

AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL NORMAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS E ADJACENTE A CARCINOMA ESPINOCELULAR

Ana Carolina Amorim Pellicoli

Acadêmica da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcellos, 2492

Porto Alegre – Brasil

anacarolinapellicoli@yahoo.com.br

Dr. Pantelis Varvaki Rados

Professor da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcellos, 2492

Porto Alegre – Brasil

pantelis@ufrgs.br

Departamento de Patologia Bucal

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre – Brasil

1

¹ Este artigo está dentro das normas da Revista Cytopathology para futura submissão à publicação.

RESUMO

Objetivo: avaliar as alterações genotóxicas, através da análise de micronúcleos (MN) bem como a presença de outras alterações nucleares (*broken eggs* e cariorrexe), em mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos expostos aos carcinógenos (fumo e álcool) e adjacente a lesões leucoplásicas e carcinoma espinocelular. *Materiais e Métodos:* avaliou-se vinte e oito indivíduos do sexo masculino com idade superior a 30 anos os quais foram divididos em grupo controle (GC, n=4), grupo álcool/fumo (GAF, n=6), grupo leucoplasia (GL, n=12) e grupo carcinoma espinocelular (GCE, n=8). Nos pacientes do GC e GAF, a coleta citopatológica, foi realizada nos sítios anatômicos do lábio inferior, borda da língua e assoalho de boca. Os sítios anatômicos avaliados no GL e GCE foram áreas de mucosa bucal normal contra-lateral e adjacente à lesão. Os raspados citológicos foram corados pela técnica de Feulgen. A análise foi realizada por um observador cego. Foram avaliadas 1000 células por lâmina considerando a presença de micronúcleos, *broken eggs* e cariorrexe. *Resultados:* observou-se uma tendência de aumento do número de MN nos grupos GAF (rank médio=34,09; $p=0,019$), GL (rank médio=49,49) e GCE (rank médio=55,50) respectivamente, sendo que no grupo GAF a contagem de MN foi significativamente menor do que nos grupos GL e GCE. *Conclusão:* É possível concluir com base nos achados deste estudo que o dano genético é progressivamente mais alto desde os indivíduos expostos até o carcinoma espinocelular.

Keywords: câncer bucal, mucosa bucal, micronúcleos, citopatologia.

INTRODUÇÃO

O câncer bucal é uma doença que apresenta alta incidência segundo o INCA no Brasil para 2010. Segundo essa estimativa serão 10.330 novos casos entre homens e 3.790 entre mulheres¹. Dessa forma, há a necessidade da implementação de programas de prevenção e diagnóstico precoce para a detecção de alterações incipientes da mucosa bucal, bem como monitoramento dos fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer.

O carcinoma espinocelular e as lesões cancerizáveis apresentam agentes causadores intrínsecos e extrínsecos. Sendo que os fatores extrínsecos incluem o fumo de tabaco, o álcool e a luz solar, a qual influencia principalmente a mucosa do lábio inferior. Além do lábio inferior, as regiões mais acometidas por essas patologias são a borda de língua e o assoalho de boca².

Segundo Andrade, uma alternativa na prevenção do câncer bucal é a utilização de marcadores biológicos intermediários - micronúcleos – que sinalizam um processo de agressão ao organismo³. Através desse método não invasivo, pode-se avaliar o grau de exposição da mucosa bucal a carcinógenos.

Os micronúcleos são corpos extranucleares constituídos por cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo principal durante a mitose⁴ e são utilizados para avaliar danos cromossômicos numéricos e estruturais⁵.

O aumento na frequência de micronúcleos tem sido relacionado à exposição aos carcinógenos⁶ e às lesões cancerizáveis⁷. Dessa forma, existe a possibilidade de que a presença de micronúcleos seja uma alteração precursora ao câncer⁸.

Outras duas alterações metanucleares que também estão relacionadas a carcinogênese são o *broken egg* e a cariorrexe⁹. Segundo Ramires o *broken egg* constitui uma alteração nuclear, associada a uma resposta adaptativa da célula frente à ação de um agente clastogênico, quando essa ação se intensifica o fio Feulgen-positivo se rompe formando um micronúcleo¹⁰. Já a cariorrexe é uma alteração celular que envolve a fragmentação e degeneração do núcleo, levando à morte celular.

Sendo assim, esse trabalho visa avaliar as alterações genotóxicas, através da análise de micronúcleos (MN) bem como a presença de outras alterações nucleares (*broken eggs* e cariorrexe), em mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos expostos aos carcinógenos (fumo e álcool) e adjacente a lesões leucoplásicas e carcinoma espinocelular

MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento do estudo foi observacional, transversal, clínico com relação de associação.

O projeto de pesquisa, sob o número 53/05 de 14/03/2006, foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PARTICIPANTES DO ESTUDO

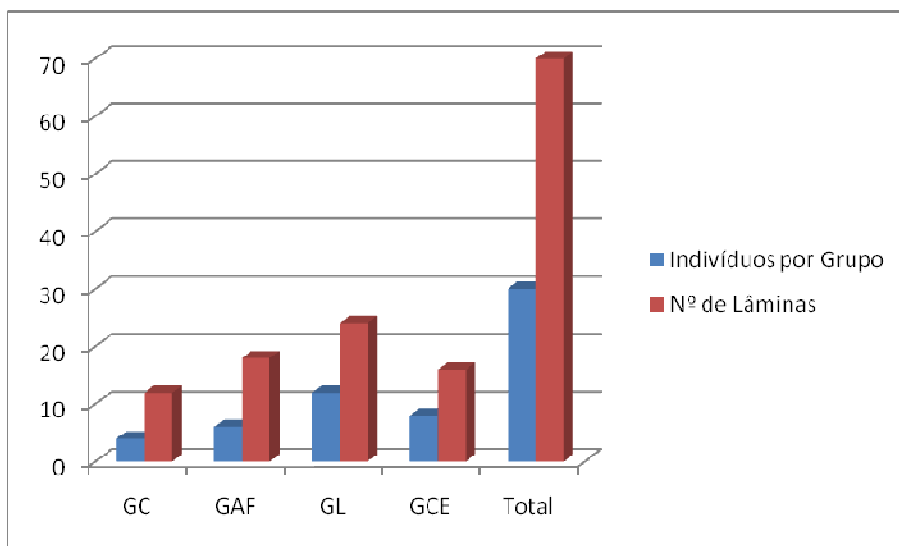
A amostra foi constituída de 30 pacientes divididos nos 4 diferentes grupos: grupo controle (GC), contendo 4 pacientes; grupo álcool/fumo (GAF), contendo 6 pacientes; grupo leucoplasia (GL), contendo 12 pacientes; e grupo carcinoma espinocelular (GCE), contendo 8 pacientes. Os grupos GC e GAF totalizando 12 e 18 amostras respectivamente, conforme os sítios anatômicos observados (lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal). Os grupos GL e GCE totalizando 24 e 16 amostras respectivamente, conforme os sítios anatômicos observados (adjacente à lesão e contra-lateral à lesão) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados relativos ao valor da amostra e dados de distribuição de cada grupo de acordo com o número de sítios anatômicos. Sendo nos grupos sem lesão (GC e GAF) lábio inferior, borda de língua e soalho bucal; e nos grupos com lesão (GL e GCE) adjacente e contra-lateral a lesão.

	Número total da Amostra	Número de sítios analisados em cada grupo
Grupo Controle	4	12
Grupo Álcool/Fumo	6	18
Grupo Leucoplasia	12	24
Grupo Carcinoma Espinocelular	8	16
TOTAL	30	70

Porto Alegre, 2009

Gráfico 1. Dados relativos ao número de indivíduos por grupo e ao número de lâminas por grupo de acordo com os sítios anatômicos analisados.



COLETA DA AMOSTRA

Os indivíduos deste estudo foram selecionados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Serviço de Estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE).

Após a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos pacientes, realizou-se uma entrevista referente aos seus hábitos e exame físico.

Os critérios de inclusão deste estudo foram: sexo masculino, idade superior a 30 anos, ausência de lesão bucal clinicamente visível, com exceção do carcinoma espinocelular e da leucoplasia.

O Grupo Controle (GC) foi constituído por pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que bebiam, em média, menos de uma dose de bebida alcoólica por dia. Segundo Tezal, 340 ml de cerveja, 113 ml de vinho e 28 ml de destilados contêm a mesma quantidade aproximadamente de etanol¹¹.

O Grupo Álcool e/ou Fumo (GAF) foi constituído por 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 anos¹² associado ou não ao consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica foi caracterizado

pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia segundo o indicado por (Tezal, Grossi et al. 2001), por no mínimo um ano.

O Grupo Leucoplasia (GL) foi constituído por pacientes que apresentavam leucoplasias na mucosa bucal.

Os pacientes com carcinomas espinocelulares constituíram o Grupo Carcinoma Espinocelular (GCE). Para essas lesões foi realizada a biópsia sob anestesia local. O material obtido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10%, processado pela técnica de rotina do Laboratório J. J. Barbachan da Faculdade de odontologia da UFRGS para inclusão em parafina e corado por hematoxilina e eosina (H&E). A biópsia incluiu área de lesão e área de mucosa adjacente normal para permitir o procedimento de sutura. Previamente à biópsia foi realizada a coleta de material para exame citológico da mucosa adjacente ao tumor. Os carcinomas espinocelulares e as leucoplasias foram diagnosticados com base na análise das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

O método de coleta citopatológica foi a raspagem utilizando-se uma escova citológica dos locais: borda de língua, mucosa do lábio inferior, mucosa do assoalho de boca para os grupos GC e GAF, para os grupos GL e GCE foram raspadas a mucosa adjacente à lesão e a mucosa contra-lateral à lesão. Após a coleta a escova era colocada em um frasco do tipo eppendorf, contendo como solução fixadora álcool 96°GL.

No laboratório, as lâminas foram identificadas com o número de registro do paciente. Após, os tubos contendo a escova citológica em seu interior foram individualmente colocados no vortex (Phoenix, AP – 56, Araraquara – Brasil) em velocidade máxima por 10 segundos. Girando lentamente a escova citológica sobre o centro da lâmina histológica o material foi dispensado sobre essa lâmina uniformemente. Após, a lâmina histológica permaneceu sobre placa aquecida a 37°C até a secagem completa do material. As lâminas foram armazenadas em álcool a 96% até que se procedesse a reação de Feulgen.

AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas coradas pela reação de Feulgen serviram para a avaliação da frequência de micronúcleos. Sendo analisadas 1.000 células bem distendidas e isoladas entre si em cada esfregaço. As células que apresentassem alterações degenerativas foram descartadas (cariólise, picnose ou fragmentação nuclear). Os núcleos foram avaliados em um aumento de 400x, segundo critérios de Tolbert *et al.*, e quando fossem localizadas células micronucleadas, estas foram avaliadas em um aumento de 1.000x, sob imersão, para confirmar a presença do micronúcleo¹³.

Os micronúcleos foram quantificados quando fosse possível observar os seguintes critérios: estrutura e intensidade de coloração da cromatina similar ou mais fraca que o núcleo principal; bordas nítidas, sugerindo a presença de membrana; estruturas arredondadas e incluídas no mesmo citoplasma do núcleo principal e não ultrapassar em 1/5 do maior diâmetro do núcleo principal¹⁴.

Além disso, foram quantificadas outras alterações nucleares presentes nos esfregaços corados pela reação de Feulgen, como o número de células em cariorrexe (Figura 2) e de “*broken eggs*” (Figura 3) presentes em 1.000 células.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos dados relativos à mediana dos valores de micronúcleos (MN), broken eggs (BE) e cariorrexe (CR) para os sítios lábio inferior (LI), borda de língua (BL) e assoalho bucal (AB) nos grupos controle (GC) e álcool/fumo (GAF) e sítios adjacente (Adj) e contra-lateral (CL) nos grupos leucoplasia (GL) e carcinoma espinocelular (GCE)

Através do teste não-paramétrico de Kruskal Wallis foram analisados os dados relativos ao Rank Médio dos valores de micronúcleos (MN), broken eggs (BE) e cariorrexe (CR) para os grupos controle (GC), álcool/fumo (GAF), leucoplasia (GL) e carcinoma espinocelular (GCE).

A análise não-paramétrica foi escolhida devido à distribuição não-homogênea dos dados. Para análise dos dados utilizou-se os programas SPSS 17 e BioEstat 2.0.

Com os dados de idade, foram comparados os 4 grupos através de uma análise da variância, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises foram feitas no programa SAS for Windows, v.9.2.

RESULTADOS

A média de idade dos indivíduos que participaram desse estudo foi de 54,096 anos (DP= 12,256). A média de idade nos diferentes grupos foi de 48,6 (DP= 13,366) no grupo GC; 52,642 (DP= 11,760) no grupo GAF; 61,4 (DP= 10,379) no grupo GL; e 57,3 (DP= 5,417) no grupo GCE (Tabela 1).

Comparando as idades para os quatro grupos, a análise da variância mostrou um efeito significativo ($p=0,003$). Aplicando o teste de Tukey, houve diferença significativa do grupo GC em relação ao grupo GL. As demais comparações não foram significativas.

Tabela 1. Dados relativos à média de idade e desvio padrão.

Média de Idade e Desvio Padrão	
Grupo Controle	48,6 (DP= 13,366) ^b
Grupo Álcool/Fumo	52,642 (DP= 11,760) ^{ab}
Grupo Leucoplasia	61,4 (DP= 10,379) ^a
Grupo Carcinoma Espinocelular	57,3 (DP= 5,417) ^{ab}
TOTAL	54,096 (DP= 12,256)

*** a, b: letras diferentes indicam $p \leq 0,003$

Tabela 2. Dados relativos à mediana dos valores de micronúcleos (MN), broken eggs (BE) e cariorrexe (CR) para os sítios lábio inferior (LI), borda de língua (BL) e assoalho bucal (AB) nos grupos controle (GC) e álcool/fumo (GAF) e sítios adjacente (Adj) e contra-lateral (CL) nos grupos leucoplasia (GL) e carcinoma espinocelular (GCE)

	GC			GAF			GL		GCE	
	LI	BL	AB	LI	BL	AB	Adj	CL	Adj	CL
MN	0	1	0	0	0	0	1	1	3	1
BE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
CR	4	2	0	2	0	0	0	1	0	0

Através do teste não-paramétrico Mann-Whitney não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos sítios (LI, BL, AB, Adj e CL) em nenhum dos grupos analisados (GC, GAF, GL, GCE) (Tabela 2).

Tabela 3. Dados relativos ao Rank Médio dos valores de micronúcleos (MN), broken eggs (BE) e cariorrexe (CR) para os grupos controle (GC), álcool/fumo (GAF), leucoplasia (GL) e carcinoma espinocelular (GCE)

	Rank Médio			
	GC	GAF	GL	GCE
MN	39,48 ^{ab}	34,09 ^a	49,49 ^b	55,50 ^b
BE	45,44 ^{ab}	33,93 ^a	44,78 ^b	50,45 ^b
CR	46,98 ^{ab}	38,39 ^{ab}	43,48 ^{ab}	36,70 ^{ab}

*** a, b: letras diferentes indicam $p \leq 0,05$

Através do teste não-paramétrico de Kruskal Wallis complementado pelo seu teste de comparações múltiplas, ao nível de significância de 5%, verificou-se que no grupo GAF a contagem de MN foi significativamente menor do que nos grupos GL e GCE. Através dos mesmos testes verificou-se que no grupo GAF a contagem de BE foi significativamente menor do que no grupo GCE. Já para a alteração celular do tipo CR não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A utilização de marcadores biológicos intermediários como os MN consiste em uma abordagem bastante utilizada para a análise de danos citogenéticos. Esse marcador contém material genético que não foi incorporado ao núcleo principal durante o processo de mitose devido à ação de agentes aneugênicos ou clastogênicos¹⁵.

A quantificação de células micronucleadas é empregada na detecção de agentes mutagênicos ou carcinogênicos e também no monitoramento de indivíduos expostos a carcinógenos, como álcool e fumo^{15, 16, 17}. Além disso, é importante estudar biomarcadores de alterações celulares precoces e/ou prévias ao aparecimento de lesões clínicas¹⁸, pois monitorar o aparecimento de lesões em grupos específicos, denominados grupos de risco, é uma maneira efetiva de prevenir o câncer¹⁹.

Além disso, é importante deixar claro que determinadas áreas da cavidade bucal, como o lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal, apresentam maior prevalência para o desenvolvimento de lesões cancerizáveis e malignas¹⁵. No entanto, todo o epitélio de revestimento da cavidade bucal altera-se frente à ação de agentes agressores, fumo e álcool.

No grupo GCE, quando analisados sítios específicos (adjacente e contra-lateral a lesão) observou-se que o rank médio de MN foi maior no sítio adjacente. No entanto é extremamente importante detectar a presença de MN no campo contra-lateral, uma vez que mesmo após a excisão total da lesão maligna ainda há a possibilidade de desenvolvimento de novas lesões devido ao processo de cancerização de campo. Esta hipótese considera que ocorra a incorporação de alterações genômicas durante a progressão fenotípica numa população vasta de células formando um campo de células geneticamente alteradas, denominado campo de cancerização. A presença desse campo visa explicar a recorrência de um segundo tumor primário nos casos de câncer bucal. Essas células geneticamente modificadas proliferam-se e expandem-se constituindo um campo vulnerável a posteriores danos genéticos. Apesar de ser uma área clinicamente imperceptível, é uma área fértil para a ocorrência de lesões cancerizáveis ou até mesmo carcinomas²⁰.

Comparando os sítios anatômicos quantificados dos grupos GL e GCE o rank médio de micronúcleos se apresentou aumentada no grupo GCE. Esse aumento corrobora aos achados científicos de Casartelli nos quais o maior valor se encontra no grupo com lesão do tipo carcinoma espinocelular²¹.

Comparando a frequência de MN entre os grupos sem lesão (GC e GAF) e os grupos com lesão (GL e GCE) foi possível verificar que o rank médio de MN se apresentou aumentado nos indivíduos pertencentes aos grupos com lesão (Tabela 3). Esse dado está em concordância aos achados científicos, nos quais a frequência de MN se apresenta aumentada em indivíduos portadores de lesões cancerizáveis ou lesões já estabelecidas^{15, 22}. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, há uma tendência no aumento do dano genético em relação ao aumento da exposição a agentes carcinogênicos (GAF, GL e GCE). Devido a isso, cabe ressaltar a importância tanto de campanhas anti-tabagistas quanto do monitoramento individual de pacientes expostos a agentes carcinogênicos na tentativa de diminuir a prevalência dessa neoplasia.

Comparando os sítios anatômicos quantificados nos grupos GC e GAF o rank médio de micronúcleos se apresentou aumentado no grupo GC. Esse aumento vai de encontro aos achados científicos nos quais o maior valor se encontra no grupo exposto aos carcinógenos^{6, 14, 23}. Considerando que a ocorrência de MN seja um evento raro este estudo provavelmente não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes devido ao baixo número amostral²⁴. Esse resultado paradoxal encontrado também pode ser devido a outros fatores como trauma e herpes que podem ter contribuído com esses achados, frente a isso seria interessante incluir como critério de inclusão dos grupos GC e GAF a ausência de lesão recente de qualquer espécie na tentativa de minimizar a influência desses fatores nos resultados.

No presente estudo, seguindo o protocolo de Tolbert, além da quantificação de MN, também foram quantificados a presença de células em cariorrexe e o número de *broken eggs*⁹. Quando analisado o número de *broken eggs* foi possível observar que no grupo GAF a contagem de BE foi significativamente menor dos que nos grupos GL e GCE. Esse achado se sustenta através dos achados de Ramirez, no qual ele afirma que essa alteração possa representar uma primeira alteração nuclear frente à ação de

um agente clastogênico, e quando essa ação se intensifica o fio Feulgen positivo se rompe dando origem a um MN¹⁰. No entanto, esse achado vai de encontro aos achados de Bohrer no qual a freqüência de MN tem relação inversa com a freqüência de anomalias nucleares, ou seja, nos sítios onde a média de MN é alta a média de anomalias nucleares é baixa²³.

Considerando que o epitélio bucal está constantemente exposto a agentes agressores a formação de MN ou de anomalias nucleares estão relacionados com a resposta do organismo frente à determinada intensidade de agressão⁹. Com isso, frente a uma agressão de intensidade baixa a célula é capaz de reparar o dano genético e assim não passá-lo adiante em processos de divisão celular. Se a agressão for de intensidade moderada, os danos que não fossem reparados pela célula seriam eliminados através de mecanismos de morte celular como a cariorrexe e a apoptose. Já se a agressão fosse intensa, a célula não teria capacidade de reparar o dano e esse permaneceria, tendo como consequência a formação de MN⁶.

No presente estudo também foram quantificadas células em processo de cariorrexe. Quando comparado o rank médio de células em cariorrexe entre os grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. No entanto, nos grupos nos quais os indivíduos estão expostos a ação de carcinógenos (grupo GAF) ou então apresentam lesão (GL e GCE) foi possível observar que o rank médio dessa alteração foi aumentando gradualmente do grupo GAF ao grupo GL, diminuindo sua freqüência no grupo GCE. Isso poderia ser explicado porque no carcinoma, as células malignas, em função das mutações genéticas, desenvolvem mecanismos de sobrevivência onde a morte celular é inibida.

Comparando a média de CR entre os grupos GAF e GC observou-se maior freqüência dessa alteração no grupo GC, esse achado se opõe aos achados de Tolbert et al., no qual foi observada maior quantidade células em cariorrexe nas amostras de indivíduos fumantes quando comparado a indivíduos não fumantes¹³.

No presente estudo foi observada uma tendência ao aumento na freqüência de MN da lesão cancerizável para o carcinoma espinocelular. Sendo assim, este método pode ser uma ferramenta útil na identificação e no

monitoramento de indivíduos com risco aumentado de desenvolver câncer bucal.

CONCLUSÃO

É possível concluir com base nos achados deste estudo que os danos genotóxicos parecem ser cumulativos e progressivamente maiores dos indivíduos expostos aos indivíduos com carcinoma espinocelular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência de Câncer de Boca. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 01 maio 2010.
2. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquodt JE. Patologia Oral e Maxilofacial. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro; 1998.
3. Andrade MGS, Reis SRA, Robinson WN, Borges-Osório MR. Micronúcleo: Um Importante Marcador Biológico Intermediário na Prevenção do Câncer Bucal. Revista Odonto Ciência 2005; **20**: 137-141.
4. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 2000; **455**: 81-95.
5. Casartelli G, Monteghirfo S, De Ferrari M, Bonatti S, Scala M, Toma S, Margarino G, Abbondandolo A. Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. Analytical and quantitative cytology and histology 1997; **19**: 475-481.
6. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the Synergistic Effect of Smoking and Alcohol Consumption with the Micronucleus Test on Human Buccal Mucosa Cells. International Journal of Cancer 1983; **31**: 305-308.
7. Delfino V, Casartelli G, Garzoglio B, Scala M, Mereu P, Bonatti S, Margarino G, Abbondandolo A. Micronuclei and p53 accumulation in preneoplastic and malignant lesions of the head and neck. Mutagenesis 2002; **17**: 73-77.
8. Dietz J, Diehl AS, Prolla JC, Furtado CD, Furtado AD. Pesquisa de

micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. Revista da Associação Médica Brasileira 2000; **46**: 207-211.

9. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation Research 1992; **271**: 69-77.

10. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. Genetics and Molecular Research 2002; **1**: 246-260.

11. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The Effect of Alcohol Consumption on Periodontal Disease. Journal of Periodontology 2001; **72**: 183-189.

12. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. Oral Oncology 2001; **37**: 446-454.

13. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. American Journal of Epidemiology 1991; **134**: 840-850.

14. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti R, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. Mutagenesis 1987; **2**: 11-17.

15. Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of

cancer in the aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology* 2000; **36**: 550-55.

16. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *International Journal of Cancer* 1982; **30**: 553-9.
17. Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, Quintana PJ, Boeniger M, Hayes R, Suruda A, Schulte P. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research* 1996; **371**: 237-48.
18. Ogden GR. The future role for oral exfoliative cytology – bleak or bright? *Oral Oncology* 1997; **33**: 2-4.
19. Epstein JB, Scully C. Assessing the patient at risk for oral squamous cell carcinoma. *Special Care in Dentistry* 1997; **17**:120-128.
20. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology* 2007; **43**: 523-34.
21. Casartelli G, Bonatti S, De Ferrari M, Scala M, Mereu P, Margarino G, Abbondandolo A. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Analytical and quantitative cytology and histology* 2000; **22**: 486-92.
22. Desais S, Ghaisas SD, Jakhi SD, Bhide SV. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer letters* 1996; **109**: 9-14.

23.Bohrer PL. Avaliação das Alterações Citopatológicas da Mucosa Bucal Clinicamente Normal Exposta a Carcinógenos. [dissertação] Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CONSENTIMENTO INFORMADO

- I- Justificativa e objetos da pesquisa: avaliar, através da análise das alterações cromossomais e de Proliferação celular, a ação do álcool e do fumo sobre as células da mucosa bucal normal obtidas por raspagem.
- II- Procedimentos que serão realizados e seus propósitos: serão realizados esfregaços mediante a utilização da escova citopatológica na mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos com câncer ou leucoplasia ou expostos ao álcool e ao fumo. Além disso, serão realizadas biópsias das lesões compatíveis com câncer bucal e da mucosa clinicamente normal todos os casos que mostrarem variação do padrão normal, serão submetidas a novas avaliações clínicas e/ou laboratoriais.
- III- Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

Fui igualmente informado:

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

O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa é Dr. Pantelis Varvaki Rados (fone: 3308.5023 ou 3308.5011).

Nome e Assinatura do voluntário

Data: _____ Telefone: _____

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução a96/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra do pesquisador responsável.

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MODELO DE FICHA PARA CADASTRAMENTO DOS PACIENTES

Nº de Registro: _____ Data: _____

Nome do Paciente: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Endereço do Paciente: _____

Cidade: _____ Telefone: _____

Profissão: _____ Origem (local de coleta): _____

Doenças sistêmicas: _____ Medicamentos: _____

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

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

Bebida quente: _____ Chimarrão: _____

Presença de lesão clínica: _____ Diagnóstico clínico: _____

História Clínica: _____

Sítio Anatômico: _____

Coletado por: _____ Tipo de Coleta: _____

Endereço e Telefone: _____

Projeto de Pesquisa:	Ano:
Título: _____	_____
Pesquisadores: _____	_____
Número de arquivo do Comitê de Ética: _____	_____

PARA SER PREENCHIDO PELO CITOPATOLOGISTA:

Coloração: PAP Agnor Feulgen MGG Outro _____

Descrição da Lâmina _____

Diagnóstico Citopatológico: _____

Citopatologista: _____

Revisado por: _____

Observações: _____

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA EM
CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL NORMAL EXPOSTA A
CARCINÓGENOS E ADJACENTE A CARCINOMA ESPINOCELULAR.**

ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI (00144906)

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA BUCAL J. J. BARBACHAN

**Orientador: PROF. DR. PANTELIS VARVAKI RADOS
PROFESSOR DE PATOLOGIA DA FOUFRGS**

**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA EM
CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL NORMAL EXPOSTA A
CARCINÓGENOS E ADJACENTE A CARCINOMA ESPINOCELULAR.**

ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA BUCAL J. J. BARBACHAN

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por ser meu maior exemplo e meu porto seguro em todos os momentos. Em especial agradeço à minha mãe pelo apoio, incentivo e amor incondicionais.

Agradeço aos meus amigos e colegas por tornarem a faculdade um momento inesquecível e único em minha vida, pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos.

Agradeço a todos do Laboratório de Patologia Bucal J.J. Barbachan pelo aprendizado e contribuição para que este trabalho se concretizasse. Em especial agradeço ao Professor Pantelis Varvaki Rados e Fernanda Visioli pelos ensinamentos, pela dedicação e pela amizade tornando os 4 anos de Iniciação Científica os melhores possíveis.

Agradeço à Faculdade de Odontologia da UFRGS pelo ensino de qualidade.