

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

ISADORA PERES KLEIN

**VALIDAÇÃO DA CITOPATOLOGIA COMO TÉCNICA  
PARA MONITORAMENTO DE PACIENTES COM LEUCOPLASIA BUCAL**

Porto Alegre

2013

ISADORA PERES KLEIN

VALIDAÇÃO DA CITOPATOLOGIA COMO TÉCNICA PARA MONITORAMENTO  
DE PACIENTES COM LEUCOPLASIA 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 Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Coelho Carrard

### CIP – Catalogação na Publicação

Klein, Isadora Peres

Validação da citopatologia como técnica para monitoramento de pacientes com leucoplasia bucal / Isadora Peres Klein. – 2013.

52 f. il.

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

Orientador: Vinicius Coelho Carrard

1. Citologia esfoliativa. 2. Lesões cancerizáveis. 3. AgNOR. I. Carrard, Vinicius Coelho. II.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, minhas irmãs Andréia e Caroline e minha mãe Susane, pelo carinho imensurável e pelo apoio em todas as minhas escolhas.

Ao meu namorado, João, pela colaboração nesse trabalho e pelo companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Vinicius Carrard, pelos ensinamentos, não somente de Patologia, mas também de conduta e caráter profissional e pessoal. Agradeço pela confiança e amizade nesses 3 anos de trabalho e dedicação.

À Professora Laura Hildebrand, Professora Fernanda Visioli, Bruna Maraschin, Alessandra Dutra e Viviane Palmeira pela ótima convivência e apoio indispensável nas tardes de sexta-feira.

À Professora Manoela Domingues Martins, pelo incentivo ao conhecimento e pelo grande exemplo de professora e pessoa.

Ao Professor Pantelis Varvaki Rados, pela participação e contribuição para conclusão deste trabalho.

Às meninas do laboratório, Chris Krebs e Alessandra Magnusson pela dedicação e comprometimento.

Às minhas colegas e amigas, Liana Webber e Mariana Klein, que fizeram parte da minha trajetória e tornaram meu dia-a-dia mais alegre. E principalmente, à Bruna Lima, que esteve comigo desde o primeiro semestre da graduação dividindo todas as angústias e felicidades. Obrigada pela excelente companhia e pela amizade insubstituível.

À Faculdade de Odontologia da UFRGS, pela vivência e pelos grandes ensinamentos.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

## RESUMO

KLEIN, Isadora Peres. **Validação da citopatologia como técnica para monitoramento de pacientes com leucoplasia bucal.** 2013. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

A Leucoplasia bucal é uma lesão predominantemente branca com risco de transformação maligna. Clinicamente, essa lesão apresenta-se como mancha ou placa branca que pode mostrar áreas avermelhadas. A transformação maligna pode ocorrer na própria leucoplasia, na mucosa perilesional ou em mucosas distantes, nas quais não se observavam inicialmente alterações clinicamente. Em função disso, pacientes com leucoplasia podem sofrer malignização em uma mucosa que em um primeiro momento parecia saudável e não estava associada à leucoplasia. O objetivo do presente estudo foi verificar se existe correlação entre a taxa proliferativa avaliada a partir de esfregaços citológicos obtidos da mucosa clinicamente saudável e a taxa proliferativa avaliada na lesão propriamente dita. Os esfregaços citológicos foram obtidos da mucosa perilesional clinicamente normal e da mucosa do sítio anatómico contralateral. As células obtidas foram espalhadas em lâminas histológicas, fixadas em etanol à 96% e submetidas à técnica de impregnação pela prata para quantificação das AgNORs. Os espécimes biopsiados foram fixados em formalina neutra tamponada à 10%, emblocados em parafina. Dois cortes histológicos foram obtidos e submetidos a diferentes técnicas histoquímicas: hematoxilina e eosina (HE) para análise das alterações morfológicas do tecido epitelial e o outro à técnica de impregnação pela prata para quantificação das AgNORs e avaliação da taxa proliferativa. Os parâmetros utilizados foram média do número de AgNORs por núcleo (mAgNOR) e do percentual de células com mais do que 3 AgNORs/núcleo (pAgNOR>3). Os resultados mostraram que houve correlação significativa ( $R=0.852$ ,  $p<0.05$ ) entre mAgNORs das células esfoliadas da mucosa perilesional quando comparada às células obtidas da mucosa contralateral. Da mesma forma, uma correlação significativa ( $R=0.720$ ,  $p<0.05$ ) foi encontrada comparando os valores de mAgNOR entre as células da camada basal e da camada suprabasal do epitélio das leucoplasias. Não houve correlação entre os diferentes métodos - citopatologia e histologia – para a avaliação da taxa proliferativa. Pode-se concluir que os estágios subclínicos da progressão tumoral apresentam comportamento proliferativo semelhante, o que parece estar relacionado à teoria do campo de cancerização. Além disso, os resultados obtidos a partir das diferentes técnicas não apresentaram correlação, mostrando que comparações diretas devem ser evitadas. Entretanto, considerando que a citologia bucal associada à quantificação das AgNORs é informativa com relação à taxa proliferativa, esta abordagem é potencialmente útil para o monitoramento da mucosa clinicamente normal de pacientes portadores de leucoplasia.

Palavras- Chave: Citologia esfoliativa. Lesões cancerizáveis. AgNOR.

## ABSTRACT

KLEIN, Isadora Peres. **Validation of cytology as a technique for monitoring patients with oral leukoplakia**. 2013. 52 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) –Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Leukoplakia is defined as a lesion predominantly white in color that shows risk of malignization. Clinically, this lesion appears as a white patch or plaque that might present reddish areas. Malignant transformation may occur in the leukoplakia, in adjacent mucosa or in distant mucosae in which initially clinical changes were not noticed. Therefore, oral leukoplakia patients may transform in anatomic sites non-related to leukoplakia or that appears healthy previously. The aim of the present study was to verify if there is correlation between cell proliferation rate evaluated in biopsies and oral smears. Oral smears were obtained from mucosa adjacent to leukoplakia and from contralateral site. The samples were spread onto histological slides, fixed in 96% ethanol and silver-stained for AgNOR quantification. The biopsied specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraffin-embedded. Two histological slides were obtained and were submitted to different histochemical techniques: hematoxylin-eosin (HE) for morphological analysis of the epithelial tissue and silver-stained for AgNOR quantification for proliferation rate evaluation. The parameters were the mean number of AgNORs per nucleus (mAgNOR) and the percentage of cells with more than 3 AgNORs/nucleus (pAgNOR > 3). The results have shown a statistically significant correlation ( $R=0.852$ ,  $p<0.05$ ) between the mAgNORs of exfoliated cells obtained from adjacent mucosa when compared to the cells obtained from the mucosa contralateral. In the same way, a significant correlation ( $R=0.720$ ,  $p<0.05$ ) was found comparing mAgNOR values from basal layer cells and suprabasal layer cells of epithelium from biopsied leukoplakias. There was no correlation between the two different methods – cytopathology and histology – for proliferation rate evaluation. It may be concluded that subclinical stages of tumor progression show similar proliferative behavior, which seems to be related to the field cancerization theory. Besides, the results obtained from different techniques do not present correlation, showing that direct comparisons should be avoided. However, considering that oral cytology associated to AgNOR quantification is informative about proliferation rate, this approach is potentially useful for monitoring normal appearing mucosa of oral leukoplakia patients.

Keywords: Exfoliative cytology. Precancerous lesions. AgNOR.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma do critério de seleção dos pacientes.....	20
FIGURA 2 – Imagens clínicas de dois casos em que houve revisão de diagnóstico: estomatite nicotínica em palato duro e mole (A). Ceratose friccional em rebordo alveolar, em paciente que não usava prótese parcial removível e mastigava sobre a região (B) .....	21
FIGURA 3 – Imagens clínicas de dois casos em que houve revisão de diagnóstico: líquen plano apresentando-se como placa branca em lábio inferior de paciente no qual também foram identificadas lesões estriadas em borda de língua. Posteriormente realizou-se biópsia parcial e o exame histopatológico confirmou o diagnóstico (A). Queilite actínica em lábio inferior (B).....	21
FIGURA 4 – Imagens clínicas do paciente #1, no qual detectou-se leucoplasia não homogênea na mucosa do assoalho bucal e no ventre de língua com diagnóstico histopatológico de acantose e hiperkeratose (A) e do paciente #8 com leucoplasia não homogênea em região de borda de língua, com diagnóstico histopatológico de Displasia epitelial (B).....	22
FIGURA 5 – Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa adjacente a leucoplasia não homogênea localizada no assoalho bucal do paciente #1 (ex-fumante) apresentando 5 AgNORs (*) e 4 AgNORs (**). O exame histopatológico indicou acantose e hiperkeratose. Técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs, aumento original de 1000x.....	24
FIGURA 6 – Fotomicrografias de espécime obtido a partir de biópsia parcial de leucoplasia não homogênea e não displásica localizada em mucosa do assoalho bucal do paciente #1. Cortes histológicos submetidos à técnica de coloração da HE, a partir dos quais estabeleceu-se o diagnóstico de acantose e hiperkeratose. A linha pontilhada indica transição entre a mucosa adjacente e a lesão propriamente dita (A), aumento original de 400x e, à técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs (b), aumento original de 400x.....	25
FIGURA 7 – Fotomicrografias de espécime obtido a partir de biópsia de leucoplasia homogênea displásica localizada em mucosa de palato mole do paciente #12. Cortes histológicos submetidos à técnica de coloração da HE a partir dos quais estabeleceu-se o diagnóstico de displasia epitelial (A), aumento original de 400x e à técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs (B), aumento original de 400x.....	26
FIGURA 8 – Imagem clínica e histopatológica de paciente ex-fumante (havia parado há 7 meses, consumidor de álcool) que havia apresentado leucoplasia em mucosa do palato lado direito, a qual tinha sido submetida à biópsia total com diagnóstico histopatológico de Displasia epitelial e em consulta de acompanhamento (2 anos depois) apresentou lesão ulcerada em mucosa retromolar, a qual foi submetida à biópsia parcial (A). Diagnóstico	

histopatológico de carcinoma espinocelular. Técnica de coloração da HE  
(B), aumento original de 100x.....



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características dos pacientes incluídos na amostra.....	22
TABELA 2 – Características das lesões estudadas.....	23
TABELA 3 – Características das lesões excluídas do estudo.....	27
TABELA 4 – Valores das quantificações das AgNORs nas células esfoliadas da mucosa bucal clinicamente normal e das lesões dos pacientes portadores de leucoplasia bucal.....	29
TABELA 5 – Comparação dos valores de AgNORs em mucosa clinicamente normal e em mucosa adjacente e contralateral de pacientes portadores de leucoplasia.....	34

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Alterações morfológicas teciduais na displasia epitelial.....	14
QUADRO 2 – Avaliação da correlação entre as quantificações das AgNORs (mAgNOR) nas camadas basal e suprabasal das lesões biopsiadas e em células esfoliadas da mucosa adjacente e contralateral de pacientes portadores de leucoplasia bucal.....	30

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Gráficos de dispersão, mostrando a existência de correlação entre os valores de mAgNOR entre células esfoliadas da mucosa adjacente e contralateral (A) e entre as células da camada basal e da camada suprabasal do epitélio de leucoplasias (B)..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR	Silver-Staining Nucleolar Organizer Regions (Regiões Organizadoras Nucleolares Impregnadas pela Prata)
DNA	Desoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxiribonucleico
HE	Hematoxilina e Eosina
mAgNOR	Média do número de AgNORs/núcleo
NOR	Nucleolar Organizer Regions - Regiões Organizadoras Nucleolares
pAgNOR	Número de AgNORs/núcleo
RNA	Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
1.1 CITOPATOLOGIA.....	13
1.2 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES AgNORs.....	16
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
3.1 PACIENTES.....	19
3.2 OBTENÇÃO DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS.....	24
3.3 REALIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS.....	24
3.4 PREPARO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	25
3.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – TÉCNICA DE HE.....	25
3.6 AVALIAÇÃO DA TAXA PROLIFERATIVA – TÉCNICA DE AgNOR.....	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO B – TÉCNICA DE MPREGAÇÃO PELA PARTE DAS AgNORs.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO C – TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE AgNOR.....</b>	<b>52</b>

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

A Leucoplasia bucal é definida como uma placa ou mancha predominantemente branca que não pode ser classificada clínica ou patologicamente como qualquer outra doença (BARNES et al., 2005). Esta lesão é incluída no grupo de desordens potencialmente malignas, visto que apresenta risco aumentado de transformação em carcinoma espinocelular (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007; VAN DER WAAL, 2009). A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna de boca mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5% (CARRARD et al., 2010; JAHANBANI, 2003; SCHEPMAN et al., 1996; DIETRICH; REICHART; SCHEIFELE, 2003). Essa lesão acomete com maior frequência indivíduos do gênero masculino (DIETRICH; REICHART; SCHEIFELE, 2003; MISHRA et al., 2005) e da faixa etária que vai dos 40 aos 60 anos (PINDBORG et al., 1968; COWAN et al., 2001).

O consumo de tabaco é o fator etiológico mais importante para o desenvolvimento da leucoplasia bucal (BÁNÓCZY; GINTNER; DOMBI, 2001). Com relação à participação de outros fatores, como o consumo de bebidas alcoólicas, não há consenso na literatura (LEE et al., 2003; MACIGO; MWANIKI; GUTHUA, 1995). Outros autores consideram, ainda, que essa lesão pode ser idiopática, ou seja, não estar associada a nenhum fator de risco conhecido (HASHIBE et al., 2000; HASHIBE et al., 2003; DIETRICH et al., 2004; CHUNG et al., 2005; DAGLI et al., 2008; YANG et al., 2010).

A leucoplasia pode ocorrer em qualquer região da boca, entretanto os sítios anatômicos mais acometidos são a mucosa jugal, o assoalho de boca, o palato e a língua. (LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; KOVAC-KAVCIC; SKALERIC, 2000; GUPTA; WARNAKULASURIYA, 2002). Clinicamente, essas lesões podem se apresentar como manchas ou placas de coloração cinzenta ou branco-acinzentada e serem únicas ou múltiplas. As lesões são classificadas como: (a) homogêneas, quando apresentam superfície lisa e uniforme sem áreas avermelhadas ou (b) não homogêneas, que se caracterizam por apresentarem superfície irregular/rugosa (HOLMSTRUP et al., 2006) ou áreas avermelhadas, sendo chamadas eritroleucoplasia, leucoplasia mosqueada, ou leucoplasia salpicada (WILLIAMS et al., 2008).

Frente à identificação de lesões brancas em mucosa bucal, recomenda-se a eliminação de qualquer fator irritativo e acompanhamento por 2 a 4 semanas para verificar

se há regressão, o que confirmaria o diagnóstico de ceratose friccional ou ceratose do fumante caso o fator irritativo fosse o tabaco. Além destas, outras lesões brancas devem ser descartadas antes da definição do diagnóstico clínico de leucoplasia. Após ser definido o diagnóstico clínico de leucoplasia, deve-se realizar biópsia parcial para permitir a avaliação microscópica, a qual vai definir quais distúrbios de maturação epitelial estão presentes (KRAMER et al., 1978; JOHNSON; VAN DER WAAL; AXÉLL, 1997).

Microscopicamente, as leucoplasias podem apresentar diferentes alterações morfológicas no tecido epitelial. Essas alterações resultam de distúrbios do processo de renovação epitelial, que são características histopatológicas que representam alterações no ritmo de proliferação e diferenciação celular (HILDEBRAND et al., 2010). Grande parte dessas alterações, leva ao aumento da espessura do tecido epitelial, o que explica o aparecimento de placas ou manchas brancas do ponto de vista clínico (KRAMER et al., 1978). Estes distúrbios são classificados de acordo com suas características morfológicas em hiperplasia, hiperkeratose (hiperortoceratose ou hiperparaceratose), acantose e displasia epitelial. No diagnóstico histopatológico de uma leucoplasia estes distúrbios de maturação epitelial podem estar presentes isoladamente ou de forma combinada (WALDRON; SHAFER, 1975; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

A hiperplasia caracteriza-se pelo aumento do número de células do tecido com manutenção do seu padrão morfofuncional. A hiperkeratose indica aumento da espessura da camada de ceratina que pode ser do tipo paraceratina ou ortoceratina. A acantose é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, resultando no encurtamento das papilas conjuntivas e tendência de planificação da interface epitélio-conjuntivo (GREER, 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008). A displasia epitelial é caracterizada pela presença de células com diferentes graus de atipia localizadas geralmente nas camadas mais internas do epitélio, entretanto, com a evolução da lesão, pode atingir toda extensão do tecido, sendo então classificada como carcinoma *in situ* (KRAMER et al., 1978; LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; BARNES et al., 2005). Na displasia epitelial podem ser observadas as seguintes alterações morfológicas no tecido (BARNES et al., 2005):

Quadro 1 - Alterações morfológicas teciduais na displasia epitelial

<b>ALTERAÇÕES ARQUITETURAIS</b>	<b>ALTERAÇÕES CELULARES</b>
Estratificação epitelial irregular	Núcleos com tamanho aumentado
Perda de polaridade das células da camada basal	Pleomorfismo nuclear
Papilas epiteliais em forma de gota	Células com tamanho aumentado
Aumento do número de mitoses	Pleomorfismo celular
Presença de mitoses na metade superficial do epitélio	Aumento da proporção núcleo/citoplasma
Ceratinização individual	Aumento do volume nucleolar
Pérolas de ceratina	Número aumentado e de tamanho dos nucléolos
	Mitoses atípicas
	Hipercromasia

Fonte: adaptado de BARNES et al., 2005

Após o diagnóstico histopatológico, o profissional deve decidir qual abordagem terapêutica será adotada para cada caso. O objetivo do tratamento é prevenir a transformação maligna ou, quando isso não for possível, interceptar carcinomas espinocelulares nos seus estágios iniciais. O tratamento pode ser não cirúrgico, mediante a utilização de agentes farmacológicos tópicos ou sistêmicos como suplementos antioxidantes (KAUGARS et al., 1996), ou ainda, tratamentos cirúrgicos, os quais envolvem a excisão das lesões. A remoção da lesão pode ser parcial ou total e depende do tamanho da lesão, localização e presença ou não de displasia epitelial frente ao exame microscópico. Até o momento, não há evidências de que algum tipo de tratamento possa diminuir o risco de malignização (HOLMSTRUP et al., 2006; VEDTOFTE et al., 1987; VAN DER WAAL, 2009). Holmstrup et al. (2006) observaram, que a intervenção cirúrgica não reduz ou elimina o desenvolvimento do câncer. Nesse estudo foi observado que nas lesões tratadas cirurgicamente houve transformação maligna em 12% (11 de 94 casos) e que nos casos não tratados cirurgicamente observou-se que 4% (7 de 175 casos) evoluíram desta forma.

A taxa de transformação maligna varia 0,13-17,5%, com períodos de observação variando de 1 a 30 anos. (EINHORN; WERSALL, 1967; SILVERMAN et al., 1976). Alguns fatores parecem contribuir para o maior risco de malignização, dentre eles: faixa etária acima de 50 anos (AMAGASA; YAMASHIRO; UZAWA, 2011; CHIESA et al., 1993), gênero feminino (VAN DER WAAL, 2009), localização na mucosa da língua ou do assoalho de boca (VAN DER WAAL, 2009; POGREL, 1979), tamanho da lesão maior que 200 mm<sup>2</sup> (HOLMSTRUP et al., 2006; VAN DER WAAL, 2009), o tipo clínico não



homogêneo (SCHEPMAN et al., 1998; HOLMSTRUP et al., 2006; VAN DER WAAL, 2009) ou presença de displasia epitelial (VAN DER WAAL, 2009; SILVERMAN; GORSKY; LOZADA, 1984).

A relação entre presença de displasia epitelial e transformação maligna ainda não está clara. Alguns autores sugerem que as leucoplasias displásicas apresentam mais risco de malignização, mas outros autores não foram capazes de encontrar essa relação (HOLMSTRUP et al., 2006). Segundo Van der Waal (2009), essa discrepância de resultados pode estar relacionada à subjetividade associada com o diagnóstico de displasia epitelial.

O prognóstico das leucoplasias ainda permanece em discussão. Mesmo diante do prognóstico incerto, a existência de taxas registradas a respeito do risco de malignização justifica consultas de acompanhamento periódico para pacientes com esse tipo de lesão (VAN DER WAAL, 2009). Atualmente, vem se buscando formas alternativas para estudo dos pacientes com leucoplasia, a fim de se estabelecer biomarcadores capazes de identificar quais seriam aqueles que sofreriam transformação maligna ao longo do tempo.

### 1.1 CITOPATOLOGIA

A citopatologia bucal é um tipo de exame fundamentado na análise microscópica de células individuais, sendo um método indolor, simples e de baixo custo. Este método consiste na análise morfológica de células esfoliadas ou raspadas da mucosa bucal (BÁNÓCZY; RIGO, 1976; OGDEN; COWPE; WIGHT, 1997). Inicialmente, houve uma tentativa de utilizar a citopatologia como um método de diagnóstico do carcinoma espinocelular de boca. No entanto, observou-se um grande número de trabalhos que mostravam a ocorrência de casos falso-negativo e falso-positivo, mostrando que esta técnica é ineficaz para o diagnóstico de câncer bucal (SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958; SANDLER; CAHN, 1960; BANOCZY; RIGO, 1976; RICK; SLATER, 2003). Em decorrência disso, a técnica passou a ser utilizada para avaliar se os fatores de risco para o câncer de boca (fumo e álcool) induzem alterações no processo de renovação do epitélio em mucosa clinicamente normal (PAIVA et al., 2004; BOHRER et al., 2005; OGDEN; COWPE; GREEN, 1990). Paiva et al. (2004) sugerem que o fumo, associado ou não, ao álcool aumentam a atividade de proliferação celular da mucosa clinicamente normal do lábio inferior, da borda de língua e do assoalho bucal. Bohrer et al.(2005) concluíram que a quantificação de células mostrou-se suficiente para avaliar o padrão de maturação epitelial em esfregaços do lábio inferior, borda da língua e assoalho da boca de fumantes e não fumantes.

Por outro lado, considerando que nas leucoplasias observa-se um espessamento do tecido epitelial, existe possibilidade de que, ao realizar os raspados, obtenha-se um grande número de células anucleadas, o que dificultaria uma análise apropriada. Uma alternativa para contornar esta limitação seria obter os raspados da mucosa adjacente. Isso pode ser suportado no estudo de Wright e Shear (1985) que observaram áreas de displasia epitelial adjacente a carcinoma espinocelular e na teoria do campo de cancerização (CALIFANO et al., 1996). Os pacientes com carcinoma espinocelular de boca podem apresentar alterações moleculares ou microscópicas em regiões da mucosa adjacente ou distante desta lesão, as quais muitas vezes não apresentam alterações clinicamente perceptíveis. Em função disso, pacientes com leucoplasia podem sofrer malignização em uma mucosa aparentemente saudável e não associada à leucoplasia. Portanto, durante as consultas de acompanhamento, é importante avaliar todas as mucosas do paciente com leucoplasia e não apenas a região afetada pela lesão (SCHEPMAN et al., 1999). O monitoramento por meio de biópsias e exame histopatológico parece ser inviável para lesões não visíveis, isso porque seriam necessárias biópsias aleatórias em várias regiões da cavidade bucal (BREMNER et al., 2009).

## 1.2 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES E AgNORs

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

Alguns estudos têm utilizado a citopatologia associada à técnica de AgNORs para estudo do comportamento proliferativo da mucosa clinicamente normal de fumantes. Estes estudos demonstraram aumento da proliferação celular nas células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos consumidores de tabaco e de álcool (SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA FILHO, 2001; PAIVA et al., 2004; ORELLANA-BUSTOS et al., 2004; GEDOZ et al., 2007; CAMPOS FONTES et al., 2008). Sabe-se que há aumento da proliferação celular durante a progressão tumoral (MACCLUSKEY et

al.,1999). Dessa forma, o monitoramento das variações da atividade proliferativa poderia contribuir no sentido de identificar precocemente os indivíduos em que ocorreria a transformação maligna.

Estudos prévios tem demonstrado que ocorre aumento da proliferação celular na medida em que os distúrbios de maturação se tornam mais graves (HILDEBRAND et al., 2010; XIE et al., 1997). Porém, há necessidade de outros estudos, devido à diferença da taxa de proliferação celular de lesões não displásicas, principalmente acantose (HILDEBRAND et al., 2010).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo foi quantificar a taxa proliferativa em leucoplasias a partir da técnica de AgNOR.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se há correlação entre a taxa proliferativa avaliada a partir das células esfoliadas da mucosa adjacente ou contralateral à leucoplasias e a taxa proliferativa avaliada nas lesões propriamente ditas em espécimes obtidos por meio de biópsia;
- Avaliar se há correlação entre a taxa proliferativa avaliada em células esfoliadas da mucosa adjacente a leucoplasias e a das células obtidas da mucosa contralateral;
- Avaliar se há correlação entre a taxa proliferativa avaliada nas células da camada suprabasal e a da camada basal do epitélio em casos de leucoplasia.

### 3 METODOLOGIA

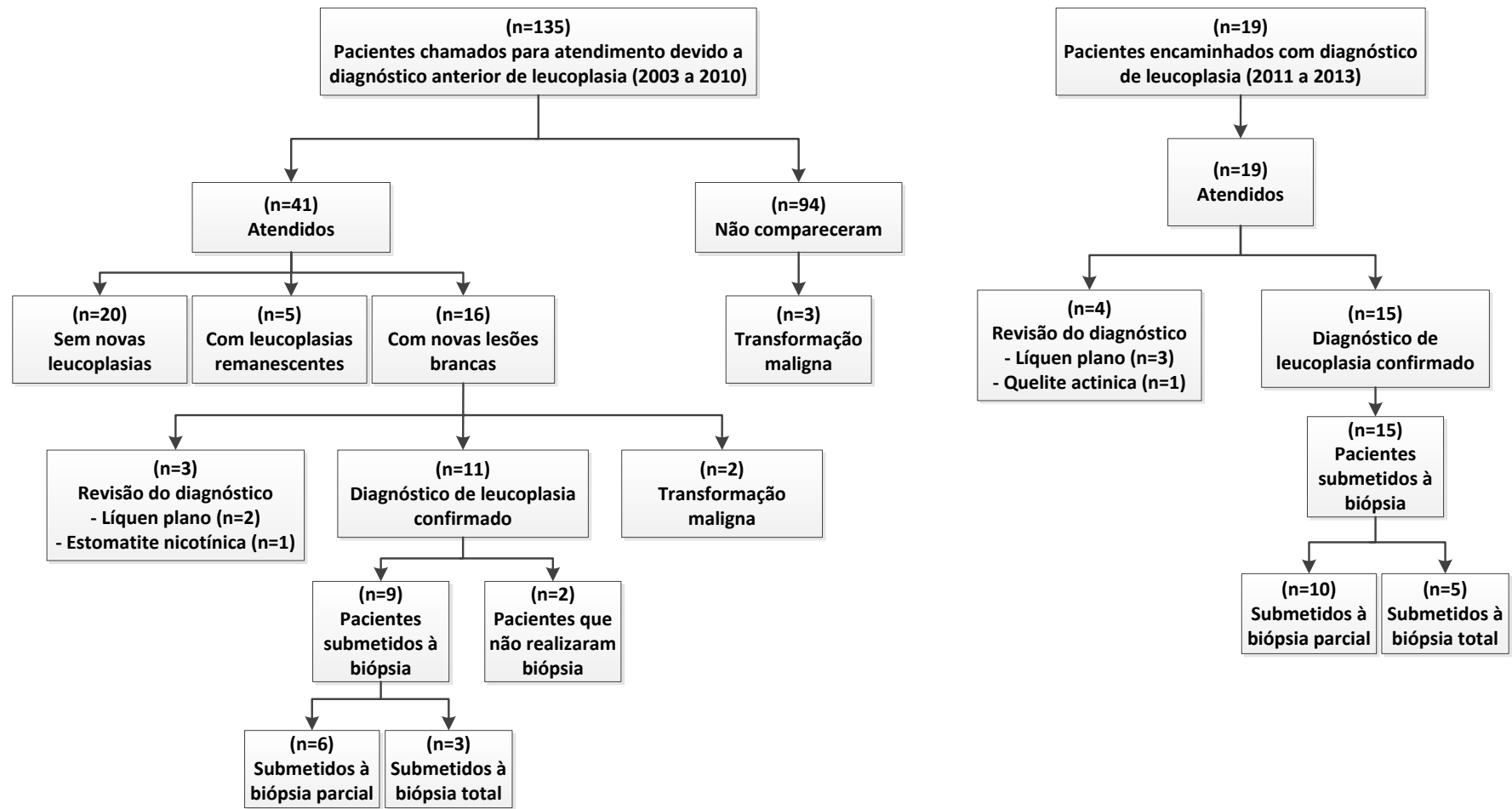
Este estudo faz parte do projeto intitulado “ACOMPANHAMENTO CLÍNICO LONGITUDINAL E MANEJO DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCOPLASIA BUCAL” e propõe a validação da citopatologia associada à técnica de AgNORs como método de monitoramento do comportamento proliferativo da mucosa bucal de pacientes com leucoplasia. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa da FO/UFRGS e ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (protocolo 17910).

O estudo foi observacional transversal com relação de associação.

#### 3.1 PACIENTES

A amostra do presente estudo foi selecionada a partir do projeto mencionado a cima, o qual inclui dois grupos de pacientes. O primeiro grupo (“grupo retrospectivo”) foi composto de pacientes com diagnóstico prévio de leucoplasia (2003-2010), os quais foram recuperados a partir consulta aos registros do Laboratório de Patologia. Este grupo totalizou 135 pacientes, com os quais se tentou contato por meio de telefonema ou carta para agendamento de consulta. Quarenta e um desses 135 pacientes compareceram para atendimento e 5 haviam sofrido transformação maligna. O segundo grupo (“grupo prospectivo”) foi composto de 19 pacientes que tiveram diagnóstico clínico de leucoplasia entre 2011 e 2013. Dentre os 60 pacientes examinados, 26 apresentavam leucoplasias e, destes, 24 apresentavam critério para indicação de biópsia. Maiores detalhes são apresentados no fluxograma do critério de seleção dos pacientes (Figura 1). Dos pacientes encaminhados com o diagnóstico clínico de leucoplasia, 3 do grupo retrospectivo e 4 pacientes do grupo prospectivo tiveram o diagnóstico revisado (Figura 2 e 3).

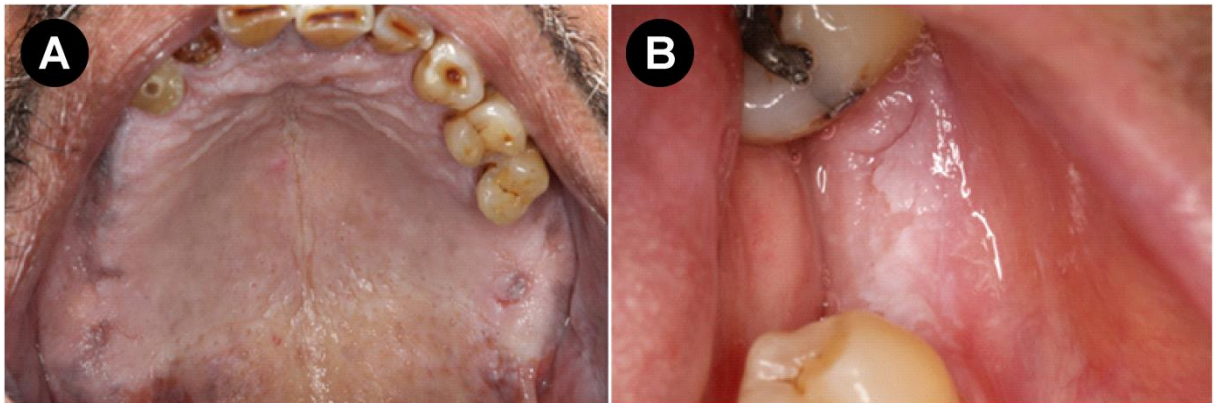
Figura 1 – Fluxograma do critério de seleção dos pacientes



Fonte: da autora

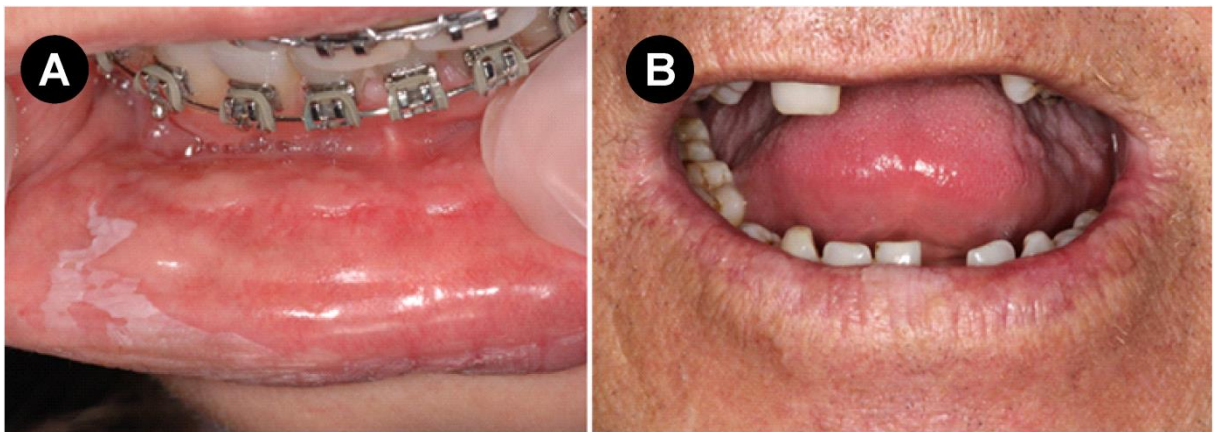


Figura 2 – Imagens clínicas de dois casos em que houve revisão de diagnóstico: estomatite nicotínica em palato duro e mole (A). Ceratose friccional em rebordo alveolar, em paciente que não usava prótese parcial removível e mastigava sobre a região (B)



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Figura 3 – Imagens clínicas de dois casos em que houve revisão de diagnóstico: líquen plano apresentando-se como placa em lábio inferior de paciente no qual também foram identificadas lesões estriadas em borda de língua. Posteriormente realizou-se biópsia parcial e o exame histopatológico confirmou o diagnóstico (A). Queilite actínica em lábio inferior (B)

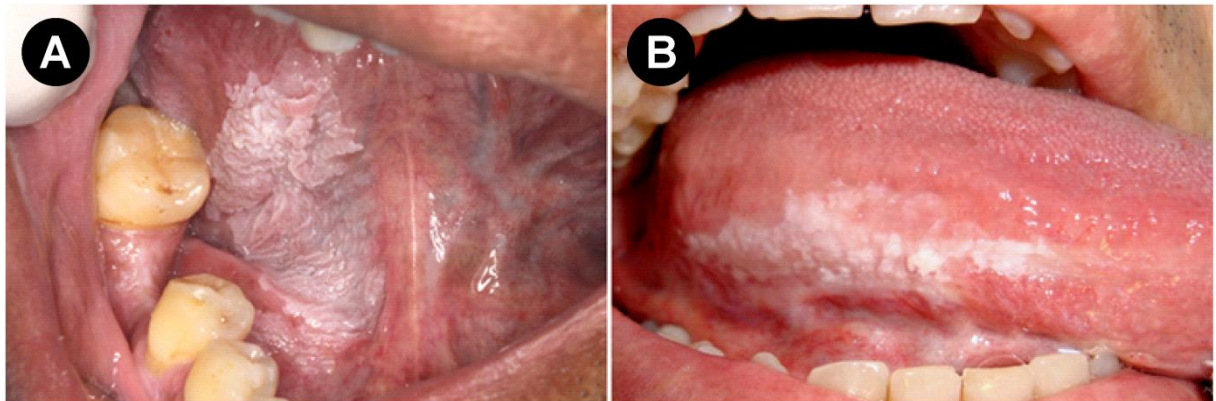


Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Os 60 pacientes atendidos (41 pacientes retrospectivos e 19 prospectivos, Figura 1) responderam a uma entrevista a partir da qual foram coletadas informações como idade, gênero, cor da pele e informações a respeito dos hábitos de exposição. Posteriormente, os mesmos foram submetidos a um exame clínico (Figura 4), no qual se analisou a presença e o número de lesões, bem como localização, tamanho ( $\text{mm}^2$ ), aspecto clínico (homogênea/não homogênea) e a conduta a ser instituída (biópsia parcial ou total). Com relação ao gênero, 8 pacientes eram homens e 6 mulheres. A média de idade foi 52,21 ( $\pm 12,63$ ), variando de 35 a 76 anos. Oito pacientes eram fumantes, 4 eram ex-fumantes e 2 nunca havia fumado. Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, 9 eram consumidores, 4 ex-consumidores e 1 nunca haviam consumido. Os demais dados referentes à caracterização dos pacientes estudados e das lesões avaliadas são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.



Figura 4 – Imagens clínicas do paciente #1, no qual detectou-se leucoplasia não homogênea na mucosa do assoalho bucal e no ventre de língua com diagnóstico histopatológico de acantose e hiperqueratose (A) e do paciente #8 com leucoplasia não homogênea em região de borda de língua, com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial (B)



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Tabela 1 - Características dos pacientes incluídos na amostra

Paciente	Gênero	Idade	Cigarro	Cigarro (n/dia)	Duração (anos)	Packyears	Álcool	Álcool (g/dia)	Duração (ano)
#1	M	57	F	20	36	36	EB	NI	NI
#2	F	64	EF	60	34	102	EB	21,94	NI
#3	M	40	EF	20	15	15	B	1,67	>10
#4	F	41	EF	6	20	6	B	1,33	>10
#5	F	76	F	3	50	7,5	NB	0	NI
#6	M	35	EF	10	14	7	EB	8,00	>10
#7	M	66	F	20	50	50	B	18,29	>10
#8	M	42	NF	---	---	---	B	4,11	>10
#9	F	49	F	20	30	30	B	5,49	<10
#10	M	50	F	80	37	148	B	39,47	>10
#11	M	40	NF	---	---	---	B	0,10	>10
#12	F	67	F	20	30	30	EB	22,76	>10
#13	M	45	F	40	30	60	B	1,33	>10
#14	F	59	F	40	45	90	B	1,71	>10

F - Fumante, EF- Ex-fumante, NF - Nunca fumou, B - Bebedor, EB - Ex-bebedor, NB - Nunca bebeu, NI – não informado.

Tabela 2 - Características das lesões estudadas

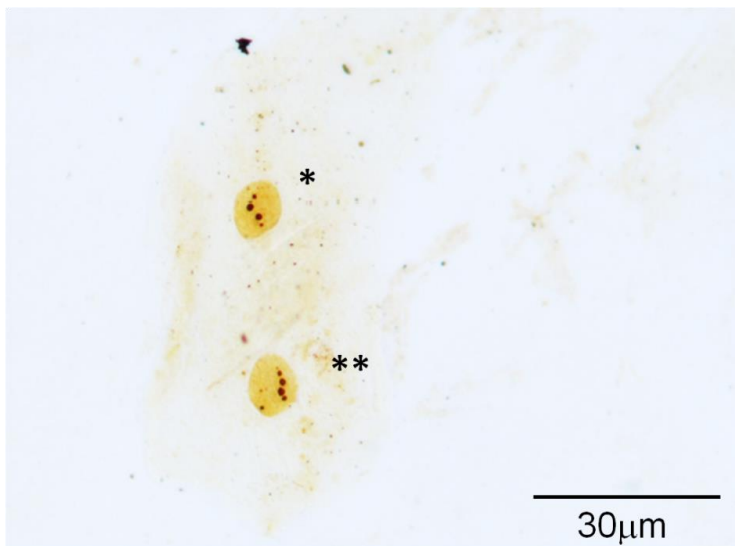
Paciente	Lesão	Localização	Tamanho (mm <sup>2</sup> )	Tipo (lesão)	Tipo (biópsia)	Número de lesões	Diagnóstico Histopatológico
#1	1	Assoalho, ventre de língua	400	NH	Parcial	Única	A e HC
#2	2	Palato mole	NI	H	Parcial	Única	HP e HC
#3	3	Rebordo alveolar inferior	15	H	Total	Única	HOC
#4	4	Mucosa jugal	15	H	Total	Única	HC e HPC
#5	5	Palato mole	16	H	Parcial	Múltipla	HC
#6	6	Assoalho	200	NH	Parcial	Múltipla	HOC
#7	7	Mucosa jugal	33	H	Parcial	Múltipla	A e HOC
#7	8	Fundo de sulco superior	40	H	Parcial	Múltipla	A e HC
#8	9	Borda de língua	350	NH	Parcial	Múltipla	D
#9	10	Assoalho	9	H	Total	Múltipla	HP e HPC
#10	11	Rebordo alveolar inferior	135	H	Parcial	Múltipla	HP e HC
#11	12	Mucosa labial superior	21	H	Total	Única	HP e HPC
#12	13	Palato mole	96	H	Parcial	Múltipla	D
#13	14	Mucosa jugal inferior	110	H	Parcial	Única	HP
#14	15	Palato duro, palato mole	260	H	Parcial	Múltipla	HP e HOC

H – Homogênea, NH – Não Homogênea, A-Acantose, HC-Hiperkeratose, HPC-Hiperparakeratose, HOC-Hiperortoceratose, HP-Hiperplasia epitelial, D- Displasia leve. NI – não informado.

### 3.2 OBTENÇÃO DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS

Foram obtidas células da mucosa clinicamente normal adjacente a leucoplasia e da mucosa do sítio anatômico contralateral, com auxílio de uma escova citológica. As células obtidas foram espalhadas em lâminas histológicas, as quais foram acondicionadas em um frasco contendo etanol a 96%. Posteriormente, os mesmos foram submetidos à técnica de AgNOR, seguindo o protocolo de Ploton et al. (1986), para a quantificação do número de AgNORs/núcleo como um parâmetro de taxa proliferativa. Para essa análise, foram consideradas 50 células por lâmina, sendo calculada, posteriormente, a média do número de AgNORs/núcleo (mAgNOR) e o percentual de células com mais do que 3 AgNORs (pAgNOR>3) para cada caso (Figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa adjacente a leucoplasia não homogênea localizada no assoalho bucal do paciente #1 (ex-fumante) apresentando 5 AgNORs (\*) e 4 AgNORs (\*\*). O exame histopatológico indicou acantose e hiperqueratose. Técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs, aumento original de 1000x



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

### 3.3 REALIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS

Previamente à realização das biópsias, foi prescrito tratamento antifúngico (nistatina 100.000 UI/ml, 10 ml por vez, 4 vezes ao dia, 14 dias) para eliminar a possibilidade de sobreposição de infecção por *Candida sp.* Nos casos em que havia fatores traumáticos associados às lesões brancas (próteses desadaptadas, restos radiculares, dentes ou restaurações fraturadas), os mesmos foram removidos através do encaminhamento desses pacientes para o atendimento clínico na própria faculdade ou mediante procedimento na própria clínica onde aconteciam os atendimentos. Após 14 dias, os pacientes retornavam e as biópsias e os

raspados citológicos da mucosa oral eram obtidos. Em 11 casos, as biópsias foram incisionais e, em 4 casos, as biópsias foram totais.

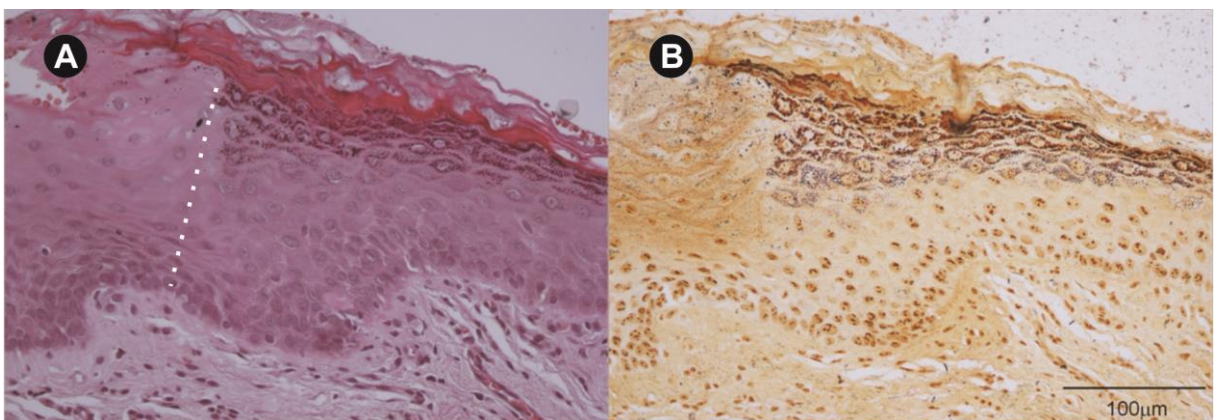
### 3.4 PREPARO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

As peças foram fixadas por 24 horas em formalina tamponada a 10% e processadas para inclusão em parafina histológica. Posteriormente, a partir dos blocos de parafina, foram feitas 2 secções de 4 µm do bloco de parafina e montadas em lâminas de vidro. Uma das lâminas foi submetida à técnica de coloração da Hematoxilina e Eosina (HE) e a outra à técnica de impregnação pela prata para evidenciação das AgNORs.

### 3.5 AVALIAÇÕES DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – TÉCNICA DE HE

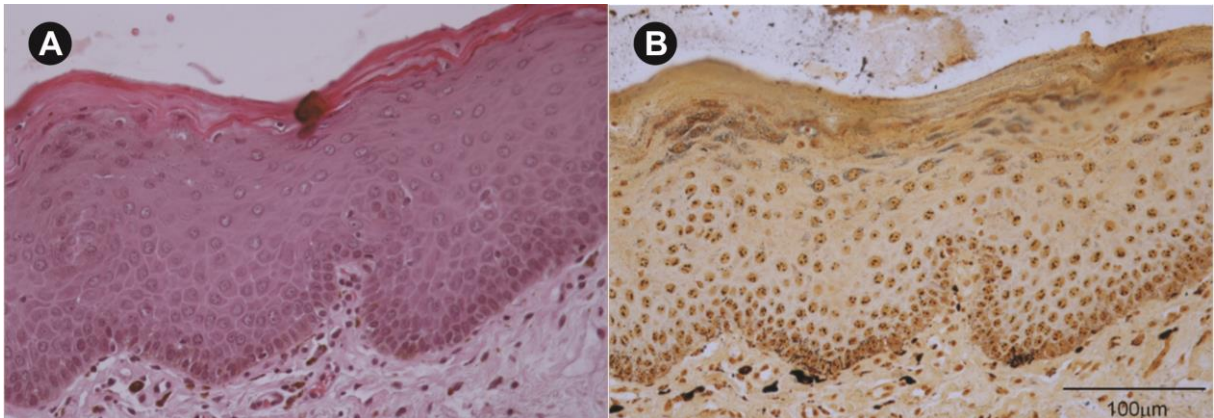
As lâminas histológicas coradas com HE foram avaliadas por patologistas previamente treinados para definir as alterações morfológicas presentes a partir do exame histopatológico. A avaliação dos distúrbios de maturação seguiram os critérios estabelecidos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (BARNES et al., 2005) e foram realizadas em regiões que correspondiam às avaliações por meio da técnica de AgNORs (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Fotomicrografias de espécime obtido a partir de biópsia parcial de leucoplasia não homogênea e não displásica localizada em mucosa do assoalho bucal do paciente #1. Cortes histológicos submetidos à técnica de coloração da HE a partir dos quais estabeleceu-se o diagnóstico de acantose e hiperqueratose. A linha pontilhada indica transição entre a mucosa adjacente e a lesão propriamente dita (A), aumento original de 400x e à técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs (B), aumento original de 400x



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Figura 7 – Fotomicrografias de espécime obtido a partir de biópsia de leucoplasia homogênea displásica localizada em mucosa de palato mole do paciente #12. Cortes histológicos submetidos à técnica de coloração da HE a partir dos quais estabeleceu-se o diagnóstico de displasia epitelial (A) aumento original de 400x e à técnica de impregnação pela prata para observação das AgNORs (B), aumento original de 400x



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Anteriormente à avaliação das lâminas histológicas, foi realizado um treinamento para os critérios de classificação das displasias epiteliais. Após ser atingido um índice Kappa maior que 0,7 entre os examinadores, foi iniciada a revisão das lâminas. Ao longo do estudo, a cada 10 lâminas examinadas, uma foi sorteada para reavaliação, a fim de assegurar a manutenção da calibragem intra e interexaminador.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA TAXA PROLIFERATIVA – TÉCNICA DE AgNORs

Imagens de campos microscópicos foram capturadas a partir das lâminas impregnadas pela prata, usando um microscópio CX41RF da marca Olympus® com uma câmera QColor 5, Coolset, RVT, Olympus® ligados a um computador Dimension 5150 da Dell®. Foi utilizado o aumento de 1000x, com utilização de óleo de imersão. As imagens foram importadas para um disco rígido externo a partir do programa QCapture®, versão 2.81. A avaliação foi realizada pela contagem do número das AgNORs por núcleo das células da mucosa bucal. As lâminas foram colocadas na platina do microscópio sempre com a sua identificação posicionada à direita do observador e foram capturadas tantas imagens quanto necessário para a quantificação das AgNORs nos núcleos das 50 primeiras células observadas, aumento de 1000x para as lâminas de citologia e 100 células por lâmina para as lâminas de histologia, sendo 50 da camada basal e 50 da camada suprabasal. A partir das contagens foi obtida a média do número de AgNORs /núcleo (mAgNOR) e o percentual de células com mais do que 3 AgNORs (pAgNOR >3). A calibragem foi realizada no período de pré-quantificação e repetida antes do término da coleta dos dados. Além disso, também foi feita

após um treinamento com o professor orientador, a fim de padronizar os critérios de contagem.

No total, foram produzidas 48 lâminas histológicas (24 submetidas à técnica de HE e 24 submetidas à técnica de AgNORs) e 48 lâminas citológicas (24 lâminas da mucosa adjacente e 24 lâminas dos sítios anatômicos contralaterais). Devido a problemas técnicos, 20 lâminas de citologia (2 lâminas por paciente) foram excluídas do estudo (Tabela 3). Nas lâminas produzidas a partir dos pacientes 15, 16, 17, 18, 19 e 20 não obteve-se 50 células. Nas lâminas provenientes dos pacientes 21, 22, 23 a qualidade da técnica de impregnação pela prata foi insatisfatória.

A amostra final do presente estudo contou com 15 casos de leucoplasia, que geraram 30 lâminas histológicas e 30 lâminas citológicas provenientes de 14 pacientes. Com base nestes casos, avaliou-se a correlação entre os valores das quantificações de proliferação celular por meio da técnica de AgNORs em células esfoliadas da mucosa com os valores das quantificações em espécimes provenientes de biópsias.

Tabela 3 – Características dos casos excluídos do estudo devido a problemas técnicos

Paciente	Lesão	Localização	Tamanho (mm <sup>2</sup> )	Tipo (lesão)	Tipo (biópsia)	Número lesões	Diagnóstico Histopatológico
#15	16	Palato mole	375	NH	Parcial	Múltipla	HP e HC
#16	17	Mucosa jugal	NI	NI	Total	Única	D
#17	18	Mucosa jugal	130	H	Total	Única	HOC
#18	19	Borda de língua	25	H	Parcial	Única	HC e A
#19	20	Mucosa jugal	72	H	Total	Única	HP e HC
#20	21	Palato mole	288	NH	Parcial	Única	HOC
#21	22	Gengiva	60	NH	Parcial	Múltipla	HC e HP
#22	23	Borda de língua	48	H	Total	Única	HP e HPC
#23	24	Mucosa jugal	30	H	Total	Única	HP e A

H – Homogênea, NH – Não Homogênea, A-Acantose, HC-Hiperkeratose, HPC-Hiperparakeratose, HOC-Hiperortoceratose, HP-Hiperplasia epitelial, D- Displasia leve. NI – não informado.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A existência de relação entre a taxa proliferativa mensurada a partir das células esfoliadas e a taxa proliferativa na leucoplasia propriamente dita foi verificada pelo teste de Correlação de Pearson. O nível de significância foi estabelecido em 5%. O teste foi realizado no software PASW 18.0.

## 4 RESULTADOS

Os dados referentes às alterações morfológicas, quantificação das AgNORs nas lâminas citológicas, nas lâminas histológicas são apresentados na Tabela 4. Na análise citopatológica, observou-se mAgNOR igual à 3.37 ( $\pm 0.74$ ) e 3.33 ( $\pm 0.72$ ) para a mucosa adjacente e contralateral, respectivamente. A análise dos espécimes de biópsia mostrou um mAgNOR de 2.46 ( $\pm 0.47$ ) e 2.95 ( $\pm 0.44$ ) para a camada basal e para a camada suprabasal do epitélio respectivamente.

No Quadro 2, são apresentados os valores para as análises de correlação entre as quantificações das AgNORs a partir das células esfoliadas e dos espécimes de biópsia. Constatou-se que há uma correlação forte ( $R=0.85$ ,  $p<0,001$ ) entre os valores obtidos para as células da mucosa adjacente e os valores obtidos para as células esfoliadas da mucosa do sítio contralateral. Com relação aos valores de mAgNOR para as lesões biopsiadas, houve correlação moderada ( $R=0.72$ ,  $p=0,002$ ) (Gráfico 1). Para as demais avaliações de correlação, não foram encontradas correlações estatisticamente significativas.

Tabela 4 - Valores das quantificações das AgNORs nas células esfoliadas da mucosa bucal clinicamente normal e das lesões dos pacientes portadores de leucoplasia bucal

Lesão	mAgNOR				pAgNOR>3				DHP
	Células esfoliadas		Biópsia		Células esfoliadas		Biópsia		
	Adj	Contra	Basal	Supra	Adj	Contra	Basal	Supra	
1	3,12	2,82	3,04	3,36	38	24	26	48	A e HC
2	3,18	2,38	2,58	2,98	34	16	20	32	HP e HC
3	2,12	2,14	2,30	2,38	8	14	16	12	HOC
4	3,24	3,16	2,60	3,12	36	40	6	24	HC e HPC
5	3,32	3,54	1,78	2,18	36	42	6	10	HC
6	3,16	3,04	2,50	3,00	34	38	18	30	HOC
7	2,72	2,72	2,26	3,34	18	20	10	36	A e HOC
8	3,40	3,08	2,40	2,80	40	28	10	22	A e HC
9	3,04	3,24	2,12	2,46	30	38	0	8	D
10	5,38	4,76	2,70	3,58	80	86	22	52	HP e HPC
11	3,24	3,16	1,60	2,52	38	38	0	6	HP e HC
12	3,64	3,88	2,02	3,02	46	68	8	28	HP e HPC
13	3,28	3,48	3,22	3,14	38	44	36	34	D
14	3,18	4,08	3,20	3,66	34	58	38	52	HP
15	4,52	4,40	2,58	2,70	80	72	16	16	HP e HOC
<b>Média</b>	3,37	3,33	2,46	2,95	39,33	41,73	15,47	27,33	
<b>DP</b>	0,74	0,72	0,47	0,44	18,88	21,19	11,60	15,41	

Adj- mucosa adjacente, Contra – mucosa contralateral, Basal – células da camada basal do tecido epitelial, Supra – células da camada suprabasal do tecido epitelial.

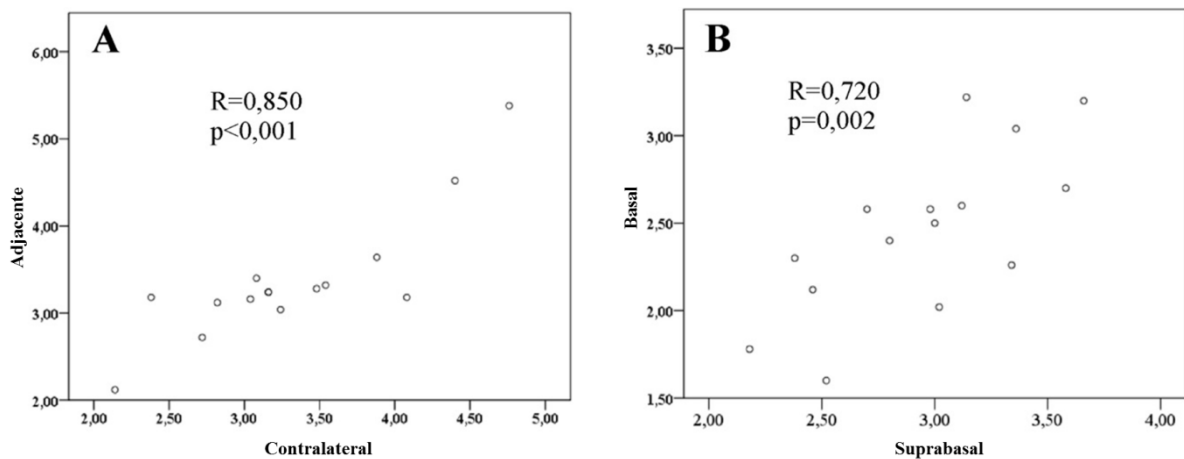


Quadro 2 – Avaliação da correlação entre as quantificações das AgNORs (mAgNOR) nas camadas basal e suprabasal das lesões biopsiadas e em células esfoliadas da mucosa adjacente a lesão e contralateral de pacientes portadores de leucoplasia bucal

		Supra	Basal	Adj	Contra
Supra	Correlação de Pearson	1	<b>,720**</b>	,308	,311
	Sig (2-tailed)		<b>,002</b>	,264	,259
	N	15	<b>15</b>	15	15
Basal	Correlação de Pearson		1	,138	
	Sig (2-tailed)			,623	
	N		15	15	
Adj	Correlação de Pearson		,138	1	
	Sig (2-tailed)		,623		
	N		15	15	
Contra	Correlação de Pearson		,170	<b>,852**</b>	
	Sig (2-tailed)		,544	<b>,000</b>	
	N		15	<b>15</b>	

\*\* Correlação estatisticamente significativa ( $p=0.01$ ). Adj – mucosa adjacente, Contra – mucosa contralateral, Basal – células da camada basal do tecido epitelial, Supra – células da camada suprabasal do tecido epitelial.  
Fonte: da autora

Gráfico 1 – Gráficos de dispersão, mostrando a existência de correlação entre os valores de mAgNOR entre células esfoliadas da mucosa adjacente e contralateral (A) e entre as células da camada basal e da camada suprabasal do epitélio de leucoplasias (B)



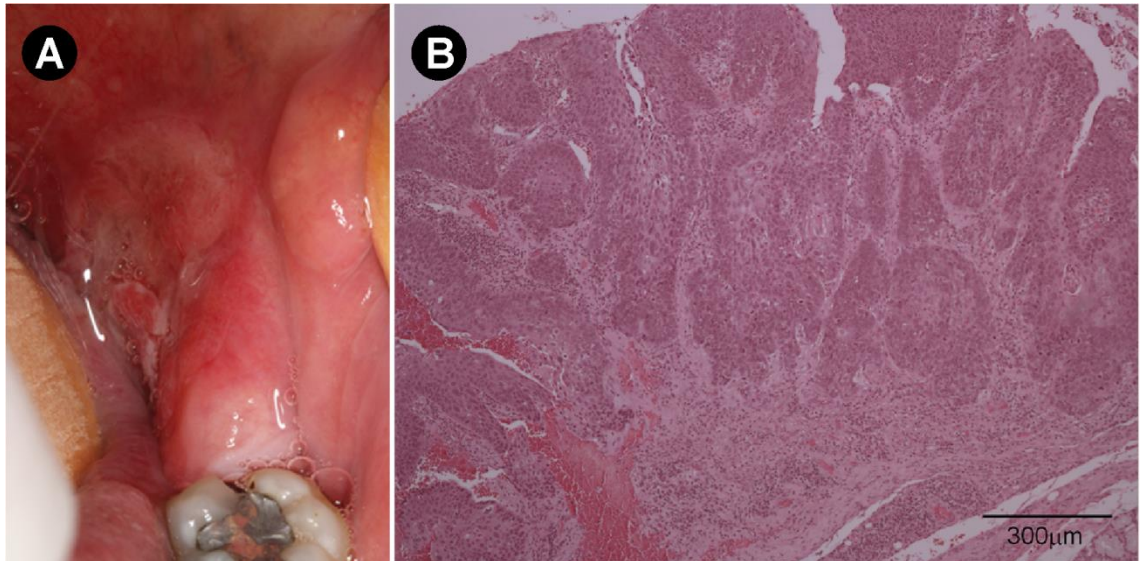
Fonte: da autora

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo enfocou na utilização da citopatologia como uma forma de controle do paciente com leucoplasia. Sabe-se que a maior limitação deste método em casos de leucoplasias encontra-se no fato de que a amostra obtida apresenta poucas células em função do aumento da camada de ceratina típico destas lesões (MEHROTRA et al., 2009) . Em função disto, admite-se que a possibilidade de obtenção de células passíveis de serem estudadas é maior para campos cancerizáveis não visíveis clinicamente, por não serem hiperkeratóticos (BREMMER et al., 2009), o que justifica a abordagem proposta pelo presente estudo. Além disso, propomos a avaliação das células da mucosa contralateral, a fim de avaliar a ocorrência de lesões em sítios distantes de onde as lesões foram detectadas em um primeiro momento. Observou-se correlação forte entre proliferação celular na mucosa adjacente e na mucosa contralateral. Isto indica que o indivíduo com histórico de leucoplasia deve ser considerado de alto risco, não apenas na lesão propriamente dita ou sítio anatômico afetado por ela. Essa constatação encontra suporte e reforça a teoria do campo de cancerização.

Além disso, a teoria do campo de cancerização pode ser suportada a partir do caso de um paciente acompanhado neste estudo. O referido paciente ingressou no programa de acompanhamento após remoção total de uma lesão em palato mole com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial. Houve acompanhamento clínico, no qual não foram observadas novas lesões por um período de um ano e seis meses. No entanto, após dois anos, foi constatada uma lesão ulcerada em mucosa retromolar do lado oposto ao da lesão prévia, a qual foi diagnosticada como carcinoma espinocelular após biópsia parcial e exame histopatológico (Figura 8).

Figura 8 – Imagem clínica e histopatológica de paciente ex-fumante (havia parado há 7 meses, consumidor de álcool) que havia apresentado leucoplasia em mucosa do palato lado direito, a qual tinha sido submetida à biópsia total com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial e em consulta de acompanhamento (2 anos depois) apresentou lesão ulcerada em mucosa retromolar, a qual foi submetida à biópsia parcial (A). Diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular. Técnica de coloração da HE (B), aumento original de 100x



Fonte: Patologia Bucal/UFRGS.

Outro resultado interessante foi não ter havido correlação entre a avaliação da proliferação por meio da citopatologia e do tecido biopsiado. Várias razões poderiam explicar esta ausência de correlação.

As células esfoliadas da mucosa bucal coletadas por meio da citologia esfoliativa são células 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; WIGHT, 1997; EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002). A biópsia, diferentemente, permite que essas células mais profundas sejam analisadas. Acreditamos que esse possa ser um dos motivos pelo qual não houve correlação de proliferação celular entre as diferentes técnicas. Além disso, a citologia esfoliativa possibilita a avaliação de todo o núcleo da célula (MAO, 1995), enquanto na lâmina produzida a partir da biópsia estuda-se um corte histológico, permitindo observação de um único plano do núcleo. Dessa forma, impossibilita a quantificação de todas AgNORs e isso favorece uma contagem mais baixa.

Há evidências na literatura de que as células da camada suprabasal são responsáveis pelo aumento da proliferação celular como resposta a um agente irritativo. Em situações como esta, as células da camada basal não apresentariam alterações, pois, fisiologicamente, já estão em constante divisão. Portanto, na medida em que é necessária maior reposição celular,

parece que as células da camada suprabasal, seriam as responsáveis pelo aumento do ritmo proliferativo (HOMANN et al., 1997; CARRARD et al., 2004). De acordo com alguns autores a camada suprabasal é a que mais favorece a identificação de alterações na proliferação celular (LIU et al., 1998; TAKEDA et al., 2006; OLIVER; MACDONALD; FELIX, 2000; HILDEBRAND et al., 2010). Esses resultados estão de acordo com os apresentados na tabela 4, onde tanto mAgNOR quanto pAgNOR são maiores na camada suprabasal quando comparados com a camada basal.

Embora não tenha sido encontrada correlação entre a avaliação por meio da citologia e a avaliação da lesão propriamente dita, acreditamos na utilidade da citologia esfoliativa associada à quantificação das AgNORs como forma de monitoramento de pacientes que tenham apresentado leucoplasias. Esta indicação se sustenta nos resultados deste estudo em comparação com resultados de estudos realizados anteriormente (Tabela 5). Ao comparar células esfoliadas da mucosa clinicamente normal de pacientes controle (pacientes que não fumam e não bebem), com pacientes fumantes, pacientes que fumam e consomem bebidas alcoólicas e pacientes que apresentam leucoplasia, observa-se um progressivo aumento da taxa proliferativa usando a quantificação das AgNORs. Além disso, Gedoz et al. (2007) corroboram esta indicação, pois foram capazes de detectar aumento da taxa proliferativa nas células esfoliadas da mucosa clinicamente normal de fumantes avaliados longitudinalmente com esta técnica, o que pode ser um indicativo de progressão tumoral em estágio subclínico.

Tabela 5 – Comparação dos valores de AgNORs em mucosa clinicamente normal e em mucosa adjacente e contralateral de pacientes portadores de leucoplasia

	mAgNOR Média (DP)	pAgNOR>3 Média (DP)	mAgNOR Média (DP)	pAgNOR>3 Média (DP)
<b>Mucosa clinicamente Normal</b>		Língua	Assoalho	
GC*	2,22 (0,43)	12,26 (8,77)	2,87 (0,58)	28,71 (17,19)
GF*	2,78 (0,51)	27,18 (13,24)	3,48 (0,59)	43,23 (18,68)
GFA*	2,90 (0,48)	29,16 (12,10)	3,57 (0,60)	46,94 (18,60)
<b>Leucoplasia</b>		<b>Diferentes sítios</b>		
GL-CL**	3,33 (0,72)	41,73 (21,19)	3,33(0,72)	41,73 (21,19)
GL-AL**	3,37 (0,74)	39,33 (18,88)	3,37 (0,74)	39,33(18,88)

GC: grupo controle, GF: grupo fumo, GFA: grupo fumo-álcool, GL-CL: mucosa contralateral, paciente com leucoplasia, GL-Adj: mucosa adjacente à leucoplasia, paciente com leucoplasia

\*Paiva et al (2004), \*\*presente estudo.

Em estudo prévio deste grupo, Pellicoli et al. (2011), encontraram uma maior frequência de micronúcleos na mucosa contralateral de pacientes com leucoplasia e com carcinoma quando comparadas com a mucosa dos pacientes controles e dos que consumiam tabaco e álcool. Esses resultados indicam a ocorrência de mais quebras de DNA nestes tecidos, embora clinicamente não haja alterações, o que corrobora os resultados do presente estudo e, mais uma vez, enfatiza a teoria do campo de cancerização.

Outro aspecto que chama a atenção é a heterogeneidade dos pacientes da presente amostra com relação ao perfil de exposição ao fumo e a bebidas alcoólicas. A partir de análise da tabela 1, constata-se que 8 pacientes eram fumantes, 4 eram ex-fumantes e 2 nunca haviam fumado. Além disso, 9 pacientes consumiam bebidas alcoólicas, 4 haviam parado e 1 nunca tinham consumido. Essa heterogeneidade prejudica a avaliação, pois os diferentes padrões de exposição dificultam o agrupamento dos pacientes com características comuns.

## **6 CONCLUSÃO**

Não há correlação entre a avaliação da proliferação a partir das células esfoliadas da mucosa adjacente ou da mucosa contralateral e a avaliação da proliferação no tecido biopsiado. A identificação de correlação entre proliferação celular na mucosa adjacente à leucoplasia e na mucosa contralateral indica que o indivíduo com histórico de leucoplasia deve ser considerado de alto risco, não apenas na lesão propriamente dita ou sítio anatômico afetado por ela, o que está de acordo com a teoria do campo de cancerização.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar de não ter sido encontrada correlação entre os parâmetros estudados, a citologia parece ser útil no monitoramento do paciente com leucoplasia, a partir do qual as variações na taxa proliferativa podem ser identificadas, o que justificaria um controle mais rígido do paciente.

## REFERÊNCIAS

- AMAGASA, T.; YAMASHIRO, M.; UZAWA, N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. **Int. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v. 16, no. 1, p. 5-14, 2011.
- BÁNÓCZY, J.; RIGO, O. Comparative cytologic and histologic studies in oral leukoplakia. **Acta. Cytol.**, Chicago, v. 20, no. 4, p.308-312, 1976.
- BÁNÓCZY, J.; GINTNER, Z.; DOMBI, C. Tobacco use and oral leukoplakia. **J. Dent. Educ.**, Washington, v. 65, no. 4, p. 322-327, 2001.
- BARNES, L. et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. **IARC Press**, Lyon, v. 4, p. 177-179, 2005.
- BOHRER, P.L. et al. Assesment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. **Acta. cytol.**, Chicago, v. 49, no 3, p. 265-272, 2005.
- BREMMER, J.F. et al. Screening for Oral Precancer with Noninvasive Genetic Cytology. **Cancer Prev. Res.**, Philadelphia, v. 2, no. 2, p. 128-133, 2009.
- CALIFANO, J. et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. **Cancer Res.**, Chicago, v. 56, no. 11, p. 2488-2492, 1996.
- CAMPOS FONTES, P. et al. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 30, no. 1, p. 16-24, 2008.
- CANÇADO, R.P.; YURGEL, L.S.; SANT'ANNA FILHO, M.S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 5, p. 446-454, 2001.
- CARRARD, V.C. et al. Quantification of silver staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. **Alcohol**, Fayetteville, v. 34, no. 2-3, p. 233-238, 2004.
- CARRARD, V.C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Dis.**, Houndmills, v.17, no. 2, p. 171-179, 2010.
- CHIESA, F. et al. Risk of Preneoplastic and Neoplastic Events in Operated Oral Leukoplakias. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, Oxford, v. 29B, no. 1, p. 23-28, 1993.
- CHUNG, C.H. et al. Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, no. 8, p. 460-466, 2005.
- COWAN, C.G. et al. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population based perspective of malignant transformation. **Oral Dis.**, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, v. 7, no. 1, p. 18-24, 2001.



DAGLI, R.J. et al. Prevalence of leukoplakia, oral submucous fibrosis, papilloma and its relation with stress among green marbles mine laborers, India. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v.13, no.11, p. E687-692, 2008.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cell proliferation in cancer tissue. **J. Pathol.**, London, v. 191, no. 2, p.181-186, 2000.

DIETRICH, T.; REICHART, P.; SCHEIFELE, C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, no. 2, p. 158–163, 2004.

EINHORN, J.; WERSALL, J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of oral mucosa. **Cancer**, New York, v. 20, no.12, p. 2189–2193, 1967.

EPSTEIN, J.B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 68, no. 10, p. 617-621, 2002.

GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. **Anal Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 29, no. 4, p. 231-238, 2007.

GREER, R.O. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. **Otolaryngol Clin. N. Am.**, Philadelphia, v. 39, no. 2, p. 249-275, 2006.

GUPTA, P.C.; WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of areca nut usage. **Addict. Biol.**, Abingdon, v. 7, no. 1, p. 77–83, 2002.

HASHIBE, M. et al. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 7, p. 664–671, 2003.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leukoplakia in an indian population. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 88, no. 1, p. 129–134, 2000.

HILDEBRAND, L.D. et al. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Valencia, v. 15, no. 2, p. e328-334, 2010.

HOLMSTRUP, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, no. 5, p. 461-467, 2006.

HOMANN, N. et al. Effects of acetaldehyde on Cell Regeneration and Differentiation of the Upper Gastrointestinal Tract Mucosa. **J. Natl. Cancer Instit.**, Bethesda, v. 89, no. 22, p. 1692-1697, 1997.

JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. **Oral Dis.**, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, v. 9, no. 6, p. 302–304, 2003.

JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I.; AXÉLL, T. Oral leukoplakia. **Oral Dis.**, [S.L.], v. 3, no. 1, p. 43-48, 1997.

KAUGARS, G.E. et al. Use of antioxidant supplements in the treatment of human oral leukoplakia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 81, no. 1, p. 5-14, 1996.

- KOVAC-KAVCIC, M.; SKALERIC, U. The prevalence of oral mucosal lesions in a population in Ljubljana, Slovenia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, no. 7, p. 331-335, 2000.
- KRAMER, R. H. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. WHO. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 46, no. 4, p. 518-539, 1978.
- KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, no. 10, p. 987-993, 2006.
- LEE, C.H. et al. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. **Br. J. Cancer**, London, v. 88, no. 3, p. 366-372, 2003.
- LIU, S. et al. Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 7, no. 7, p. 597-603, 1998.
- LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 79, no. 3, p. 321-329, 1995.
- MACIGO, F.G.; MWANIKI, D.L.; GUTHUA, S.W. The association between oral leukoplakia and use of tobacco, alcohol and khat based on relative risk assessment in Kenya. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 103, no. 5, p. 268-273, 1995.
- MACLUSKEY, M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 4, p. 409-414, 1999.
- MAO, E.J. 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.**, St. Louis, v. 80, no. 3, p. 320-329, 1995.
- MEHROTRA, R. et al. Oral cytology revisited. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 38, no. 2, p. 161-166, 2009.
- MISHRA, M. et al. Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, Vellore, v. 71, no. 3, p. 161-165, 2005.
- OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W. Quantitative exfoliative cytology of normal mucosa: effect of smoking. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, no. 2, p. 53-55, 1990.
- OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; WIGHT, A.J. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 26, no. 5, p. 201-205, 1997.
- OLIVER, R.J.; MACDONALD, D.G.; FELIX, D.H. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 29, no. 2, p. 49-55, 2000.
- ORELLANA-BUSTOS, A.I. et al. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. **Med Oral.**, Madrid, v. 9, no. 3, p. 197-203, 2004.

PAIVA, R.L. et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 26, no. 3, p. 175-180, 2004.

PELLICIOLI, A.C. et al. Cytogenetic abnormalities in exfoliated oral mucosal cells and their association with oral cancer. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 33, no. 5, p. 271-276, 2011.

PINDBORG, J.J. et al. Studies in oral leukoplakia. A preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 76, no. 4, p. 767-771, 1968.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.**, London, v. 18, no. 1, p. 5-14, 1986.

POGREL, M.A. Sublingual keratosis and malignant transformation. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 8, no. 3, p. 176-178, 1979.

RICK, G.M.; SLATER, L. Oral brush biopsy: the problem of false positives. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 96, no. 3, p. 252, 2003.

SAMPAIO, H.C. et al. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Acta. Cytol.**, Chicago, v. 43, no. 2, p. 117-1120, 1999.

SANDLER, H.C.; CAHN, L.R. Exfoliative Cytology for Detection of Early Mouth Cancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.13, no. 8, p. 994-1009, 1960.

SCHEPMAN, K.P. et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 4, p. 270-275, 1998.

SCHEPMAN, K.P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, Oxford, v. 32B, no. 6, p. 416-419, 1996.

SCHEPMAN, K.P. et al. Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 5, no. 3, p. 206-209, 1999.

SILVERMAN JUNIOR, S.; BECKS, H.; FARBER, S.M. The Diagnostic Value of Intraoral Cytology. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 37, no. 2, 195-205, 1958.

SILVERMAN JUNIOR, S. et al. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57518 industrial workers of Gujarat, India. **Cancer**, New York, v. 38, no. 4, p. 1790-1795, 1976.

SILVERMAN JUNIOR, S.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. **Cancer**, New York, v. 53, no. 3, p. 563-568, 1984.

TAKEDA, T. et al. Immunohistochemical evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. **J Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.35, no.6, p. 369-375, 2006.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 45, no. 4-5, p. 317-323, 2009.

VEDTOFTE, P. et al. Surgical treatment of premalignant lesions of the oral mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 16, no. 6, p. 656–664, 1987.

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**, New York, v. 79, no. 11, p. 2200-2208, 1997.

WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, New York, v. 36, no. 4, p. 1386-1392, 1975.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N.W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 36, no. 10, p. 575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification system: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 37, no. 3, p. 127-133, 2008.

WILLIAMS, P.M. et al. Evaluation of a suspicious oral mucosal lesion. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 74, no. 3, p. 275-280, 2008.

WRIGHT, A.; SHEAR, M. Epithelial dysplasia immediately adjacent to oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no.7, p. 559-564, 1985.

YANG ,Y.H. et al. Comparing dose–response measurements of oral habits on oral leukoplakia and oral submucous fibrosis from a community screening program. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 39, no. 4, p. 306–312, 2010.

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: **ACOMPANHAMENTO CLÍNICO LONGITUDINAL E MANEJO DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCOPLASIA BUCAL** será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo acompanhar ao longo do tempo os pacientes que tem, ou tiveram uma lesão chamada leucoplasia e quando necessário fazer uma biópsia para determinar por meio de um exame microscópico as alterações existentes nas células deste local. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, comparecer a consultas periódicas a cada 6 meses por tempo indeterminado, terá células coletadas de sua boca com uma escova para que a rapidez com que elas se dividem seja monitorada ao longo do tempo e a cada consulta a sua boca será fotografada para auxiliar na comparação da evolução da lesão. Além disso, a(s) lesão(ões) serão medidas com uma régua para avaliar se está havendo crescimento.

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 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: \_\_\_\_\_

Professor responsável por este estudo é: Dr. Pantelis Varvaki Rados, telefone: 51.3308.5011, telefone celular: 51.9821.1599.

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: 51.3316.3629

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_

### 1. Dados pessoais:

Nome: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_ Sexo: 1. F ( ) 2. M ( ) Data Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade (hoje): \_\_\_\_\_

End.: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Tel/Cel: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

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

Cor da pele: 1.( ) branco 2.( ) não branco Você é alfabetizado? 1.( )sim 2.( )não

Você estudou: 1.( ) nunca estudou 2.( )1-4 série 3.( )5-8 série 4.( )2º grau incompleto

5.( )2º grau completo 6.( )superior incompleto 7.( )superior completo

### 2. Fatores comportamentais:

#### Fumo

Não  Sim  Parou há \_\_\_\_ (meses,anos)

Tipo \_\_\_\_\_ Cig/dia \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

#### Chimarrão

Não  Sim

Temp. \_\_\_\_\_ Qtde/dia \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

Obs.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### Álcool

Não  Sim  Parou há \_\_\_\_ (meses,anos)

Tipo \_\_\_\_\_ Qtde/sem (ml) \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

Tipo \_\_\_\_\_ Qtde/sem (ml) \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

Tipo \_\_\_\_\_ Qtde/sem (ml) \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

#### Exposição solar (atual e anterior)

Não  Sim  Parou há \_\_\_\_ (meses,anos)

Tipo \_\_\_\_\_ Uso de protetor \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_ anos

Ocupacional  Não  Sim

Lazer FPS \_\_\_\_

## 2 Fatores psicossociais:

Nos últimos 3 anos você teve:

- Problema sério de saúde 1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
- Problema sério de saúde na família 1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
- Morte de alguém próximo 1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
- Outro problema que tenha lhe afetado 1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei

### **Em relação ao seu presente trabalho:**

Você está: 1.( ) empregado 2.( )desempregado 3.( )aposentado, do lar

Quantas horas você trabalha por semana: \_\_\_\_\_h Ocupação (se aposentado, a anterior):\_\_\_\_\_

Você esteve desempregado por mais de 3 meses nos últimos 3 anos: 1. ( )sim 2.( )não

Se esteve, por quanto tempo? \_\_\_\_\_ meses

### Você acha que os ganhos mensais da sua família:

- 1. ( ) não são suficientes para pagar as contas
- 2.( ) são suficientes apenas para pagar as contas
- 3.( ) são suficientes para pagar as contas e economizar um pouco

Você considera sua qualidade de vida: 1. ( )muito ruim 2.( )ruim 3.( ) razoável 4.( )boa  
5.( ) muito boa

### Nível Socioeconômico

Quanto você recebe por mês? 1. ( ) até 1SM 2.( ) 1-2SM 3.( ) 2-3SM 4.( ) 4-5SM  
5.( ) 5-10SM 6. ( ) 10-20SM 7.( ) +20 8.( ) não respondeu 9.( ) não recebe salário

### Quantos.... você possui:

TV colorida 1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( )  
quatro ou +

Rádio 1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( )  
quatro ou +

Banheiro 1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( )  
quatro ou +

Carro 1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( )  
quatro ou +



Empregada mensalista	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +
Aspirador de pó	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +
Máquina de lavar	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +
Vídeo cassete ou DVD	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +
Geladeira	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +
Freezer indep ou geladeira duplex	1. ( ) não possui 2.( )um 3.( ) dois 4.( ) três 5.( ) quatro ou +

Quantas pessoas dependem economicamente de você: \_\_\_\_ Quantas pessoas moram com você: \_\_\_\_\_

### **História médica**

Diabetes	1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
Asma, alergia a alimentos, pó	1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
Doença cardíaca/renal	1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
Artrite	1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei
Outro problema de saúde Qual?	1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei

---

Você está usando alguma medicação? 1. ( )sim 2.( )não 3.( ) não sei

Qual (nome, posologia)?

---



---

Há histórico de câncer na família? 1. ( )sim 2.( )não Quem/tipo?

---

**Hábitos de higiene / Condições bucais:**

Com que frequência você escova os dentes? 1. ( ) 1x/dia 2.( ) 2x/dia 3.( ) 3x/dia 4.( ) +3x/dia 5.( ) não escova

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

O que você usa para limpar seus dentes? 1. ( )nada 2.( ) palito 3.( ) fio dental 4.( ) outro

Você usa algum produto para bochecho? 1. ( )sim 2.( )não Qual? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Com que frequência? \_\_\_\_\_

Quando iniciou o uso? 1 ( ) antes do diagnóstico de leucoplasia 2 ( ) depois do diagnóstico de leucoplasia

Quando foi a última vez que foi ao dentista? 1.( )há muitos anos 2.( )há 1-3 anos 3.( ) há menos de 1 ano 4.( ) não lembra 4.( ) nunca visitou

**Percepção das condições bucais:**

Nos últimos 12 meses, você teve:

Mau hálito, gosto ruim	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Dor de dente	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Dentes frouxos	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Sensação de apertamento	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Sensação de boca seca	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Dor enquanto escova	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Feridas na gengiva	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca
Sangramento na gengiva	1. ( )com frequência	2.( )às vezes	3.( ) raro	4.( ) nunca

**Exame bucal:****CPO-D**

0=sadio 2=restauração com cárie 4=ausente por cárie 6=selante 8=trauma  
 1=cárie 3=restauração sem cárie 5=ausente por outra razão 7=pilar de prótese fixa 9=não examinado

Dentes perdidos(n): \_\_\_\_

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

**Uso de prótese**

Não  Sim Tipo: \_\_\_\_\_ Condições: \_\_\_\_\_

Tempo de uso \_\_\_\_ anos Última troca \_\_\_\_ (meses, anos)

Remove para dormir

Não  Sim

**Estado dentário**

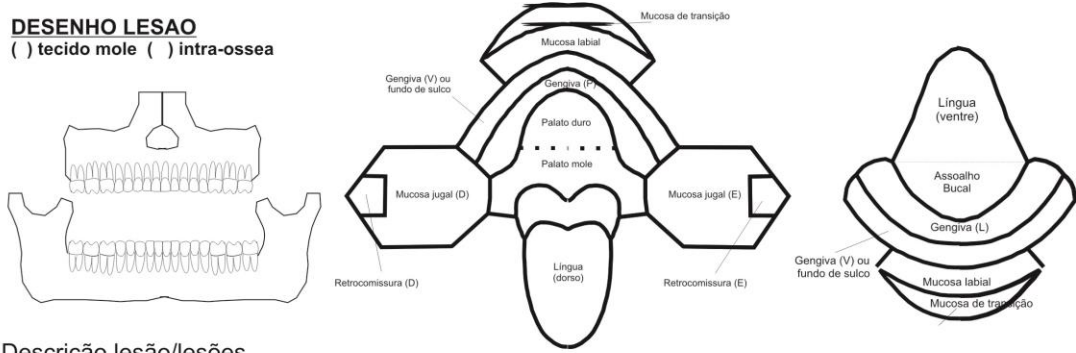
Pobre (raízes residuais, vários dentes perdidos e doença periodontal avançada)

Bom (algumas restaurações, sem cárie)

Regular (presença de cárie e tártaro, mas poucos dentes perdidos)

Muito bom (ausência de cáries, restaurações ou tártaro)

**DESENHO LESAO**  
 ( ) tecido mole ( ) intra-ossea



Descrição lesão/lesões

Lesão	L1	L2	L3
Tamanho (cm)			
Lesão fundamental			
Cor			
Consistência			
Superfície			
Tipo			
Limites			
Duração			
Tratamento prévio			
Diagnóstico clínico			
Conduta			

Biópsia(s) prévia(s)

Data	Tipo	Localização	Número	DHP

Nova(s) Biópsia(s)

Data	Tipo	Localização	Número	DHP

Nova(s) Biópsia(s)

Data	Localização	Número (s)

## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

**Número:** 17910

**Título:** Acompanhamento clínico longitudinal e manejo de pacientes portadores de leucoplasia bucal.

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

PANTELIS VARVAKI RADOS - coordenador desde 01/03/2011  
VINICIUS COELHO CARRARD - pesquisador desde 01/03/2011  
LAURA DE CAMPOS HILDEBRAND - pesquisador desde 01/03/2011  
FRANCINNE MIRANDA DA ROSA - pesquisador desde 01/03/2011  
ISABEL DA SILVA LAUXEN - Laboratorista desde 01/03/2011  
ISADORA PERES KLEIN - Aluno de Graduação desde 01/03/2011

**Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo , em reunião realizada em 28/04/2011 - Sala de reuniões do Gabinete do Reitor - 6º andar do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.**

Porto Alegre, Terça-Feira, 27 de Março de 2012



JOSE ARTUR BOGO CHIES  
Coordenador da comissão de ética

## **ANEXO B – TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PARTE DAS AgNORs\***

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

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

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

### ANEXO C – TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE AgNOR

Esta técnica de AgNOR foi desenvolvida baseada na técnica descrita por Ploton et al (1986) e seguiu os seguintes passos:

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

A técnica foi adaptada para lesão Ceratocisto Odontogênico por Isabel Lauxen e Márcia Oliveira. 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).