

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FERNANDA BROCHIER CARDOSO

ANÁLISE DO PADRÃO DE MATURAÇÃO E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA
MUCOSA BUCAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM
LEUCOPLASIA E CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL

Porto Alegre

2016

FERNANDA BROCHIER CARDOSO

ANÁLISE DO PADRÃO DE MATURAÇÃO E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA
MUCOSA BUCAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM
LEUCOPLASIA E CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL

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

Orientador: Prof. Pantelis Varvaki Rados
Coorientadora: Prof^ª. Alessandra Dutra da Silva

Porto Alegre
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Brochier Cardoso, Fernanda

Análise do padrão de maturação e atividade proliferativa da mucosa bucal em indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal. / Fernanda Brochier Cardoso. - 2016. 35 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Coorientadora: Alessandra Dutra da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Carcinoma Espinocelular bucal. 2. Citopatologia . I. Varvaki Rados, Pantelis, orient. II. Dutra da Silva, Alessandra, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que eu pudesse chegar onde cheguei hoje, finalizando minha graduação. Primeiramente, a Deus por me iluminar e sempre me guiar pelos bons caminhos. Aos meus amados pais, Ivonir e Marisa, que são a minha base, por me ensinarem a sempre persistir para alcançar minhas ambições e por me proporcionarem todas as condições possíveis para que eu pudesse sonhar tão alto. Eu devo tudo a vocês. Ao restante da minha família, meus irmãos e minha querida Tia Tê pelo amor e suporte incondicional ao longo de toda minha trajetória, não apenas na graduação.

Ao meu namorado Léo, por suportar minhas ansiedades, compreender minhas muitas noites de estudo e ouvir incansavelmente minhas aflições durante esses últimos cinco anos: tu tornaste e torna minha vida mais alegre e feliz.

As minhas grandes amigas e colegas de curso Thaíse, Isabela e Danielle, meu quarteto fantástico: não consigo imaginar como seria passar por essa graduação sem a presença constante e suporte de todas. Vocês são insubstituíveis.

Não posso esquecer-me de agradecer ao tão querido grupo da cito, pelos deliciosos encontros “gourmet”, mas sobretudo pelo conhecimento adquirido por mim nesse período!

Ao Prof. Pantelis, por me oportunizar a chance de tamanho aprendizado na Iniciação Científica durante esses anos e pela ótima orientação recebida. És um grande mestre.

A minha coorientadora Lelê, não consigo descrever em palavras a gratidão que tenho por toda a ajuda na elaboração desse trabalho.

A todos os professores, colegas e funcionários da Faculdade de Odontologia da UFRGS que contribuíram para troca de conhecimentos e experiências no processo de formação profissional.

Muito Obrigada!

RESUMO

CARDOSO, Fernanda Brochier. **Análise do padrão de maturação e atividade proliferativa da mucosa bucal em indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal.** 2016. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Métodos não invasivos como a citopatologia tem se mostrado eficazes para realizar o rastreamento ou monitoramento dos indivíduos sem lesões e com lesões potencialmente malignas. O objetivo desse estudo foi avaliar o padrão citológico e atividade proliferativa da mucosa bucal em indivíduos sem lesão expostos a fumo e álcool, assim como em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal, comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco. Foram coletados 117 pacientes no total, e divididos em 4 grupos, sendo 33 do grupo controle, 31 do grupo álcool-fumo, 31 do grupo leucoplasia e 22 do grupo carcinoma espinocelular. Nos pacientes dos grupos sem lesão, a coleta citopatológica foi realizada na borda de língua e no assoalho de boca, e nos pacientes com lesão, a coleta foi realizada no local da lesão. As amostras foram submetidas à técnica do papanicolaou para análise morfológica, e a técnica do AgNOR para análise da velocidade de proliferação celular. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar uma mudança no padrão de maturação e na velocidade de proliferação das células quando expostas ao fumo e álcool. Foi possível verificar uma mudança no padrão de ceratinização da mucosa bucal, quando exposta a fatores irritativos, embora esse padrão não pareça acometer todos os sítios da boca, sendo mais representativa em bordo de língua. Conclui-se que a citopatologia pode sinalizar indicadores precoces em pacientes de risco para o câncer bucal como alterações na proliferação e maturação epitelial.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Leucoplasia. Citopatologia. AgNOR. Papanicolaou. Proliferação de células. Maturação de células.

ABSTRACT

CARDOSO, Fernanda Brochier. **Analysis of the maturation pattern and proliferative activity of the oral mucosa in individuals exposed to carcinogens , with leukoplakia and oral squamous cell carcinoma.** 2016. 35 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Noninvasive methods as cytopathology has proven effective to perform the tracking or monitoring of individuals without any lesions and in individuals with potentially malignant disorders. The aim of this study was to evaluate the maturation pattern and the proliferative activity of the oral mucosa in individuals without any lesion and exposed to tobacco and alcohol, as well as in subjects with leukoplakia and oral cancer, comparing them to individuals without any lesion and not exposed to risk factors. We collected 117 patients in total and divided into 4 groups, with 33 in the control group, 31 in the alcohol-smoking group, 31 in the leukoplakia group and 22 in the squamous cell carcinoma group. In the patients of the groups without lesions, the cytological sample was collected on the border tongue and floor of mouth, and in the patients of the groups with lesions, the collection was held at the site of injury. The samples were submitted to the Papanicolaou technique for morphological analysis and AgNOR technique for analysis of cell proliferation rate. Based on the results obtained, it was possible to observe a change in the pattern of maturation and the speed of cell proliferation rate when exposed to smoking and alcohol. It was possible to see a change in the pattern of keratinization of oral mucosa when exposed to irritating factors, although this pattern does not seem to affect all sites in the mouth, being more representative in the border of the tongue. We conclude that the cytopathology may evince early indicators of patients at risk for oral cancer with changes in epithelial proliferation and maturation.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Leukoplakia. Cytopathology. AgNOR. Papanicolaou. Cell proliferation. Cell maturation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVOS	8
2.1	OBJETIVO GERAL	8
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3	METODOLOGIA	9
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	9
3.2	AMOSTRA	9
3.3	COLETA CITOPATOLÓGICA	10
3.4	TÉCNICA PARA ANÁLISE DA MATURAÇÃO EPITELIAL (QUANTIFICAÇÃO DO PAPANICOLAOU)	11
3.5	TÉCNICA PARA ANÁLISE DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORS)	11
3.6	MANIPULAÇÃO E DESCARTE DE AMOSTRAS	12
3.7	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	12
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
3.9	TREINAMENTO DO EXAMINADOR	13
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	14
5	RESULTADOS	15
5.1	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	15
5.2	ANÁLISE DO PADRÃO DE MATURAÇÃO	16
5.3	ANÁLISE DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	17
6	DISCUSSÃO	19
7	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	23
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	27
	ANEXO B - QUESTIONÁRIO	28
	ANEXO C - TÉCNICA DO PAPANICOLAOU MODIFICADO	30
	ANEXO D - TÉCNICA DA IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS AgNORS	31
	ANEXO E - CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA	32
	ANEXO F- FICHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	33

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CE) representa 90% das neoplasias malignas que mais acometem a cavidade oral. (JOHNSON et al., 2005; SILVA, WARD, 2007; BAYLE; LEVIN, 2008; NEVILLE, 2004). No Rio Grande do Sul, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016), o câncer bucal é a 7º neoplasia mais comum, com uma taxa estimada de 15,49 casos a cada 100.000 habitantes por ano, para o sexo masculino e 3,40 casos a cada 100.000 habitantes para o sexo feminino.

Essa neoplasia é causada por uma combinação de fatores intrínsecos, como hereditariedade e condições sistêmicas, e fatores extrínsecos principalmente o tabaco e álcool (JOHNSON et al., 2005; SILVA; WARD, 2007). O fumo é considerado o fator de risco mais importante para o surgimento do carcinoma espinocelular bucal, atuando como um agente iniciador e também promotor no processo de carcinogênese. Isso porque ele provoca mutações em genes que regulam os mecanismos de proliferação e morte celular. Quando associado ao álcool, pode aumentar em até 50X o risco para o seu desenvolvimento, quando comparados com indivíduos que nunca beberam ou fumaram (CASTELLSAGUE et al., 2004). O papel do álcool na carcinogênese e seus mecanismos de atuação são parcialmente compreendidos (OGDEN; WIGHT, 1998). Sabe-se que o álcool causa aumento da permeabilidade da mucosa bucal, o que facilitaria a penetração de carcinógenos. Ele é também responsável por aumentar a proliferação do epitélio, bem como modificar o seu processo de maturação, provocando muitas vezes atrofia. Ainda, gera metabólitos e radicais que podem danificar o DNA celular (SQUIER et al., 1991; FELLER et al., 2013).

O carcinoma espinocelular bucal é, muitas vezes, diagnosticado num momento tardio, o que acaba influenciando negativamente o prognóstico, atingindo taxas de sobrevida de 50% em 5 anos. Nesse contexto, torna-se vital o diagnóstico precoce dessas lesões para estabelecer a melhor conduta de tratamento ao paciente, e, ainda, monitorar o aparecimento de lesões potencialmente malignas nos pacientes inseridos nos grupos de risco, tornando-se um método efetivo de prevenção do câncer (FONTES, 2008; LAUREANO, 2015).

As lesões potencialmente malignas são definidas como um grupo de lesões que predis põem o desenvolvimento do câncer, e são constituídas por alterações estruturais e citológicas resultantes tanto de distúrbios de proliferação quanto de maturação do tecido epitelial da boca, e que podem sofrer transformação maligna. (WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2011). Assim, os primeiros estágios de transformação maligna podem ser reconhecidos muitas vezes por esse tipo de lesão. Dentre esse grupo de lesões a leucoplasia, que é a mais prevalente, apresenta uma taxa anual de malignização de 1%. A

displasia epitelial está presente em cerca de 10 a 25% destas lesões, e representa o maior potencial de transformação maligna, sendo o padrão ouro para avaliação de risco de malignização. O câncer bucal pode se desenvolver em um sítio de leucoplasia pré-existente, mas também pode ocorrer em qualquer outro sítio da cavidade bucal (VAN DER WAAL, 2009; VAN DER WAAL, 2010).

A carcinogênese bucal é notoriamente complexa, no qual alterações precoces ocorrem a nível celular e precedem as manifestações clínicas. Nesse contexto, a citopatologia, por ser um método não-invasivo, tem sido sugerida como uma ferramenta de rastreamento individual, a fim de indicar mudanças iniciais tanto nos padrões de descamação como proliferação celular, contribuindo para detecção precoce das alterações iniciais e/ou prevenir o desenvolvimento de lesões com risco de malignização. (OGDEN; COWPE; GREEN, 1992; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001; HAYAMA et al., 2005; MEHROTRA, 2012).

Utilizando a citopatologia, Burzlaff (2007), através do método de Papanicolaou, observou diferentes padrões de maturação em células da mucosa bucal expostas a carcinógenos como fumo e álcool, com leucoplasias e carcinoma espinocelular. Células das camadas mais profundas do epitélio aumentaram em número e isto foi associado à severidade dos achados histológicos, assim leucoplasias com displasia epitelial apresentaram maior número de células intermediárias e parabasais do que leucoplasias sem displasia, e a proporção destes tipos celulares foi ainda maior em carcinomas espinocelulares.

Na citopatologia, a técnica de coloração AgNORs tem sido utilizada para avaliar a velocidade de proliferação celular das células epiteliais da mucosa bucal expostas a carcinógenos. (HERNANDEZ-VERDUN, 1983; TRERÉ, 2000). Estudos têm mostrado aumento na atividade proliferativa na mucosa bucal morfológicamente normal de pacientes expostos ao fumo e álcool, quando comparada aos não expostos (CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001; PAIVA et al., 2004), assim como alterações nas lesões potencialmente malignas e carcinomas (SHARMA; SAXENA, 2012; GONZALES SEGURA et. al., 2015).

O processo de malignização se caracteriza por diversas alterações celulares, que podem ser ou não detectáveis clinicamente, dependendo do estágio de evolução da neoplasia. Este processo constitui um interessante modelo a ser estudado dos eventos que podem ocorrer na carcinogênese bucal. Assim torna-se necessário a realização de pesquisas que avaliem marcadores que sinalizem os eventos precoces que ocorrem no processo de malignização da cavidade bucal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o padrão citológico e a velocidade de proliferação celular em indivíduos com mucosa clinicamente normal, exposta a carcinógenos, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal, em relação a indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o padrão de maturação da mucosa bucal por meio da técnica Papanicolaou em indivíduos sem lesão e expostos ou não aos fatores de risco, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal.

Avaliar a velocidade de proliferação celular da mucosa bucal por meio da técnica de AgNOR em indivíduos sem lesão e expostos ou não aos fatores de risco, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este foi um estudo transversal, observacional e analítico.

3.2 AMOSTRA

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no Ambulatório de atendimento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Centro de Especialidades Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no setor de Estomatologia do Hospital Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra foi composta por quatro grupos:

(1) Grupo Controle (GC): constituído por pacientes de ambos os sexos, acima de 30 anos, que não apresentavam lesões bucais, com exceção de doença periodontal, e que não estavam expostos aos fatores de risco para o câncer bucal. Pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que nunca beberam qualquer bebida alcoólica ou que bebem, em média, menos de uma dose de bebida alcoólica por dia (340 ml de cerveja, 113 ml de vinho e 28 ml de destilados) (TEZAL et al., 2001).

(2) Grupo Álcool e Fumo (GAF): constituídos por pacientes de ambos os sexos, acima de 30 anos, que não apresentam lesões bucais clinicamente visíveis, mas expostos aos fatores de risco. Pacientes que fumavam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos associado ou não ao consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica é caracterizado pela ingestão de uma dose ou mais de bebida alcoólica por dia.

(3) Grupo Leucoplasia (GL): constituído por pacientes de ambos os sexos, acima de 30 anos, que apresentavam leucoplasias bucais, sendo que após a coleta citopatológica foi realizada a biópsia das lesões para o diagnóstico histopatológico. Um paciente foi excluído do estudo após ter diagnóstico histopatológico de Líquen Plano.

(4) Grupo Carcinoma Espinocelular (GCE): constituído por pacientes de ambos os sexos, acima de 30 anos, que apresentavam clinicamente carcinoma espinocelular bucal primário confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico. Para critério de inclusão foram considerados apenas aqueles pacientes que não tinham histórico de carcinoma espinocelular bucal anterior.

O cálculo amostral foi baseado num nível de significância de 5%, com poder de 90% e com uma diferença esperada em relação à proporção de células intermediárias de 20% entre os grupos (BURZLAFF et al., 2007). Dessa forma a amostra foi constituída de aproximadamente 30 pacientes por grupo.

Na primeira consulta, para todos os pacientes, foram explicados os objetivos do estudo e após foi assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A). Os pacientes que não concordaram em participar do estudo tiveram seu atendimento garantido. Em seguida foi realizada uma entrevista e aplicado um questionário com informações pertinentes a resposta dos objetivos deste projeto (ANEXO B), seguido do exame físico extra-bucal e intra-bucal.

3.3 COLETA CITOPATOLÓGICA

Os pacientes do grupo controle e do grupo álcool/fumo foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal com citobrush® para realização de exame citológico nos sítios borda de língua e assoalho bucal, os sítios mais comumente afetados pelo câncer de boca (DEDIVITIS et al., 2004). Nos pacientes dos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular a coleta foi feita na região onde estava localizada a lesão. Previamente à realização dos raspados citopatológicos todos os pacientes foram orientados a retirar suas próteses removíveis e a bochechar água filtrada durante 1 minuto, sendo realizado após um raspado de cada sítio, o qual foi posteriormente colocado em lâminas histológicas e fixados em solução manipulada de etanol absoluto spray, sendo após armazenadas na geladeira.

Nos grupos Leucoplasia e Carcinoma Espinocelular foi realizado o procedimento de rotina da Clínica Odontológica procedendo à biópsia incisional das lesões sob anestesia local, após a coleta de material citopatológico. Os carcinomas espinocelulares e as leucoplasias foram diagnosticados histopatologicamente.

As lâminas foram identificadas com um número de registro para cada paciente, e então processadas de acordo com a técnica a ser realizada: Papanicolaou (ANEXO C) e AgNOR (ANEXO D).

3.4 TÉCNICA PARA ANÁLISE DE MATURAÇÃO EPITELIAL (QUANTIFICAÇÃO DO PAPANICOLAOU)

A análise do padrão de maturação epitelial dos esfregaços foi realizada através observação das primeiras 100 células epiteliais distendidas e não sobrepostas, com o auxílio de microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF em aumento de 400x. O observador desconhecia a qual grupo pertencia cada lâmina, pois elas eram identificadas apenas com o número de registro. Os diferentes tipos celulares foram quantificados de acordo com a seguinte classificação (ANEXO E): Célula anucleada, célula superficial com núcleo, célula intermediária e célula parabasal.

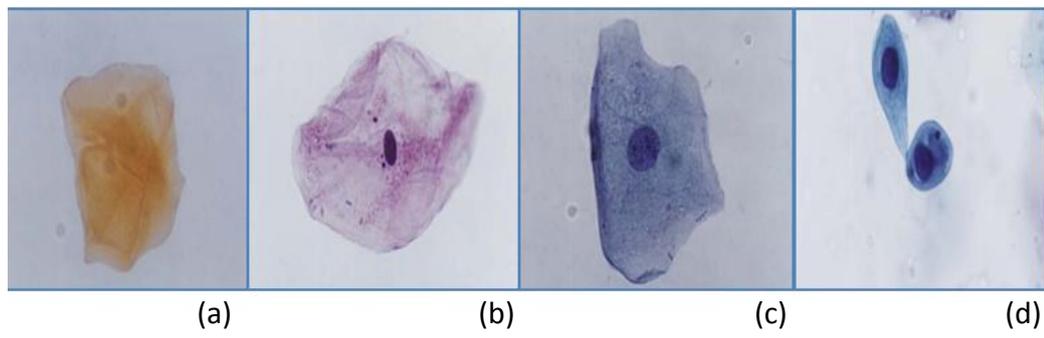


Figura 1: observa-se em (a) escama anucleada, com a presença de citoplasma celular em tons de laranja e ausência de qualquer remanescente nuclear. Em (b) observa-se célula superficial com núcleo, no qual o citoplasma apresenta-se eosinófilo e com estrutura nuclear picnótica fortemente corada de azul. Na figura (c) observa-se célula intermediária, na qual a estrutura nuclear não é tão picnótica, já sendo possível verificar organelas no seu interior. Na figura (d) observa-se células do tipo parabasal, onde a estrutura nuclear está aumentada e ocupa cerca de metade do citoplasma celular (coloração de Papanicolaou modificado, aumento de 400x).

3.5 TÉCNICA PARA ANÁLISE DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORS)

No esfregaço citopatológico submetido à técnica de AgNOR foram quantificadas 50 células, bem distendidas e não sobrepostas, em um microscópio binocular, em aumento 1000x, com óleo de imersão. O observador desconhecia a qual grupo pertencia cada lâmina. Foi realizada a contagem das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989), sendo estas, as estruturas esféricas negro-acastanhadas que aparecem dentro dos núcleos. AgNORs que estivessem muito próximos, não permitindo a individualização, foram considerados um único ponto. Para avaliação dos parâmetros de proliferação celular foi

calculada a média de AgNORs/núcleo (mAgNOR) e o percentual de células com mais do que 1, 2, 3 e 4 AgNORs/núcleo (pAgNOR), de acordo com metodologia proposta por Xie et al. (1997).

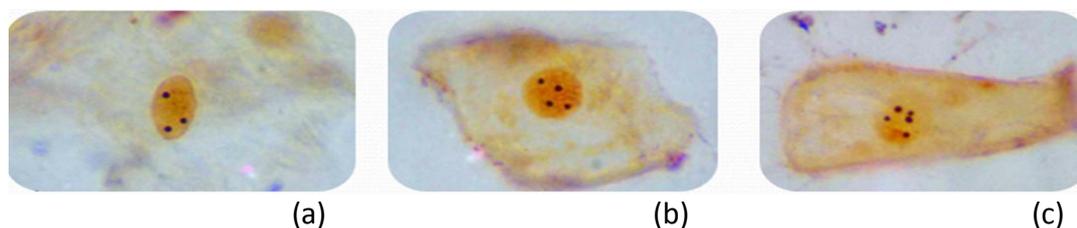


Figura 2: Em (a) observa-se a presença de 3 AgNORs, em (b) observam-se 4 AgNORs e em (c) observam-se 4 AgNORs, visto que quando os pontos estão muito próximos entre si, são considerados o mesmo. Técnica de impregnação por prata das Regiões Organizadoras Nucleares, em aumento de 1000x, com óleo de imersão.

3.6 MANIPULAÇÃO E DESCARTE DE AMOSTRAS

Todos os procedimentos envolvendo material biológico foram realizados com o uso de equipamentos de proteção individual (avental, máscara, luvas). Materiais tóxicos foram manipulados em capela de exaustão e o descarte de resíduos químicos feito via o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para a sua correta eliminação. Durante o transcorrer, bem como ao final dos experimentos, os materiais biológicos utilizados ou não para esta pesquisa foram descartados em sacos plásticos brancos com identificação de material biológico ou caixas para perfuro-cortantes e recolhidos por empresa contratada pela UFRGS para coleta deste tipo de resíduos.

3.7 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O conjunto dos experimentos deste projeto ocorreu no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do presente estudo foram submetidos ao Programa de Computador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) com o objetivo de realizar a análise estatística. O teste estatístico realizado foi o Generalized Estimated Equations (GEE) e o teste Bonferroni

para comparação entre os grupos, sendo considerado um nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$).

3.9 TREINAMENTO DO EXAMINADOR

O aluno responsável pela quantificação do Papanicolaou e do AgNOR recebeu treinamento para ambas as técnicas, no início e durante o decorrer do trabalho. No total, foram realizados 3 momentos de treinamento.

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e submetido à Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia previamente ao início de sua execução. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética e pesquisa cujo número CAAE é 12691813.6.0000.5347 (ANEXO F). Os pacientes foram convidados a participar dessa pesquisa, e após assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A). Todos os dados coletados foram protegidos por confidencialidade. Após os dados serem digitados no banco de dados, os participantes eram referidos apenas por um código numérico. Os dados com informações pessoais foram codificados de maneira que só o pesquisador responsável podia obter o acesso. Todas as informações e material biológico serão armazenados por um período de cinco anos, após os quais se for o caso, o projeto solicitará renovação junto às instâncias competentes.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Nesse estudo, participaram 117 pacientes, sendo 33 do grupo controle, 31 do grupo álcool-fumo, 31 do grupo leucoplasia e 22 do grupo carcinoma espinocelular. A média de idade variou de 48 a 57 anos, sendo que a menor média encontrada foi no grupo álcool-fumo, e a maior nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular. Em todos os grupos dessa pesquisa, com exceção do grupo carcinoma espinocelular, houve predominância de participantes do sexo feminino. No grupo carcinoma espinocelular, foi encontrado o maior percentual de pacientes que consumiam bebidas alcoólicas, assim como maior packyears. As condições dentárias encontradas foram piores nos grupos com lesão, sendo mais acentuada no grupo carcinoma espinocelular. Já no grupo controle e álcool-fumo, houve predomínio do estado dental bom e regular, respectivamente. As características demográficas e comportamentais da amostra estão descritas na Tabela 1.

Packyear é um parâmetro para análise da dose cumulativa de exposição ao tabaco ao longo do tempo, sendo calculada pelo número de cigarros consumidos por dia e multiplicado pelo número de anos de duração do hábito. Na Tabela 1, esse dado na forma de média também é mostrado.

No presente estudo, após diagnóstico histopatológico, as leucoplasias foram classificadas em displásicas (n= 7) e não displásicas (n=24). Destas, 8 foram classificadas com hiperkeratose, 11 com hiperplasia epitelial e hiperkeratose e 12 com hiperkeratose e acantose.

Tabela 1 - Dados demográficos e de hábitos dos pacientes incluídos nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular para análise do padrão de maturação e velocidade de proliferação celular

	Controle (n=33)	Álcool-fumo (n=31)	Leucoplasia (n=31)	Carcinoma Espinocelular (n=22)
Idade (média + DP)	55(±10,05)	48 (±11,05)	57 (±13,51)	57 (±8,40)
Gênero	51,1% F 48,4% M	74,1% F 25,8% M	58,1% F 41,9% M	48,1% F 51,9% M
Frequência de fumantes	--	100%	64,5%	70,4%
Packyears (média + DP)	--	24 (±16,4)	27 (±19,1)	51 (±42,6)
Consumo de bebidas alcoólicas	--	70,96%	41,9%	77,8%
Estado dentário				
Pobre	15,1%	32,2%	54,8%	63,6%
Regular	36,3%	41,9%	16,1%	22,7%
Bom	48,4%	25,8%	29%	13,7%
Localização da Lesão	--	--	Língua (32,2%) Assoalho de boca (19,3%) Palato (19,3%) Mucosa Jugal (12,9%) Fundo de sulco (3,2%) Gengiva (3,2%) Outras (9,8%)	Língua (18,1%) Assoalho de boca (27,2%) Palato (18,1%) Mucosa jugal (9,1%) Outras (27,5%)

5.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE MATURAÇÃO

Os dados referentes ao percentual dos diferentes tipos celulares da mucosa bucal observados pela técnica do Papanicolaou nos grupos estudados estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Foi possível observar maior percentual das células do tipo escama anucleadas nos indivíduos do grupo álcool-fumo quando comparado ao grupo controle, e no grupo leucoplasia quando comparado aos pacientes sem lesão ($p=0,00$), no sítio borda de língua (Tabela 2).

Conforme ilustrado na Tabela 3, foi observada diferença estatística em relação ao percentual de escamas anucleadas do grupo leucoplasia com os grupos sem lesão, no sítio assoalho bucal ($p=0,00$). Também foi observado maior percentual de células intermediárias nos grupos sem lesão, no sítio assoalho bucal, do que no grupo leucoplasia ($p=0,001$).

Comparando os sítios anatómicos coletados, foi possível observar maior percentual de células intermediárias no assoalho bucal, quando comparado à borda de língua ($p=0,007$).

Tabela 2 - Distribuição de células escamas anucleadas, superficial com núcleo e intermediárias nos grupos controle, álcool-fumo no sítio borda de língua, leucoplasia e carcinoma espinocelular no sítio lesional (média e desvio padrão)

	Controle (BL)	Álcool-fumo (BL)	Leucoplasia	Carcinoma Espinocelular	p*
Escama anucleada	1,0 ($\pm 0,2$) ^A	3,0 ($\pm 0,5$) ^B	13 ($\pm 2,6$) ^C	5,0 ($\pm 1,5$) ^{ABC}	p=0,00
Superficial com núcleo	43 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,8$)	40 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,6$)	p>0,05
Intermediária	51 ($\pm 3,1$)	58 ($\pm 3,1$)	46 ($\pm 3,7$)	58 ($\pm 3,1$)	p>0,05

BL=Bordo de Língua

*p correspondente ao teste de Bonferroni.

Tabela 3 - Distribuição das células escamas anucleadas, superficial com núcleo e intermediárias nos grupos controle, álcool-fumo no sítio assoalho bucal, leucoplasia e carcinoma espinocelular no sítio lesional (média e desvio padrão)

	Controle (AB)	Álcool-fumo (AB)	Leucoplasia	Carcinoma Espinocelular	p*
Escama Anucleada	1,0 ($\pm 0,2$) ^{AB}	1,0 ($\pm 0,4$) ^{AB}	13 ($\pm 2,6$) ^C	5,0 ($\pm 1,5$) ^{ABC}	p=0,00
Superficial com núcleo	34 ($\pm 2,3$)	30 ($\pm 2,9$)	40 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,6$)	p>0,05
Intermediária	65 ($\pm 2,3$) ^A	66 ($\pm 3,1$) ^A	46 ($\pm 3,7$) ^B	58 ($\pm 3,1$) ^{AB}	p>0,05

AB=Assoalho de Boca

*p correspondente ao teste de Bonferroni

5.3 ANÁLISE DA VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com relação aos parâmetros referentes à velocidade de proliferação celular, podemos observar maior média de AgNOR (mAgNOR) e percentual de AgNOR ($pAgNOR > 2$ e 3) nos pacientes do grupo carcinoma espinocelular bucal em relação ao grupo controle, no sítio borda de língua ($p=0,001$; $p=0,027$; $p=0,005$, respectivamente) conforme ilustrado na Tabela 4.

Quando consideramos os raspados obtidos do assoalho de boca dos grupos sem lesão foi possível observar, no grupo álcool-fumo, maior média (mAgNOR) e percentual de AgNOR ($pAgNOR > 2, 3$ e 4) do que no grupo leucoplasia ($p < 0,05$; $p=0,004$; $p=0,01$; $p=0,02$, respectivamente) conforme mostrado na Tabela 4. Ao comparar os dois sítios coletados, foi

possível observar maiores médias dos parâmetros de proliferação celular no sítio assoalho bucal quando comparado à borda de língua ($p=0,00$).

Tabela 4 - Valores de mAgNOR e pAgNOR (média e desvio padrão) das células coletadas em borda de língua (BL), assoalho de boca (AB) e sítio lesional (L) nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

		mAgNOR	pAgNOR>1	pAgNOR>2	pAgNOR>3	pAgNOR>4
Controle	BL	3,36($\pm 0,89$)*	95 ($\pm 1,10$)	74($\pm 2,40$)**	43($\pm 2,90$)****	20($\pm 2,10$)
	AB	3,93($\pm 0,14$)	98 ($\pm 7,00$)	87($\pm 2,40$)	62($\pm 3,40$)	34 ($\pm 3,40$)
Álcool-fumo	BL	3,72($\pm 0,94$)	98 ($\pm 4,00$)	82($\pm 1,80$)	51($\pm 3,00$)	27($\pm 2,70$)
	AB	4,31($\pm 0,13$)**	99 ($\pm 3,00$)	91($\pm 1,40$)****	69 ($\pm 3,00$)*****	39($\pm 3,20$)*****
Leucoplasia	L	3,58($\pm 0,13$)**	94 ($\pm 1,90$)	77($\pm 3,40$)****	50($\pm 4,50$)*****	24($\pm 3,00$)*****
CEC	L	4,16($\pm 0,16$)*	91 ($\pm 4,70$)	86 ($\pm 2,70$)***	62 ($\pm 4,20$)*****	35($\pm 4,30$)

* $p=0,001$; ** $p<0,05$; *** $p=0,027$; **** $p=0,004$; ***** $p=0,005$; ***** $p=0,01$;***** $p=0,024$
p correspondente ao teste de Bonferroni

6 DISCUSSÃO

O aspecto inovador dessa pesquisa é que ela faz uso da citopatologia para comparação de mucosa bucal normal, exposta aos fatores de risco para o câncer de boca e mucosa de pacientes com leucoplasia e carcinoma espinocelular. Essa comparação, na literatura, é bastante escassa, encontra-se apenas alguns estudos que utilizaram tal metodologia para análise. (FONTES et al., 2008; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001; GEDOZ et al., 2009).

Uma comparação direta na literatura a respeito do padrão de maturação da mucosa bucal é possível apenas com dois autores, que fizeram a classificação de acordo com o percentual de cada tipo celular através da técnica Papanicolaou. Assim, na análise do padrão de maturação epitelial da mucosa bucal nos diferentes grupos avaliados nesta pesquisa, o percentual de células mais encontrado em todos os grupos foi o de células intermediárias, seguido pelas células superficiais e escamas anucleadas, que corrobora com os achados de Bustos et al. (2004) e Burzlaff et al. (2007).

Há uma grande variedade na metodologia nos estudos que fazem uso da técnica do Papanicolaou, seja utilizando a classificação proposta por Papanicolaou & Traut, realizando análises citomorfométricas para detecção de anormalidades ou classificando atipias celulares para diagnóstico de neoplasias. (CANÇADO; YURGEL; SANT'ANA, 2001; HANDE; CHAUDHARY, 2010; AHMED; BALBIKER, 2009; AHMED et al., 2010).

Nesse estudo, foi observado aumento estatisticamente significativo de escamas anucleadas no grupo leucoplasia quando comparada aos grupos sem lesão, possivelmente relacionado ao fato da leucoplasia se caracterizar por uma mancha ou placa branca, resultante de uma espessa camada de ceratina em sua superfície. Esse padrão das lesões leucoplásicas pode ocasionar um número elevado de falso-negativos nos achados citopatológicos, uma vez que a coleta feita com citobrush® pode não atingir as camadas mais profundas, conforme citado por Mehrotra et al. (2009) e Burzlaff et al. (2007). Ainda, o padrão descamativo das leucoplasias depende muito do distúrbio de maturação presente. Assim, as células obtidas por meio da citologia esfoliativa são, em sua maioria, das camadas superficiais, e não das camadas mais profundas do tecido epitelial, onde a proliferação celular e suas alterações mais severas são mais perceptíveis (OGDEN; COWPE; GREEN, 1992; EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002). Essa questão pode ser um fator limitante para análise citopatológica das lesões da cavidade bucal, não devendo a citologia esfoliativa substituir a biópsia no diagnóstico definitivo do carcinoma espinocelular. Ela é, porém, um instrumento valioso para o

monitoramento daqueles pacientes de risco para o desenvolvimento dessa patologia, sendo indicado o acompanhamento longitudinal destes pacientes.

Maior percentual de escamas anucleadas nos pacientes expostos ao álcool e fumo foi encontrado quando comparado ao grupo controle, no sítio borda de língua, o que sugere uma mudança, ainda que inicial, no padrão de maturação do epitélio dos indivíduos expostos aos carcinógenos. Esse achado está de acordo com Bustos et al. (2004), porém em seu estudo não foi considerado o consumo de álcool, apenas o tabaco. O aumento no percentual de escamas deve-se ao aumento da ceratinização, presumivelmente em resposta ao estímulo direto do calor e dos produtos químicos decorrentes da combustão do tabaco, tendo como objetivo a proteção da mucosa contra esses agentes danosos. (WINN, 2001; GRINSPAN, 1960; BUSTOS et al., 2004; BRAGA et al., 2004). Esse padrão de alteração na ceratinização não parece acontecer em todos os sítios da cavidade bucal. Estudo de Drouilly (1984) não evidenciou diferenças no percentual de escamas anucleadas no assoalho bucal de fumantes e não-fumantes, em concordância com esse trabalho.

Além disso, como consequência do maior percentual de escamas anucleadas, proporcionalmente observamos menor percentual de células intermediárias no grupo leucoplasia, em discordância aos achados de Burzlaff et al. (2007), que encontrou um maior número de células intermediárias no grupo leucoplasia do que nos pacientes sem lesão. Ainda, o percentual de células intermediárias nos grupos álcool-fumo e controle foi maior do que no grupo leucoplasia. Isso provavelmente ocorreu devido à espessa camada de ceratina nas lesões leucoplásicas que acabou por dificultar a coleta de células mais profundas do epitélio bucal.

O sítio assoalho bucal apresentou um maior número de células intermediárias quando comparado à borda de língua, de acordo com os resultados de diversos estudos (BRAGA et al., 2004; SILVA; RADOS, 1997; BURZLAFF et al., 2007). Isso pode ser explicado pelo fato do assoalho bucal ser uma mucosa não ceratinizada, mais fina e permeável que a borda de língua.

Na literatura tem sido amplamente sugerido que a contagem de AgNOR reflete a velocidade de proliferação das células (QUINN; WRIGHT, 1990; MAO, 1995). A citopatologia, quando comparada com a histopatologia, em relação à impregnação por prata nas regiões organizadoras nucleolares é mais precisa, já que é possível a análise de todo o núcleo, e não apenas de uma parte dele (SUJATHAN, 1996; SHARMA; SAXENA, 2012).

Sharma e Saxena (2012), observaram uma maior média e percentual de AgNOR no grupo carcinoma espinocelular, seguido pelo grupo dos fumantes, sendo a menor média verificada no grupo controle. Gonzales Segura et al. (2015) constatou maior média de

AgNOR no grupo carcinoma e nas lesões potencialmente malignas quando comparado ao controle.

Nossa pesquisa encontrou resultados que reforçam os dados já existentes, onde foi observada maior média e percentual de AgNOR no grupo carcinoma ($4,16 \pm 0,16$) em comparação ao controle ($3,36 \pm 0,89$) conforme ilustrado na tabela 4, no sítio borda de língua. Dados semelhantes foram encontrados por Mao (1994), que obteve média de AgNOR de 4.69 ± 0.72 nos pacientes com carcinoma e 2.99 ± 0.43 nos pacientes com a mucosa bucal clinicamente normal, utilizando esfregaço citológico com metodologia semelhante a desta pesquisa. Este resultado também está em concordância com Remmerbach (2003). Esse autor verificou ainda que a média de AgNOR em pacientes fumantes e não-fumantes foi de 2.4 ± 0.54 AgNORs e 2.6 ± 0.4 , respectivamente. Esse resultado corrobora com os resultados do nosso estudo, não sendo verificada diferença entre os grupos. Fontes (2008), no entanto, verificou diferença estatística no mAgNOR entre o grupo controle e o grupo de pacientes fumantes.

Nossos resultados demonstraram maior média na velocidade de proliferação celular no assoalho de boca quando comparado a borda de língua, nos grupos controle e álcool-fumo ($p=0,00$), em concordância com Cançado et al. (2001), o qual constatou resultados similares no grupo de pacientes fumantes. Paiva et al. (2004), também observou maior proliferação celular (mAgNOR) nos sítio assoalho bucal dos pacientes fumantes e do grupo controle quando comparado a borda de língua, demonstrando que cada sítio anatômico apresenta velocidades de proliferação celular diferentes. A análise comparativa dos parâmetros de proliferação celular entre os pacientes com lesão e a mucosa bucal normal exposta a carcinógenos deve ser realizada com cuidado uma vez que existe diferença na velocidade de proliferação nos diferentes sítios. Assim, tal análise não pode ser feita nesse estudo com os grupos carcinoma e leucoplasia pelo fato das lesões estarem distribuídas por toda a cavidade bucal, impossibilitando uma comparação sem viés; diferentemente dos grupos sem lesão onde foram realizados raspados citológicos somente nos sítios assoalho bucal e borda de língua.

Ainda, foram encontrados valores maiores de mAgNOR e pAgNOR nos pacientes do grupo álcool-fumo em comparação com o grupo leucoplasia, no sítio assoalho de boca. Pelo fato das coletas terem sido realizadas em diferentes sítios anatômicos, considerando que a velocidade de proliferação celular é sítio-dependente, o assoalho de boca apresenta alta atividade proliferativa quando comparada aos diferentes sítios coletados nos grupos com lesão como leucoplasia.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados nessa pesquisa, é possível verificar uma mudança no padrão de maturação e na velocidade de proliferação das células da mucosa bucal quando expostas ao fumo e álcool. Ainda, é possível verificar um aumento na ceratinização da mucosa bucal, exposta a carcinógenos. Esse padrão, porém, não parece acometer todos os sítios da boca, sendo mais representativa em bordo de língua.

Em relação à velocidade de proliferação, é possível constatar que está aumentada quando há manifestação fenotípica do carcinoma espinocelular bucal. Conclui-se que a citopatologia pode sinalizar indicadores precoces em pacientes de risco para o câncer bucal como alterações na proliferação e maturação epitelial. Ela é adequada para realizar o rastreamento individual e em sítios específicos, ao longo do tempo. Faz-se necessário, porém, o emprego de novas metodologias associadas à ela, que possam sinalizar com maior acurácia aqueles indivíduos de maior risco.

REFERENCIAS

- Ahmed HG, Ebnoof SOMA, Hussein MOM, Gbreel AY. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. *Diagnostic cytopathology*. 2010; 38(7):489-95.
- Ahmed HG, Balbiker AEA. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to toombak and smoking. *Rare tumors*. 2009; 1(1):50-2.
- Bayle P, Levin B. *World cancer report 2008*. Lyon: IARC; 2008. p. 330-7.
- Braga FL, Meneguzzi RD, Paiva RL, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de fumantes e não fumantes. *Rev Odonto Ciencia*. 2004; 19:157-63.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2014. [acesso em 2015 fev 19]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf. Acesso em
- Burzlaff, JB. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*. 2007; 18(6):367-75.
- Bustos AIO, Santander ILE, Martínez MEF, Jaymes-Freire NLJ, Pinto AVO. Evaluación del grado de la queratinización y el recuento de AgNORs em citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. *Med Oral*. 2004; 9(3):197-203.
- Cançado RP, Yurgel LS, Sant'anna Filho M. Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. *Effect of Smoking Oral Oncol*. 2001; 37(5):446-54.
- Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004; 108(5):741-49.
- Crocker J, Boldi DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *The Journal of pathology*. 1989; 158(3): 185-8.
- Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004; 70(1): 35-40.
- Drouilly D. *Citología exfoliativa en pacientes fumadores [monografía]*. Santiago: Universidad de Chile; 1986.
- Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc*. 2002; 68(10): 617-21.

Feller L, Chandran R, Khammissa RA, Meyerov R, Lemmer, J. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ*. 2013; 68(4):176-80.

Fontes PC, Corrêa 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; 2:157-62.

Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Naggar, Westra W, Califano J et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: IARC Press; 2005. p. 177-9.

Gedoz L, Bohrer PL, Paiva RL, Burzlaff JB, Rossing CK, Sant'ana Filho M et al. Validation of cytopathology as a technique for analysis of epithelium cell maturation in oral mucosa of smokers and non smokers. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2009; 31(2):96-100.

Gonzalez Segura I, Secchi D, Carrica A, Barello R, Arbelo D, Burgos A, et al. Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *J Oral Pathol Med*. 2015; 44(3):178-84.

Grinspan D. Lesiones de los fumadores de tabaco y masticadores de betel, tabaco y coca. In: *Enfermedades de la boca. Patología clínica y terapéutica de la mucosa bucal*. Buenos Aires: Ed. Mundi; 1970. p. 891-8.

Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Oral Med and Pathol*. 2005; 10(2):115-22.

Hande AH, Chaudhary MS. Cytomorphometric analysis of buccal mucosa of tobacco chewers. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; 51(3): 527-32.

Hernandez-Verdun, D. The nucleolar organizer regions. *Biol Cell*. 1983; 49(3):191-202.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schimid S, Macdonald DG et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichard P, Sidransky D. *Pathology and genetics head neck and tumor: World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC Press; 2005. p. 168-75.

Laureano, NK. Estudo do efeito do tabagismo e seu abandono sobre a velocidade de proliferação das células da mucosa bucal: avaliação longitudinal [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia; 2015.

Mao EJ. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 1995; 80(3):320-9.

Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O. Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38(2):161-6.

Mehrotra R. The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvement. *Diagn Cytopathol*. 2012; 40(1):1-5.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxillofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 343-54.

Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. *Acta Cytol*. 1992; 36:706-10.

Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 36(4):247-51.

Paiva RL, Sant'ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Analyt Quant Cytol Histol*. 2004; 26(3):175-80.

Papanicolaou GN, Traut HF. *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York: Commonwealth Foundation; 1943.

Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol*. 1990; 160(2):93-102.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol*. 2003; 25(3):139-46.

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(2):251-6.

Silva MCA, Rados PV. Citopatologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em paciente do sexo masculino. *Rev. Fac. Odontol*. 1997; 38(2):3-10.

Silva NJ, Ward BB. Tissue biomarkers for diagnosis and management of oral squamous cell carcinoma. *Alpha Omegan*. 2007; 100(4):182-9.

Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev in Oral Biol and Med*. 1991; 2(1):13-32.

Silverman S, Becks H, Farber SM. The diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res*. 1958; 37(2):195-205.

Sujathan K, Kannan S, Pillai KR, Chandralekha B, Amma NS, Nair MK. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol*. 1996; 40(4):724-8.

Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol*. 2001; 72:183-9.

Trerè D. AgNOR Staining and Quantification. *Micron*. 2000; 31(2):127-31.

Van Der Wall, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa, terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009; 45:317-23.

Van Der Wall, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concept of management . *Oral Oncol.* 2010; 46:423–5.

Xie X et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, 1997; 79(11): 2200-08.

Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ.* 2001; 65(4):306-12.

Woolgar JA, Triantafyllou A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical pathology. *Periodontol 2000.* 2011; 57(1):51-72.

ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: **ANÁLISE DA CORRELAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA DA MUCOSA BUCAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS EM HUMANOS** será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo determinar a expressão de marcadores moleculares, associados a carcinogênese, e sua associação com o risco de desenvolvimento de câncer de boca. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá células coletadas de sua boca com uma escova.

Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes de um exame odontológico comum. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas. **Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa.** Caso decida participar e depois mude de idéia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento.

Eu, _____ (participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo.

Porto Alegre, ____ de _____ de 201_.

Telefone: _____

O pesquisador responsável por este estudo é Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e a aluna responsável: Alessandra Dutra da Silva, telefone para contato: (51)33083629 do professor responsável.

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 da equipe de pesquisadores deste estudo.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone: 51.33083629.

ANEXO B- QUESTIONÁRIO

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

1.5. Sexo: 1 masc () 2 fem ()

1.6. Qual sua data de nascimento: _____ Qual sua idade _____

1.7. A sua raça ou cor é 1 () branca 2() negra 3() parda 4() amarela 5() indígena

1.8. Você está: 1 () casado 2 () solteiro 3() divorciado 4 () viúvo

1.9: Você é alfabetizado 1 () sim 2() não

1.10. Você estudou até:

1() nunca estudou 2() 1-4 série 3() 5-8 série 4() 2 grau incompleto 5() 2 grau completo 6() superior incompleto 7() superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

1() uma vez por semana 2() 2-5 vezes por semana 3() uma vez por dia 4() mais de uma vez por dia 5 () nunca escova

2.2. Você divide a sua escova com outras pessoas 1() sim 2 () não

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

1 () nada 2 () palito 3 () fio dental 4() outro _____

2.4. Você usa algum produto para bochecho

1() não 2() sim. Qual? _____ Há quanto tempo? _____

2.5. Com que frequência

1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3() uma vez por dia 4 () mais de uma vez por dia 5 () nunca usa

2.6. Quando iniciou o uso?

1 () antes 2() depois do diagnóstico de câncer ou de lesão cancerizável

2.7. Quando foi a última vez que você foi ao dentista

1() muitos anos atrás 2 () 1-3 anos atrás 3() menos de 1 ano atrás 4 () não lembra 5 () nunca visitou

3. Fatores comportamentais

3.1. Você fuma atualmente 1() sim 2() não 3.2 Tipo _____

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos _____

3.4 Você fumou anteriormente 1 () sim 2() não

3.5 Quantos cigarros por dia _____

3.6 Por quantos anos _____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

3.8 Você toma chimarrão 1() frequentemente 2() algumas vezes 3() raramente 4() nunca

3.9 Você ingere bebidas alcóolicas: 1() frequentemente 2() algumas vezes 3() raramente 4() nunca

3.10 Qual tipo de bebida 1() nenhum 2() cerveja 3() cachaça 4() vinho

5() outros _____

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

4.2 Asma, alergia a alimentos, medicamentos () () ()

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4. Artrite () () ()

4.5 Outro problema de saúde (HIV, hepatite) () () ()

4.6. Você está usando alguma medicação 1 () sim 2 () não

4.7. Qual ? _____

ANEXO C- TÉCNICA DO PAPANICOLAOU MODIFICADO

- Álcool absoluto por 15 segundos (quatro vezes)
- Água destilada por 15 segundos
- Hematoxilina de Harris com 0,5g de Ácido Acético Glacial durante 1 minuto
- Descansar em papel absorvente
- Levar em água corrente e remover somente quando esta tiver aspecto límpido
- Carbonato de Lítio** durante 15 segundos
- Álcool por 15 segundos (aplicar quatro vezes)
- Orange G6 durante 1 minuto com Ácido Fosfotúngstico (0,15g/l)
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por duas vezes)
- Policromo*** durante 3 minutos
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por três vezes)
- Descansar em papel absorvente
- Xilol por 5 minutos (2x) seguido por Montagem com Bálsamo do Canadá

*Técnica preconizada por Papanicolaou, 1941 e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizada pelo Laboratório de Patologia da UFRGS. ** O carbonato de lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada.

** Composição: 200ml de corante EA36 e 600ml de corante EA65 (proporção 3:1).

ANEXO D- TÉCNICA DA IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DOS AGNORS

A técnica citoquímica da AgNOR será baseada na técnica descrita por Ploton et al. (1986), e segue os seguintes passos:

- Após raspagem da cavidade bucal com a escova citológica :
- Homogeneizar os tubos individualmente no vortex em alta velocidade por 15s.
- Antes de pipetar cada amostra, homogeneizar por mais 5s.
- Pipetar 200 mml da amostra
- Dispensar sobre a membrana o material uniformemente
- Proceder a técnica citoquímica da AgNOR
- Fixação em álcool etílico 96%
- Desidratação com álcool etílico absoluto
- Pós-fixação em uma mistura de álcool etílico-ácido acético (solução 3:1) por 10 minutos
- Lavagem em água destilada
- Impregnação pela prata, gotejando a solução coloidal sobre as lâminas, colocadas em câmara úmida fechada e levadas à estufa por 20 minutos a 45°C. A solução colóide de prata deve ser preparada, na hora de uso, pela dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, misturada numa proporção de 1:2 partes, com solução aquosa de nitrato de prata em concentração de 50%.
- Duas lavagens em água destilada aquecida a 45 °C, para facilitar a remoção da gelatina e, uma em água destilada na temperatura ambiente.
- Reidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Permout (Fisher ChemAlert®).

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

ANEXO E- CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA SEGUNDO CARVALHO (2002)

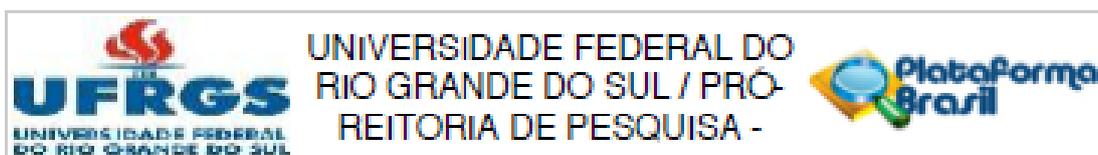
- Escama anucleada: são células achatadas, poligonais como as superficiais, porém sem núcleo. Ocasionalmente, leve vestígio da presença de um núcleo poderá ser percebido. O citoplasma é intensamente ceratinizado e se cora, mais comumente, em amarelo alaranjado ou vermelho.

- Célula superficial com núcleo: são células grandes, achatadas, de tendência poligonal e de citoplasma pouco transparente. O citoplasma é eosinófilo, isto é, cora-se numa variação do amarelo-claro ao vermelho-púrpura. A coloração mais comum, entretanto, é a rósea. As bordas citoplasmáticas são bem delineadas. O núcleo é inteiramente picnótico, isto é, apertado sobre si mesmo, pequeno e sem nenhuma estrutura identificável de cromatina. Aparece como um pequeno ponto preto, arredondado ou, às vezes, ligeiramente alongado.

- Célula intermediária: são células cianófilas com coloração mais clara que as das camadas mais profundas. As bordas externas do citoplasma mostram tendência acentuada para linhas retas, conferindo uma forma poligonal. A predominância do citoplasma sobre o núcleo é muito acentuada. O citoplasma se dobra com facilidade, tornando-se transparente. O núcleo tem a forma mais ou menos ovalada, a cromatina é finamente granular e uniformemente distribuída, porém alguns grânulos e esboços de cordões de cromatina podem ser presenciados.

- Célula parabasal: são células de forma oval, embora, ainda, possam aparecer arredondadas. O citoplasma tem coloração basófila ou cianófila. O núcleo assume posição central, tem forma ovalada e ocupa metade da área celular. A cromatina é menos abundante, granular e uniformemente distribuída

ANEXO F- FICHA DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA CORRELAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA DA MUCOSA BUCAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS EM HUMANOS

Pesquisador: Pantelis Varvaki Rados

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 12891813.6.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 501.635

Data da Relatoria: 28/11/2013

Apresentação do Projeto:

Este estudo transversal, observacional e analítico tem como objetivo avaliar o padrão citológico da mucosa bucal e correlacioná-lo com a expressão imunistoquímica e imunocitoquímica de proteínas associadas a adesão, diferenciação e proliferação em indivíduos com mucosa clinicamente normal, exposta a carcinógenos, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal, em relação a indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco. Para tal, será realizada a análise das células da mucosa bucal expostas a carcinógenos utilizando as técnicas de papanicolaou (análise morfológica), técnica de AgNORs (proliferação celular) e marcadores imunistoquímicos de adesão celular (desmoplacina 1), de diferenciação (citoqueratinas 4) e proliferação (EGFR), a fim de estabelecer um método utilizando a citopatologia, que possa prever a transformação maligna de pacientes expostos a carcinógenos com ou sem lesão clinicamente visível. Os indivíduos deste estudo serão selecionados no Ambulatório de atendimento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no Centro de Especialidades Odontológicas e no setor de Estomatologia do Hospital Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra será composta por 4 grupos: (1) Grupo Controle (GC): constituído por pacientes do gênero masculino, acima de 30 anos, que não apresentam lesões cancerizáveis ou câncer bucal, e que não estão expostos aos fatores de risco para o câncer bucal.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farpupilha

CEP: 90.040-060

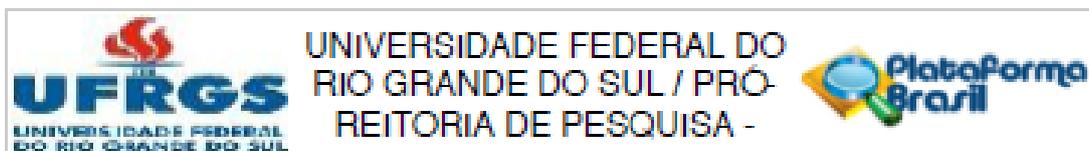
UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4285

E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 521.625

(2) Grupo Alcool e Fumo (GAF): constituídos por pacientes do gênero masculino, acima de 30 anos, que não apresentam lesões cancerizáveis nem câncer bucal, mas são expostos aos fatores de risco para essas lesões. (3) Grupo Leucoplasia (GL): constituído por pacientes do gênero masculino, acima de 30 anos, que apresentam clinicamente leucoplasias bucais, sendo posteriormente subdivididos em grupos de acordo com a ausência ou presença de sinais displásicos no material histopatológico examinado. (4) Grupo Carcinoma Espinocelular (GCE): constituído por pacientes do gênero masculino, acima de 30 anos, que apresentam clinicamente carcinoma espinocelular bucal

confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico. Será testada a normalidade da distribuição dos dados obtidos nos diferentes desfechos e a partir disso serão escolhidos os testes estatísticos. Se houver normalidade da distribuição dos dados, a frequência dos diferentes tipos celulares e da frequência de AgNORs e positividade das células para os diferentes marcadores na imunistoquímica será avaliada por ANOVA. O teste de correlação utilizando o coeficiente de correlação de Pearson será utilizado para avaliar a existência de associação entre os marcadores imunistoquímicos e as demais variáveis (contagem de AgNORs e dos tipos celulares do esfregaço). Avaliar o padrão citológico da mucosa bucal e correlacioná-lo com a expressão imunistoquímica e imunocitoquímica de proteínas associadas a adesão, diferenciação e proliferação em indivíduos com mucosa clinicamente normal, exposta a carcinógenos, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal, em relação a indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o padrão citológico da mucosa bucal e correlacioná-lo com a expressão imunistoquímica e imunocitoquímica de proteínas associadas a adesão, diferenciação e proliferação em indivíduos com mucosa clinicamente normal, exposta a carcinógenos, em indivíduos com leucoplasia e câncer bucal, em relação a indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco.

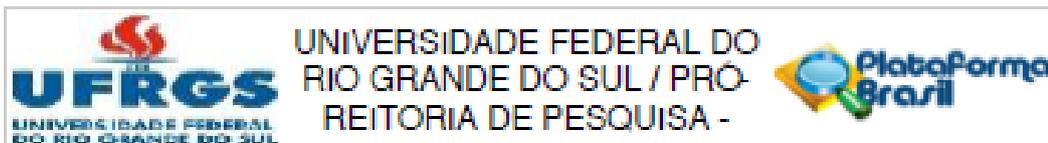
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo possui aprovação da Compesq Odontologia, conforme parecer anexado na Plataforma Brasil. O estudo prevê a realização de biópsias nos grupos 3 (diagnóstico clínico de leucoplasia) e 4 (diagnóstico clínico de carcinoma espinocelular), procedimentos esses que têm indicação terapêutica independentemente da realização do estudo.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farrowilha **CEP:** 91.040-080
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 501.605

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A presente emenda apresenta modificações no TCLE, solicitadas pelo CEP coparticipante. OS pesquisadores apresentam a individualização dos termos para pacientes com lesão e sem lesão.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente emenda apresenta modificações no TCLE, solicitadas pelo CEP coparticipante. OS pesquisadores apresentam a individualização dos termos para pacientes com lesão e sem lesão. Encaminhe-se ao CEP-HCPA para avaliação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A presente emenda apresenta modificações no TCLE, solicitadas pelo CEP coparticipante. OS pesquisadores apresentam a individualização dos termos para pacientes com lesão e sem lesão. Encaminhe-se ao CEP-HCPA para avaliação.

PORTO ALEGRE, 19 de Dezembro de 2013

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
 (Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Fariópolis CEP: 91.040-080
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: edica@propesq.ufrgs.br