenta potencial para o uso no acompanhamento/rastreamento de indivíduos, quando associada a técnicas quantitativas, com o objetivo de surpreender o câncer de boca de maneira ainda mais precoce. As técnicas quantitativas agregaram valor ao exame citopatológico, uma vez que aprimoram a acurácia do poder diagnóstico deste tipo de exame.

A impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs) é capaz de avaliar a velocidade de proliferação celular, um importante indicador das alterações iniciais, subclínicas, que precedem ao aparecimento do câncer de boca, e das lesões potencialmente malignas. A utilização da citopatologia e a técnica de AgNOR, de maneira concomitante, parece ser uma ferramenta promissora no acompanhamento longitudinal de pacientes de risco para o desenvolvimento do câncer bucal.

Este estudo propôs-se a avaliar o efeito da cessação do hábito tabágico sobre a velocidade de proliferação celular da mucosa clinicamente saudável, através da citopatologia associada à técnica de AgNOR. Como previsto, constatou-se que indivíduos fumantes apresentam maior taxa de proliferação celular quando comparados a indivíduos não-fumantes. Pela primeira vez, verificou-se que indivíduos que optam pelo abandono do hábito tabágico exibem a velocidade de proliferação celular, ao final de um ano de acompanhamento, semelhante à de indivíduos que nunca fumaram. E aqueles não expostos aos carcinógenos bucais apresentam a taxa de proliferação celular constante ao longo do tempo.

Estudos epidemiológicos demonstram uma associação entre a má higiene bucal e risco aumentado de câncer de boca. Nossos resultados mostram que esta variável exerceu uma influência

diretamente proporcional sobre a taxa de proliferação da mucosa bucal. Assim, entendemos que é necessário o controle da qualidade da higiene bucal dos participantes de trabalhos, que quantificam a proliferação celular da mucosa bucal exposta a agentes carcinogênicos. Apesar de constar na literatura a relação entre má higiene e câncer de boca, ainda não se compreende os reais mecanismos desta correlação, e demais estudos devem ser realizados para o esclarecimento desta associação.

Sugerimos prosseguir com este estudo, com o intuito de aumentar o número de participantes e o tempo de acompanhamento, para que seja possível a confirmação da importância da aplicação clínica deste tipo de metodologia. O parâmetro pAgNOR>3 tem um importante papel prognóstico na avaliação de lesões malignas. Entretanto, ainda não há um entendimento quanto a sua aplicabilidade no rastreamento de indivíduos de risco com a mucosa clinicamente normal, possivelmente por que esta variável apresenta maior dispersão com maior desvio padrão. Assim, a avaliação de pAgNOR>3 em uma amostra maior torna-se necessário para a completa compreensão de sua importância. Além disso, será importante verificar se a taxa de proliferação celular ao longo do tempo da mucosa bucal não exposta a carcinógenos permanece constante, com uma variação de no máximo 23% para borda de língua e 18% para assoalho de boca, em uma parcela maior de indivíduos acompanhados por um período maior de tempo.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-262

Versão do Projeto: 25/06/2008

Versão do TCLE: 25/06/2008

Pesquisadores:

MARLI MARIA KNORST

FABIO VIEIRA DE MIRANDA

PANTELIS VARVAKI RADOS

Título: ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 01 de julho de 2008.

Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MODELO DE FICHA PARA CADASTRAMENTO DOS PACIENTES

Nº de Registro _____ Data: _____

Nome do Paciente: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça _____

Endereço do Paciente: _____

Cidade: _____ Telefone: _____

Profissão: _____ Origem (local de coleta): _____

Doenças sistêmicas: _____ Medicamentos: _____

() Fuma ou () Fumou- quantidade/ tipo/ tempo: _____ / _____ / _____

() Ingere álcool ou () Ingeria- quantidade/ tipo/ tempo: _____ / _____ / _____

Bebida quente: _____ Chimarrão: _____

Presença de lesão clínica: _____ Diagnóstico clínico _____

História Clínica: _____

Sítio Anatômico: _____

Coletado por: _____ Tipo de Coleta: _____

Endereço e Telefone: _____

Projeto de Pesquisa: _____	Ano: _____
----------------------------	------------

Título: _____

Pesquisadores _____

Número de arquivo do Comitê de Ética: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TÍTULO DO PROJETO: ESTUDO DO EFEITO DO TABACO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA SUSPENSÃO DO USO**

Estamos realizando um trabalho conjunto do ambulatório de cessação de tabagismo do Hospital de Clínicas e da Faculdade de Odontologia da UFRGS para estudar as alterações celulares da ação do fumo sobre as células da mucosa da boca obtidas por raspagem. Estudos realizados previamente sugeriram que a exposição ao fumo causou alterações na mucosa da boca, entretanto ainda não foi estudado se estas alterações regridem se a pessoa para de fumar.

Para participar do estudo o senhor deverá concordar em fazer uma pequena raspagem em dois locais da boca: borda de língua e assoalho da boca. Esta raspagem é feita com a utilização de uma escova descartável (semelhante a uma escova dental) e dura cerca de 5 minutos. Durante a coleta o (a) senhor (a) pode sentir um pouco de coceira no local. Este procedimento será realizado antes do (a) senhor (a) entrar no grupo para parar de fumar e três, seis e doze meses após o término do grupo, independente se o senhor conseguiu parar de fumar ou se continuar fumando.

Se no seu exame for constatada variação do padrão normal, o senhor será encaminhado para a odontologia para acompanhamento.

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

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da segurança de que não serei identificado e, que se manterá, o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo;

O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa é Dra. Marli Maria Knorst (fone: 2101-8241)

Nome e assinatura do paciente

Data: _____ Telefone: _____

Nome e assinatura do pesquisador

Data: _____

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra do pesquisador responsável.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: ESTUDO DO EFEITO DO TABACO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA SUSPENSÃO DO USO

- Objetos da pesquisa: avaliar, alterações celulares nas células da mucosa bucal obtidas por raspagem.
- Será realizada raspagem com a utilização de escova (semelhante a uma escova dental) na mucosa bucal de indivíduos não expostos ao fumo. Além disso, todos os casos que mostrarem variação do padrão normal, serão submetidas a novas avaliações clínicas e/ou laboratoriais.
- Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da segurança de que não serei identificado e, que se manterá, o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo;
- da disponibilidade de tratamento médico e de indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa.

O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa é Dr. Pantelis Varvaki Rados (fone: 33085427) e Dra. Marli Maria Knorst (fone: 2101-8241)

Nome e Assinatura do voluntário

Data: _____ Telefone: _____

Nome e Assinatura do Pesquisador

Data: _____

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra do pesquisador responsável.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Prezado Sr (a) _____

O seu nome faz parte de uma lista de pacientes que estão participando da pesquisa “ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL”. O senhor não apresenta qualquer alteração em seus exames anteriores, porém como parte final da pesquisa devemos agendar a quarta e última coleta de células de sua boca. Lembramos que o exame é indolor, não invasivo e de rápida execução.

Em função disso, tentamos fazer contato telefônico para agendar uma consulta nos dias _-

_____.

Esta é a nossa última tentativa de chamamento para retomarmos este acompanhamento. Caso haja interesse, solicitamos que faça contato telefônico com a nossa equipe através do telefone (051) 3308.5011 e fale com Professor Vinicius Carrard ou com Bruna Maraschin, que também poderá ser contatada pelo telefone (051) 9149.1352, para agendarmos uma consulta. Reforçamos que esta última coleta é muito importante para esta pesquisa, mas que é seu direito deixar de participar.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados