

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

**QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL NORMAL
EXPOSTA AO FUMO E ALCOOL: UM ESTUDO CITOPATOLÓGICO**

RICARDO LOSEKANN PAIVA

Dissertação elaborada como parte
dos requisitos obrigatórios para a
obtenção do título de Mestre em
Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, agosto de 2003.

AGRADECIMENTOS

Mãe, não tenho palavras para agradecer o teu apoio e dedicação ao longo de toda a minha vida. Muito obrigado por tudo!

Pai, os teus ensinamentos desde cedo foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos meus irmãos, Karen, Álvaro e Cláudia pela grande amizade e cumplicidade e, aos meus sobrinhos, Lucas, Gustavo e Gabriel pela alegria sempre estampada no rosto.

Yordanna, minha guria, te amo e te admiro cada vez mais. Obrigado pela força!

Professor Pantelis, tenha a certeza de missão cumprida, como orientador, professor e, principalmente como amigo.

Aos professores Barbachan, Onofre e Manoel pelos conhecimentos transmitidos durante estes dois anos.

Isabel, obrigado pela realização da parte laboratorial deste trabalho e pelos momentos divertidos no laboratório.

Aos amigos e colegas de mestrado Vinícius, Cristiano, Cristina, Paula e Cristiane por estes dois anos de convívio que ficarão marcados para sempre.

Ao colega Fábio Maito e funcionárias do DMAE, Louraci e Inaiá, pela grande ajuda para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho, através da técnica de Papanicolaou Modificado, analisou as alterações qualitativas segundo classificação de Papanicolaou e Traut (1947) e do Sistema de Bethesda Adaptado para a Cavidade Bucal, bem como o padrão de maturação celular. Avaliou-se também a atividade de proliferação celular com a técnica da AgNOR. Sessenta pacientes do sexo masculino, acima de 30 anos, sem lesão bucal clinicamente visível, foram selecionados e divididos em três grupos: I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool). Realizaram-se esfregaços citológicos da mucosa do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal. A análise estatística da ANOVA ($p < 0.05$) demonstrou os seguintes resultados: (1) os três sítios anatômicos avaliados apresentaram diferentes padrões de maturação celular; (2) a borda da língua apresentou a menor atividade de proliferação celular dentre os sítios anatômicos estudados; (3) a média do número e a da área das AgNORs/núcleo foram maiores na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal nos grupos II (fumo) e III (fumo e álcool), comparados ao grupo I (controle). Sugere-se que o fumo, associado ou não, ao álcool aumentam a atividade de proliferação celular da mucosa do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal.

ABSTRACT

This study, using Modified Papanicolaou method, evaluated the qualitative alterations following Papanicolaou e Traut (1947) classification and Modified Oral Cavity Bethesda System (2001) besides cellular maturation pattern. The cellular proliferation activity was also evaluated using AgNOR technique according to the parameters: mean number and area of AgNORs/nucleus and the mean percentage of nucleus with more than 3 and 5 AgNORs . Sixty male patients, older than 30, with clinical normal oral mucosa were selected and divided in three groups: I (control), II (smoke) and III (smoke and alcohol). Smears of lower lip, border of tongue and floor of the mouth were collected. The ANOVA statistical analysis ($p < 0.05$) displayed the following results: (1) the three anatomical sites evaluated showed different cellular maturation patterns; (2) the border of tongue had the lowest cellular proliferation activity (3) the mean number and area of AgNORs/nucleus were higher in lower lip, border of tongue and floor of the mouth of the groups II (tobacco) and III (tobacco and alcohol) compared to the group I (control). It suggested that smoking habit associated or not to alcohol increase the cellular proliferation activity of the lower lip, border of tongue and floor of the mouth .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema do esfregaço citológico adotado para a análise qualitativa e quantitativa segundo a coloração de Papanicolaou Modificado e para a análise quantitativa segundo técnica31 da AgNOR
- Figura 2 - Fotomicrografia de célula epitelial anucleada da mucosa do lábio inferior de paciente não fumante. Coloração de Papanicolaou Modificado (1000x).51
- Figura 3 - Fotomicrografia de célula epitelial superficial com núcleo da mucosa do lábio inferior de paciente não fumante. Coloração de Papanicolaou Modificado (1000x).51
- Figura 4 - Fotomicrografia de célula epitelial intermediária do assoalho bucal de paciente fumante. Coloração de Papanicolaou Modificado (1000x).51
- Figura 5 - Fotomicrografia de célula epitelial parabasal do assoalho bucal de paciente fumante. Coloração de Papanicolaou Modificado (1000x).51

Figura 6 - Fotomicrografia de célula epitelial impregnada pela prata observada em esfregaço de assoalho bucal de paciente fumante. Verifica-se a presença de 3 AgNORs/núcleo. Técnica de impregnação pela prata (1000x).52

Figura 7 - Fotomicrografia de célula epitelial impregnada pela prata observada em esfregaço de assoalho bucal de paciente fumante. Verifica-se a presença de 3 AgNORs/núcleo selecionados para quantificação da área utilizando o IMAGELAB®. Técnica de impregnação pela prata (1000x).52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag - As	Prata amoníaca
A.S.C.U.S	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance – Célula Escamosa de Significado Indeterminado
AgNOR	Silver-staining Nucleolar Organizer Regions - Regiões Organizadoras Nucleolares Impregmadas pela Prata
B ₂₃	Proteína Numatrin
BrdU	Bromodeoxyuridine -Bromodeoxiuridina
C ₂₃	Proteína Nucleolina
DNA	Desoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxiribonucleico
et al.	e colaboradores
G ₂	" Gap 2 " (intervalo 2)
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPV-16	Human Papilloma Virus subtype 16 - Vírus do Papiloma Humano subtipo 16
KI67/ MIB1	Marcador de proliferação celular
N.C.M	Negativo Célula Maligna
N.C.M.I	Negativo para Célula Maligna com Inflamação
NOR	Nucleolar Organizer Regions - Regiões Organizadoras Nucleolares.
PCNA	Proliferation Cellular Nucleo Antigen - Antígeno Nuclear de Proliferação

RNA

Ribonucleic Acid - Ácido Ribonucleico

S

" Synthesis " (síntese)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da amostra segundo idade. Porto Alegre.2002/2003.34
Tabela 2 - Distribuição e frequência dos esfregaços classificados e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2002/2003.36
Tabela 3 - Distribuição e frequência dos esfregaços classificados pelo Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2002/2003.38

Tabela 4 - Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no lábio inferior. Porto Alegre. 2002/2003.39
Tabela 5 - Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais na borda de língua. Porto Alegre. 2002/2003.40
Tabela 6 - Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.42
Tabela 7 - Comparação da média do número e área das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs. Porto Alegre. 2002/2003.44

Tabela 8 - Comparação da média do número das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.46

Tabela 9 - Comparação da média da área das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.47

Tabela 10 - Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição da amostra segundo idade. Porto Alegre.2002/2003.34
Gráfico 2- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no lábio inferior. Porto Alegre. 2002/2003.39
Gráfico 3 - Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais na borda de língua. Porto Alegre. 2002/2003.41
Gráfico 4 - Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.42
Gráfico 5- Comparação da média do número e área das AgNORs/núcleo. Porto Alegre.2002/200344

Gráfico 6- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs . Porto Alegre. 2002/2003.45
Gráfico 7- Comparação da média do número das AgNORs/núcleo na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.46
Gráfico 8 - Comparação da média da área das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.48
Gráfico 9- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/200349
Gráfico 10- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.50

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 CÂNCER DE BOCA.....	17
2.2 CITOPATOLOGIA BUCAL.....	19
2.3 MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES.....	23
3. PROPOSIÇÃO.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5. RESULTADOS.....	34
5.1 TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO.....	35
5.1.1 Análise Qualitativa.....	35
5.1.2 Análise Quantitativa.....	38
5.2 MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (AgNORs).....	42
6. DISCUSSÃO.....	53

7. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS A - H.....	78

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais prevalente da cavidade bucal. Ocorre, principalmente, em homens acima de 40 anos de idade. Apesar da etiologia multifatorial, o carcinoma espinocelular tem, como principais fatores etiológicos, fumo e álcool, sendo o lábio inferior, a borda da língua e o assoalho bucal os sítios anatômicos mais acometidos.

A citopatologia bucal, inicialmente utilizada como método de diagnóstico de lesões bucais, adquiriu um enfoque preventivo com a sua aplicação em mucosa bucal clinicamente normal. Apesar da formulação do Sistema de Bethesda em 1988, que facilitou a comunicação entre citopatologistas e clínicos e a correlação da histologia com a citologia cérvico-vaginal, a citopatologia bucal baseia-se, ainda, na classificação de Papanicolaou e Traut (1947).

A citopatologia bucal permite a aplicação de técnicas quantitativas que aumentem a sua acurácia. As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são alças de DNA ribossômico que podem ser detectadas por uma técnica que consiste na impregnação da prata de proteínas associadas às NORs. A técnica da AgNOR tem sido amplamente utilizada como marcador de proliferação celular de diversas lesões tanto em material incluído em parafina como em esfregaço citopatológico. A atividade de proliferação celular, através da técnica da AgNOR, foi avaliada na mucosa bucal clinicamente normal exposta somente ao fumo, utilizando a contagem das AgNORs por núcleo. Entretanto, a mensuração das AgNORs por núcleo é mais sensível para avaliar a atividade de proliferação celular.

Este trabalho avalia as alterações morfológicas segundo classificação de Papanicolaou e Traut (1947) e Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal e de maturação celular com a técnica de Papanicolaou Modificado e

a atividade de proliferação celular através da contagem e mensuração das AgNORs por núcleo com a técnica da AgNOR na mucosa clinicamente normal de homens com mais de 30 anos, expostos ao fumo e ao fumo e álcool.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE BOCA

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. A iniciação, induzida por um carcinógeno, é a primeira etapa na produção tumoral. Nesta, ocorre uma mutação em uma região crítica de um gene. As células iniciadas permanecem latentes até a ação de agentes promotores, que não são capazes de produzir tumor, porém, estimulam a proliferação das células iniciadas, caracterizando a etapa de promoção tumoral. (FRANKS, 1996). Com relação ao câncer de cabeça e pescoço, Califano et al., 1996, sugeriram um acúmulo de alterações genéticas em determinados loci cromossomais até o surgimento clínico.

Os estudos de casos-controle demonstram que o carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna que mais acomete a cavidade bucal. Atinge mais os homens, ocorrendo, na sua grande maioria, em indivíduos acima de 40 anos (TAN, 1970; KROLLS; HOFFMAN, 1976; RODER,1982; RICH; RADDEN, 1986; JOVANOVIC et al., 1993a; LLEWELYN; MITCHELL, 1994; REIS et al., 1997; IZARZUGAZA; ESPARZA; AGUIRRE, 2001).

Os sítios anatômicos de maior prevalência do carcinoma espinocelular são o lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal (KROLLS; HOFFMAN, 1976; RODER,1982; RICH; RADDEN, 1986; JOVANOVIC et al., 1993a; LLEWELYN; MITCHELL, 1994).

Com relação aos fatores etiológicos, envolvidos no desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal, destacam-se o fumo e o álcool (RICH; RADDEN, 1986; JOVANOVIC et al., 1993; LLEWELYN; MITCHELL, 1994; DE STEFANI et al., 1998; FIORETTI et al., 1998; ZAVRAS et al., 2000).

A relação entre o fumo e o carcinoma espinocelular bucal justifica-se pelos constituintes genotóxicos e carcinógenos resultantes da queima do tabaco, sendo considerado um agente iniciador (LÖFROTH, 1988; FRANKS, 1996). Já o etanol não é mutagênico, clastogênico ou carcinógeno, porém o seu primeiro produto metabólico, o acetaldeído, é considerado mutagênico e clastogênico. (BIRD; DRAPER; BASRUR, 1982; OGDEN; WIGHT, 1997). Timmons, Nwankwa e Domann (2002) sugerem o acetaldeído como um agente promotor na carcinogênese bucal.

A exposição solar está relacionada, particularmente, ao carcinoma do vermelhão de lábio inferior (TAN, 1970; KROLLS; HOFFMAN, 1976; MOORE et al., 1999). Além do fumo, álcool e exposição solar, De Stefani et al. (1999) relacionaram um aumento do risco ao desenvolvimento do câncer bucal com a ingestão de proteínas, colesterol e gorduras e um efeito protetor das vitaminas A, E, C e alfa carotenos, evidenciando a dieta como um fator a ser considerado na etiologia do carcinoma espinocelular. A má higiene bucal e presença de úlceras, ocasionadas por próteses totais mal adaptadas, foram associadas ao aumento do risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal (VELLAY et al., 1998), além da presença de dentes fraturados (REIS et al., 1997). Farthing e Lesley (1994) ressaltaram também a imunidade mediada por células como um fator importante na prevenção do desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal.

Apesar destes conhecimentos sobre a etiologia e da existência de métodos de diagnósticos mais sensíveis, o carcinoma espinocelular bucal ainda representa uma neoplasia muito prevalente e letal. O Instituto Nacional do Câncer estimou para o Brasil em 2003, 10.635 novos casos de câncer de boca, com 3.245 óbitos. (<http://www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregiões/>).

2.2 CITOPATOLOGIA BUCAL

Papanicolaou e Traut (1941) caracterizaram a citologia esfoliativa como um método simples, de baixo custo, confiável e passível de ser utilizada em âmbito populacional como forma de prevenção e controle do câncer de colo de útero.

A citopatologia bucal consiste na análise morfológica de células esfoliadas ou raspadas. Por ser um método indolor, simples e de baixo custo (BANOCZY, 1976) passou a ser utilizada como meio de diagnóstico precoce do câncer bucal. Silverman, Becks e Farber (1958), Sandler e Cahn (1960) e Sandler (1964), comparando os exames histopatológicos e citopatológicos, concluíram que a citopatologia bucal é um método de diagnóstico confiável para a detecção do câncer bucal, em estágio precoce.

No entanto, sempre houve a ocorrência de casos falso-negativos e falso-positivos no emprego da técnica de Papanicolaou, quando comparada à histopatologia no diagnóstico do câncer bucal (SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958; SANDLER;CAHN, 1960; SANDLER, 1964). Rovin (1967) observou 26,15 % de casos falso-negativos dentre as ocorrências de carcinomas espinocelulares analisadas. Este autor atribuiu fatores, como a habilidade do examinador em obter um adequado esfregaço citológico, a natureza e localização da lesão e o erro na interpretação citopatológica, como justificativas a este alto percentual de falso-negativos. A obtenção de um adequado esfregaço citológico depende também do método de coleta. Ogden, Cowpe e Green (1992) concluíram que a utilização do "cytobrush", na mucosa bucal clinicamente normal, resulta em um esfregaço citológico com maior número de células epiteliais distendidas e não sobrepostas.

Em decorrência dos casos falso-negativos e falso-positivos da citopatologia como diagnóstico do câncer bucal, buscou-se analisar as alterações do padrão de

maturação do epitélio da mucosa bucal clinicamente normal. Ten Cate (1994) caracterizou o processo de maturação epitelial como sendo as modificações morfológicas que as células epiteliais da camada basal sofrem até atingirem as camadas mais superficiais do epitélio. Montgomery (1951) avaliou o padrão de maturação celular com a técnica de Papanicolaou, constatando mais células de citoplasma azul em palato mole e mucosa jugal, se comparados às do dorso da língua e gengiva. A gengiva apresentou mais células com citoplasma vermelho e amarelo quando comparada às dos outros sítios anatômicos mencionados. Silverman, Becks e Farber (1958), utilizando também a técnica de Papanicolaou, avaliaram o padrão de maturação epitelial em diferentes sítios anatômicos da mucosa bucal clinicamente normal. O assoalho bucal apresentou células epiteliais com o menor grau de maturação. A gengiva, dorso da língua e mucosa jugal apresentaram células com maturação intermediária, enquanto o palato duro mostrou células com maior grau de maturação. Os critérios para determinar o grau de maturação epitelial foram a morfologia celular e a coloração do citoplasma.

As alterações do padrão de maturação celular da mucosa bucal clinicamente normal sob a ação do fumo foram avaliadas por Zimmermam e Zimmermam (1965), constatando aumento das células de citoplasma azul na mucosa jugal de fumantes. Meyer, Rubinstein e Medak (1970), além de confirmarem o maior número de células com citoplasma azul em mucosa jugal, de fumantes observado por Zimmermam e Zimmermam (1965), constataram aumento deste tipo celular em assoalho bucal, ventre e dorso da língua, palato duro e papila gengival de fumantes. Entretanto, em palato mole, ocorreu a diminuição das células azuis e aumento das células alaranjadas nos fumantes. Hillman e Kissin (1976) observaram o aumento das células com citoplasma azul e laranja, em dorso e ventre da língua e na mucosa

jugal de fumantes. Baláez et al. (1986) e Baláez, Díaz e Pérez (1989) observaram, nos fumantes, o aumento das células ceratinizadas sem núcleo em palato e mucosa jugal, com diferença estatisticamente significativa, e a diminuição das células ceratinizadas com núcleo, porém sem diferença estatisticamente significativa. Kapczinsky (1997) observou, com diferença estatisticamente significativa, o aumento das células superficiais com núcleo, no assoalho bucal de pacientes não fumantes, e uma tendência ao aumento das células intermediárias em assoalho bucal e diminuição das células superficiais com núcleo, na borda da língua de fumantes. Kapczinsky (1997) constatou ainda aumento das células anucleadas no vermelhão do lábio, borda da língua e assoalho bucal de fumantes, apesar de não ser estatisticamente significativa. Já Silva e Rados (1997) verificaram o aumento das células superficiais com núcleo em borda de língua e lábio inferior e, com diferença estatisticamente significativa, ocorreu o aumento das células anucleadas no assoalho bucal de fumantes. Observou-se o aumento das células intermediárias no vermelhão do lábio, borda da língua e assoalho bucal de fumantes. Com exceção do assoalho bucal, constatou-se maior número de células anucleadas no vermelhão do lábio e borda da língua em não fumantes.

Já em 1958, Silverman, Becks e Farber realizaram esfregaços citológicos em diferentes sítios anatômicos da mucosa bucal clinicamente normal, não observando nenhuma alteração morfológica compatível com malignidade. A mucosa bucal clinicamente normal, sob ação do fumo, foi analisada segundo critérios de malignidade e classificação de Papanicolaou e Traut. Silva e Rados (1997) e Kapczinsky (1997), avaliando lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal de fumantes e não fumantes, obtiveram as classes I e II, bem como Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001), quando avaliaram borda de língua e assoalho bucal de fumantes

e não fumantes. Romanini (1999) constatou dois esfregaços citológicos na borda de língua e dois no assoalho bucal classe III em não fumantes, enquanto Soares Pinto (2000) observou um esfregaço citológico classe III no assoalho bucal de fumante.

Ogden, Cowpe e Green (1990), utilizando a técnica de Papanicolaou, avaliaram a ação do fumo na área citoplasmática e nuclear das células esfoliadas da mucosa bucal clinicamente normal, constatando maior área nuclear nos fumantes. Já em indivíduos expostos ao álcool, Ogden, Wight e Cowpe (1999) observaram diminuição da área total celular.

Apesar da técnica de Papanicolaou identificar alterações morfológicas e de maturação celular, a citopatologia bucal requer a aplicação de técnicas quantitativas e imunohistoquímicas que aumentem a sua acurácia (OGDEN, 1997). Devido ao custo deste exame, quando utilizada em âmbito populacional, a citopatologia bucal deve ser usada em indivíduos expostos cronicamente ao álcool e fumo e em sítios anatômicos de maior prevalência do câncer bucal (SUGERMAN; SAVAGE, 1996).

Buscando avaliar o efeito genotóxico do álcool e fumo com a utilização da técnica de Feulgen, na citopatologia em mucosa clinicamente normal, Stick e Rosin (1983) constataram maior número de micronúcleos em indivíduos expostos ao álcool e fumo. Reis et al. (2001) observaram maior número de micronúcleos na borda de língua de indivíduos expostos ao álcool.

Sampaio et al. (1999) avaliaram a atividade de proliferação celular com a técnica da AgNOR em mucosa jugal clinicamente normal. A média do número das AgNORs/núcleo e a média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs foram maiores em fumantes, em comparação aos não fumantes, com diferença estatisticamente significativa. Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) também utilizaram a técnica da AgNOR em fumantes e não fumantes, porém em esfregaços

citológicos de borda de língua e assoalho bucal. Observaram maior média do número das AgNORs/núcleo e maior média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs em ambos os sítios anatômicos dos fumantes, em relação aos dos não fumantes, com diferença estatisticamente significativa. Soares Pinto (2001) utilizou a técnica da AgNOR em esfregaços citológicos de lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal de fumantes e não fumantes, observando maior média do número das AgNORs/núcleo em assoalho bucal de fumantes, com diferença estatisticamente significativa em relação ao assoalho bucal dos não fumantes. Estes trabalhos demonstraram o aumento da atividade de proliferação celular em células epiteliais da mucosa clinicamente normal de indivíduos fumantes.

Mao (1995), utilizando a citopatologia bucal, constatou uma correlação entre a infecção pelo HPV-16 em carcinomas espinocelulares com o aumento do número das AgNORs. Observou-se o aumento da média do número das AgNORs/núcleo em esfregaços citológicos de carcinomas espinocelulares, em relação aos obtidos da mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos não fumantes.

2.3 MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES

O nucléolo representa o sítio da biogênese de ribossomos, composto pelo centro fibrilar, componente fibrilar denso e componente granular (MOSGOELLER; JORDAN; HERNANDEZ-VERDUN, 1996). O centro fibrilar é constituído de DNA ribossômico envolvido por RNA-precursor que representa o componente fibrilar denso. O componente granular é constituído por pré-ribossomos e envolve o componente fibrilar denso. Na intérfase, o centro fibrilar corresponde à Região Organizadora Nucleolar (NOR), sendo assim, constituída por alças de DNA

ribossômico. O número e localização das NORs são específicos para cada espécie. Em humanos, totalizam 10 NORs localizadas nas constrições secundárias dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (UNDERWOOD, 1990).

Goodpasture e Bloom (1975) utilizaram uma técnica citoquímica denominada de Ag-As. O método Ag-As impregnou pela prata a localização do DNA ribossômico, que aparece ao microscópio ótico, como pontos pretos em regiões específicas dos cromossomos. Sugeriu-se a utilização do método Ag-As no estudo das NORs. Miller (1976) demonstrou que a impregnação pela prata com o método Ag-As ocorreu somente em sítios em que estava acontecendo a transcrição do RNA ribossômico.

Já em 1975, Goodpasture e Bloom suspeitavam que a impregnação pela prata ocorria em proteínas associadas aos cromossomos acrocêntricos. Buys e Osinga (1980) confirmaram que a marcação pela prata não tinha relação com o DNA ribossômico, ocorrendo em proteínas ácidas, não histônicas que estavam expressas em NORs ativas.

As proteínas associadas às NORs, denominadas de AgNORs, têm, como principais representantes, a nucleolina (C_{23}) e a numatrin (B_{23}). A C_{23} localiza-se no componente fibrilar denso, enquanto a B_{23} tem localização imprecisa dentro do nucléolo (SPECTOR; OCHS; BUSH, 1984). Durante o ciclo celular, tanto a C_{23} quanto a B_{23} , encontram-se em maior quantidade na fase S e G_2 (SIRRI et al., 1997).

O método de Ag-As, para a visualização das proteínas associadas às NORs, consistia de três etapas (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Ploton et al. (1986) aperfeiçoaram o método simplificado em uma etapa já existente, diminuindo a temperatura e aumentando o tempo da reação. Tais modificações resultaram em

melhor morfologia, maior rapidez e profundidade da impregnação da prata nos tecidos e mínima impregnação inespecífica.

Com a melhora da técnica da AgNOR, diversos estudos foram realizados com material incluído em parafina e pôde-se observar a capacidade da quantificação das AgNORs em caracterizar lesões malignas e benignas (CABRINI et al., 1992; CHATTOPADHYAY; CHAWDA; DOSHI, 1994; PILLAI et al., 1994; XIE et al., 1997; MIGALDI et al., 1998; MUNERATO et al., 2000; GAIGER et al., 2001; CORTEZ-GUTIÉRREZ et al., 2001), bem como relacioná-la com a predição de prognóstico (SANO et al., 1992; WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993; CECCARELLI et al., 2000). Entretanto, Howat et al. (1988), Fonseca e Soares (1992), Toikkanen e Joensuu (1992) não observaram relação entre a quantificação das AgNORs com o prognóstico de neoplasias.

Além dos estudos desenvolvidos em material incluído em parafina, a técnica da AgNOR foi amplamente utilizada na citologia esfoliativa, favorecida pela fixação em álcool que resultou na visualização mais específica e intensa das AgNORs (MAO, 1995; TRERÈ, 2000). Cardillo et al. (1992), Antonangelo et al. (1994), Ratch-Wolfson et al. (1995), Sujathan et al. (1996) e Chern, Lee e Yang (1997) relataram o valor da quantificação das AgNORs na diferenciação de tumores benignos e malignos. Já Giri et al. (1989)a e Kahan e Panday (1996) não encontraram relação entre a quantificação das AgNORs e definição de malignidade ou benignidade de lesões.

A quantificação das AgNORs tem sido correlacionada com marcadores de proliferação celular já estabelecidos. Dervan et al. (1989), utilizando material incluído em parafina, e Sinha, Singh e Blatia (1995), avaliando esfregaços citológicos obtidos por aspiração por agulha fina, observaram correlação entre o número das AgNORs

por núcleo e a marcação pelo Ki-67 em tumores de mama. Costa et al. (1999) observaram correlação do número das AgNORs/núcleo com a marcação pelo Ki-67 e PCNA em carcinomas espinocelulares bucais. Trerè et al. (1991) avaliaram a atividade de proliferação celular em neoplasias de diferentes regiões anatômicas, constatando correlação entre a área das AgNORs/núcleo com a marcação pelo Ki-67 e com a marcação pelo BrdU. Chu et al. (2001) observaram maior número das AgNORs/núcleo, marcação pelo PCNA, atividade mitótica e da telomerase na fase de progressão do tumor canino venéreo transmissível, em relação a sua fase de regressão. Derenzini et al, (2000), além de constatarem a relação da área das AgNORs/núcleo com o MIB1, PCNA e BrdU em linhagens celulares cancerosas inoculadas em camundongos, verificaram que a quantificação das AgNORs foi um indicador de velocidade de proliferação celular. Trerè, Pession e Derenzini (1989) demonstraram que a quantificação das AgNORs foi um indicador de velocidade de proliferação celular na medida que, quanto menor foi o tempo de duplicação celular, maior apresentou-se a área das AgNORs.

Os métodos de contagem e morfométrico são as formas de avaliar as AgNORs. O método morfométrico consiste na mensuração da área das AgNORs, sendo mais reproduzível e preciso (TRERÈ, 2000). Carbonelli et al. (1994) e Schwint et al. (1996), induzindo carcinogênese experimental em animais, utilizaram a contagem e mensuração da área das AgNORs/núcleo. Concluíram que a avaliação morfométrica das AgNORs foi o único parâmetro capaz de detectar alteração celular, ainda não evidenciada na histopatologia com a coloração em H&E.

Xie et al. (1997), além de utilizarem a média do número de AgNORs/núcleo, consideraram a média percentual de núcleos com mais de 1, 2, 3 e 4 AgNORs em epitélio normal, displasias e carcinomas espinocelulares bucais. Constataram que

70% dos núcleos de epitélio normal apresentaram 1 ou 2 AgNORs, enquanto que em carcinomas espinocelulares, 60% dos casos apresentaram mais de 4 AgNORs. Giri et al. (1989)^b utilizaram a média do número das AgNORs/núcleo para diferenciar tumores benignos e malignos de mama, constatando que os núcleos com mais de 3 AgNORs são sugestivos de malignidade.

3. PROPOSIÇÃO

Baseado no exposto até o momento, nos propusemos a avaliar as alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal do lábio inferior, borda da língua e assoalho bucal expostos aos agentes carcinógenos do fumo e do álcool através da:

- Avaliação qualitativa segundo a classificação de Papanicolaou e Traut (1947) e do Sistema de Bethesda de (2001) adaptado para a Cavidade Bucal
- Avaliação quantitativa do padrão de maturação celular
- Avaliação da atividade de proliferação celular pela quantificação da média do número e da área das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os indivíduos envolvidos nesta pesquisa foram examinados no Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) e no Setor de Triagem da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre os meses de abril de 2002 e abril de 2003. Estes pacientes foram selecionados com base nos critérios de inclusão: sexo masculino e idade mínima de 30 anos.

Após a obtenção do consentimento informado (ver Anexo A) dos pacientes, realizou-se, então, uma entrevista referente aos seus hábitos (ver Anexo B) e exame físico. Os pacientes com doenças sistêmicas, com história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas e com lesões clinicamente visíveis em tecidos moles, não considerando gengivite ou periodontite, foram excluídos do estudo. Os pacientes que apresentavam lesões clinicamente visíveis em tecidos moles, com biópsia indicada, foram encaminhados à Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Facial.

Conforme a entrevista, os pacientes selecionados foram divididos em três grupos. O grupo I (controle) era formado por pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que bebiam, em média, menos de um copo de bebida alcoólica por dia. O grupo II (fumo) era 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 anos (CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001) e que bebiam, em média, menos de um copo de bebida alcoólica por dia. O grupo III (fumo e álcool) era formado por pacientes que fumavam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou que fumavam

mais de 10 cigarros com filtro por dia por mais de 10 anos, e que consumiam, em média, um copo de bebida alcoólica por dia, por no mínimo um ano, independente do tipo de bebida alcoólica. Segundo Fioretti et al. (1998), 330 ml de cerveja, 120 ml de vinho e 30 ml de destilados contêm a mesma quantidade aproximada de etanol de 12-15 mg.

Dos 129 pacientes, inicialmente, examinados, 60 do sexo masculino, acima de 30 anos, sem doenças sistêmicas ou com história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas relatados pelo paciente e sem lesões clinicamente visíveis em tecidos moles, foram selecionados para o estudo. O grupo I (controle) foi constituído por 17 pacientes, o grupo II (fumo) por 25 e o grupo III (fumo e álcool) por 18 pacientes.

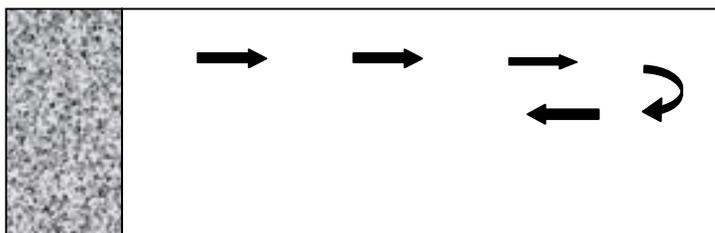
Nos 60 pacientes, foram realizados dois esfregaços citológicos para cada sítio anatômico por um único examinador: um do lado direito da mucosa do lábio inferior e outro do lado esquerdo; um da borda de língua lado direito e outro do lado esquerdo; um do lado direito do assoalho de boca e outro do lado esquerdo, sendo o freio lingual considerado o centro do assoalho de boca. Antes da realização de cada esfregaço citológico, os pacientes portadores de próteses parciais removíveis ou totais foram orientados a removê-las. Todos foram instruídos a bochechar água por um minuto. Utilizou-se uma extremidade da espátula de madeira, previamente esterilizada em autoclave, para cada esfregaço. O material foi distendido sobre uma lâmina de vidro, previamente limpa com detergente, álcool absoluto e esterilizada em autoclave, de forma a ocupar a maior extensão possível. Este material foi fixado em álcool absoluto imediatamente após a sua obtenção em potes tipo Borel, sendo utilizado um pote para cada sítio anatômico.

A partir daí, uma lâmina referente a cada sítio anatômico foi submetida à

técnica da AgNOR (ver Anexo C) e a outra, à técnica de Papanicolaou Modificado (ver Anexo D).

Nas lâminas submetidas à técnica de Papanicolaou Modificado, foi realizada a análise qualitativa por dois observadores, segundo critérios utilizados para análise da morfologia celular indicativos de malignidade (ver Anexo E) e, segundo a classificação de Papanicolaou e Traut (1947) (ver anexo F) e Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ver Anexo G). Utilizou-se um microscópio óptico marca Zeiss, modelo Standard 20, com aumento inicial de 100x. Os esfregaços citológicos foram analisados em toda a sua extensão, no sentido horizontal, da esquerda para a direita (segundo esquema abaixo). Para a análise do padrão de maturação celular, as lâminas foram avaliadas por dois observadores, sendo quantificadas as 100 primeiras células bem distendidas e não sobrepostas, em aumento de 400x no sentido horizontal, da esquerda para a direita (MONTGOMERY, 1951; SILVA; RADOS, 1997; KAPCZINSKI, 1997). Consideraram-se critérios de Carvalho, 2002 (ver em Anexo H).

Figura 1- Esquema do esfregaço citológico adotado para a análise qualitativa e quantitativa segundo coloração de Papanicolaou Modificado e para a análise quantitativa segundo técnica da AgNOR



A observação das células presentes nos esfregaços citológicos, submetidos à impregnação pela prata, foi realizada em um microscópio marca Zeiss, modelo Standard 20, em aumento 1000 x, com lente de imersão, por um observador que desconhecia a qual grupo pertencia a lâmina. A lâmina foi analisada no sentido horizontal, da esquerda para a direita, até a obtenção das primeiras 50 células com núcleo, bem distendidas e não sobrepostas (RATH - WOLFSON et al., 1995). Foi realizada a contagem das AgNORs segundo Crocker et al. (1989) e calculada a média das AgNORs/núcleo e a média percentual dos núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs (CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001). Foi mensurada também a área total das AgNORs/núcleo, em micrômetros. A metodologia de captura das imagens para a avaliação quantitativa consistiu na identificação microscópica inicial em aumento aproximado de 1000 x e transmissão desta imagem via vídeo-câmera para um monitor de vídeo TCÊ 17". A vídeo-câmera utilizada foi da marca JVC, modelo TK-C620, com as seguintes especificações: tipo (vídeo-câmera colorida), sistema de sinal (NTSC standard), tamanho da imagem (1/3 polegadas), resolução (470TV linhas-horizonta), número de pixels 380.000 (771 (H) x 492 (V)), sensor de imagem (CCD). As especificações referentes à imagem digitalizada constituem: alta qualidade de vídeo, padrão RGB (16,7 milhões de cores), tamanho 440 x 330 pixels, formato bmp . A partir desta imagem, procedeu-se à contagem e à mensuração da área das AgNORs por intermédio da utilização do sistema de processamento e análise de imagem, IMAGELAB®, utilizando a ferramenta RGB.

O valor *kappa* foi utilizado para a calibragem inter e intra-observador, antes da avaliação quantitativa dos esfregaços citológicos pela técnica da AgNOR, bem como para a calibragem inter-observador da análise qualitativa e quantitativa dos

esfregaços citológicos, submetidos à técnica de Papanicolaou Modificado.

A Análise da Variância (ANOVA), seguida das comparações múltiplas de Tukey a 5% de significância, foram utilizadas para comparar idades entre os grupos, avaliar padrão de maturação celular e AgNORs (média do número e da área das AgNORs/núcleo e média percentual dos núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs) entre os sítios anatômicos do mesmo grupo e entre os grupos estudados: I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool).

A quantidade de cigarros consumida por dia entre os grupos II (fumo) e III (fumo e álcool) foi avaliada com o teste t para grupos não pareado a 5% de significância.

5. RESULTADOS

Compuseram a amostra 60 pacientes, divididos em três grupos:

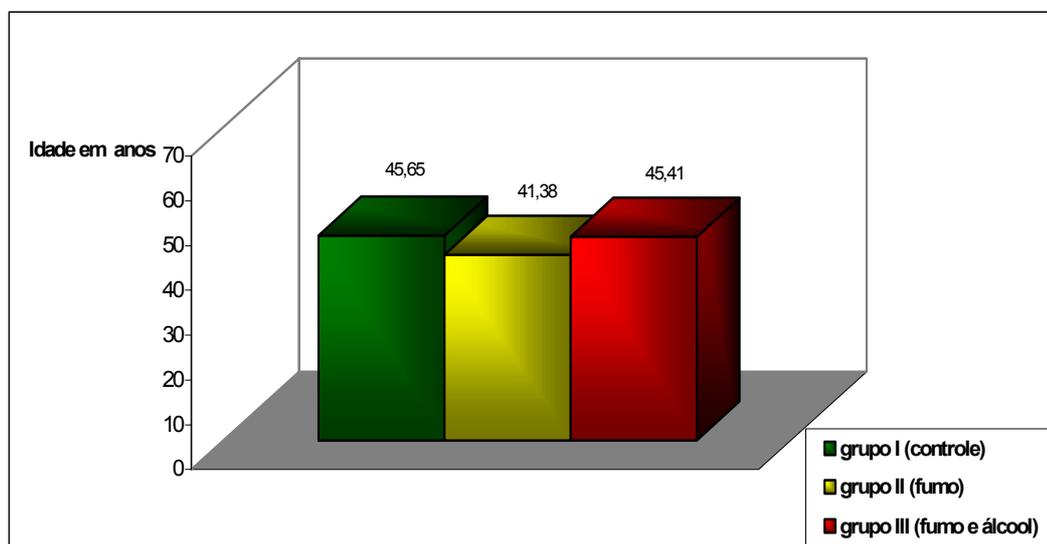
O grupo I (controle) foi composto por 17 pacientes, com média de idade de $45,65 \pm 10,23$ anos; o grupo II (fumo) foi composto por 25 pacientes com média de idade de $41,38 \pm 7,44$ anos; e o grupo III (fumo e álcool) foi composto por 18 pacientes com média de idade de $45,41 \pm 4,67$ anos (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1- Distribuição da amostra segundo idade. Porto Alegre.2002/2003.

<u>grupo I (controle)</u>	<u>grupo II (fumo)</u>	<u>grupo III (fumo e álcool)</u>
$45,65 \pm 10,23$	$41,38 \pm 7,44$	$45,41 \pm 4,67$

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 1- Distribuição da amostra segundo idade. Porto Alegre.2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre 2002/2003.

Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) das idades entre os grupos I (controle) e III (fumo e álcool), se comparados ao grupo II (fumo).

A média de cigarros com filtro consumida por dia no grupo II (fumo) foi de $22,96 \pm 10,34$, enquanto no grupo III (fumo e álcool) foi de $23,76 \pm 11,22$, não se

observando diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

5.1 TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO

5.1.1 Análise Qualitativa

A análise qualitativa foi realizada por dois pesquisadores. Um pesquisador obteve o valor de *kappa* pré-experimental de 0,49 e o outro de 0,84 em relação a um citopatologista experiente. Para a realização da calibragem, utilizou-se a classificação de Papanicolaou e Traut (1947).

De acordo com critérios utilizados para análise da morfologia celular como indicativos de malignidade (ver Anexo E) e classificação segundo Papanicolaou e Traut (1947) (ver Anexo F), obteve-se no grupo I (controle), dos 17 pacientes pertencentes, 51 lâminas avaliadas ao total:

- 17 (100%) Classe I na mucosa do lábio inferior
- 12 (70,5%) Classe I e 5 (29,5%) Classe II na borda de língua
- 8 (47%) Classe I e 9 (53%) Classe II no assoalho bucal

No grupo II (fumo), dos 25 pacientes pertencentes a este grupo e das 75 lâminas avaliadas ao total:

- 20 (80%) Classe I, 3 (12%) Classe II e 2 (8%) Classe 0 na mucosa do lábio inferior
- 13 (52%) Classe I, 10 (40%) Classe II, 1 (4%) Classe III e 1 (4%) Classe O na borda de língua
- 9 (36%) Classe I, 14 (56%) Classe II e 2 (8%) Classe III no assoalho bucal

No Grupo III (fumo e álcool), dos 18 pacientes pertencentes ao mesmo e das 54 lâminas avaliadas ao total:

- 14 (78%) Classe I, 3 (17%) Classe II e 1 (5%) Classe 0 na mucosa do lábio

inferior

- 12 (67%) Classe I e 6 (33%) Classe II na borda de língua
- 13 (72%) Classe I e 5 (28%) Classe II no assoalho bucal

Tabela 2- Distribuição e freqüência dos esfregaços classificados e corados pelo Método de Papanicolaou Adaptado de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2002/2003.

	Grupo I (controle)						Grupo II (fumo)						Grupo III (fumo e álcool)					
	lábio		língua		assoalho		lábio		língua		assoalho		lábio		língua		assoalho	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
Classe 0	0	0	0	0	0	0	2	8	1	4	0	0	1	5	0	0	0	0
Classe I	17	100	12	70,5	8	47	20	80	13	52	9	36	14	78	12	67	13	72
Classe II	0	0	5	29,5	9	53	3	12	10	40	14	56	3	17	6	33	5	28
Classe III	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	2	8	0	0	0	0	0	0

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Segundo Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, obteve-se no grupo I (controle), dos 17 pacientes pertencentes a este grupo e das 51 lâminas avaliadas ao total:

- 17 (100%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M), na mucosa do lábio inferior
- 12 (70,5%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M) e 5 (29,5%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação na borda de língua (N.C.M.I)
- 8 (47%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M) e 9 (53%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação no assoalho bucal (N.C.M.I)

No grupo II (fumo), dos 25 pacientes pertencentes a este grupo e das 75

lâminas avaliadas ao total:

- 20 (80%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); 3 (12%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação (N.C.M.I); e 2 (8%) foram insatisfatórios para avaliação (I.A), na mucosa do lábio inferior
- 13 (52%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); 10 (40%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação (N.C.M.I); 1 (4%) apresentou células escamosas atípicas de significado indeterminado (A.S.C.U.S); e 1 (4%) foi insatisfatório para avaliação (I.A), na borda de língua
- 9 (36%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); 14 (56%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação (N.C.M.I); e 2 (8%) apresentaram células escamosas atípicas de significado indeterminado (A.S.C.U.S), no assoalho bucal

No Grupo III (fumo e álcool), dos 18 pacientes pertencentes a este grupo e das 54 lâminas avaliadas ao total:

- 14 (78%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); 3 (17%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação (N.C.M.I); e 1 (5%) foi insatisfatório para avaliação (I.A), na mucosa do lábio inferior
- 12 (67%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); e 6 (33%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade, com presença de inflamação (N.C.M.I), na borda de língua
- 13 (72%) dos esfregaços citológicos foram negativos para lesão intra-epitelial ou malignidade (N.C.M); e 5 (28%) foram negativos para lesão intra-epitelial ou

malignidade, com presença de inflamação, no assoalho bucal (N.C.M.I)

Tabela 3- Distribuição e freqüência dos esfregaços classificados pelo Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2002/2003.

	Grupo I (controle)						Grupo II (fumo)						Grupo III (fumo e álcool)					
	lábio		língua		assoalho		lábio		língua		assoalho		lábio		língua		assoalho	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
I.A	0	0	0	0	0	0	2	8	1	4	0	0	1	5	0	0	0	0
N.C.M	17	100	12	70,5	8	47	20	80	13	52	9	36	14	78	12	67	13	72
N.C.M.I	0	0	5	29,5	9	53	3	12	10	40	14	56	3	17	6	33	5	28
A.S.C.U.S	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	2	8	0	0	0	0	0	0

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

5.1.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa foi realizada por dois pesquisadores. Um pesquisador com valor de *kappa* de 0,82 e o outro de 0,85 em relação a um citopatologista experiente.

Para a avaliação do padrão de maturação epitelial, consideraram-se os critérios de Carvalho (2002) (ver Anexo G).

Considerando a mucosa do lábio inferior, no grupo I (controle), foram avaliadas 17 lâminas, obtendo-se, como padrão de maturação celular $10,94 \pm 9,21\%$ de células anucleadas, $22,64 \pm 12,50\%$ de células superficiais com núcleo e $66,41 \pm 16,74\%$ de células intermediárias. No grupo II (fumo), foram avaliados 23 esfregaços citológicos com $17,52 \pm 18,27\%$ de células anucleadas, $17,91 \pm 12,7\%$ de células superficiais com núcleo e $65 \pm 17,39\%$ de células intermediárias. Dois esfregaços citológicos foram insatisfatórios para análise da maturação epitelial, ou seja, não se obteve 100 células epiteliais adequadas para avaliação. No grupo III

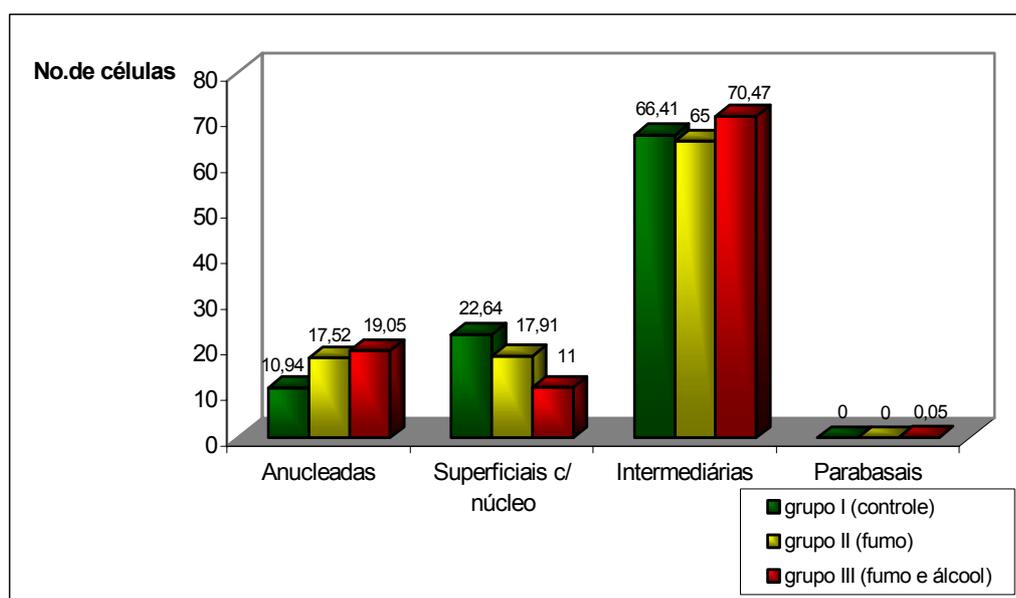
(fumo e álcool), foram avaliados 17 esfregaços citológicos com 19,05±17,04% de células anucleadas, 11±7,81% de células superficiais com núcleo, 70,47±19,24% de células intermediárias e 0,05±0,24% de células parabasais. Um esfregaço citológico foi insatisfatório para análise da maturação epitelial (Tabela 4 e Gráfico 2). Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre o grupo I (controle), comparado ao grupo III (fumo e álcool), para as células superficiais com núcleo.

Tabela 4- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no lábio inferior. Porto Alegre. 2002/2003.

	Anucleadas	Superficiais c/ núcleo	Intermediárias	Parabasais
grupo I (controle)	10,94 ± 9,21	22,64 ± 12,50	66,41 ± 16,74	0
grupo II (fumo)	17,52 ± 18,27	17,91 ± 12,7	65 ± 17,39	0
grupo III (fumo e álcool)	19,05 ± 17,04	11 ± 7,81	70,47 ± 19,24	0,05 ± 0,24

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 2- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no lábio inferior. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

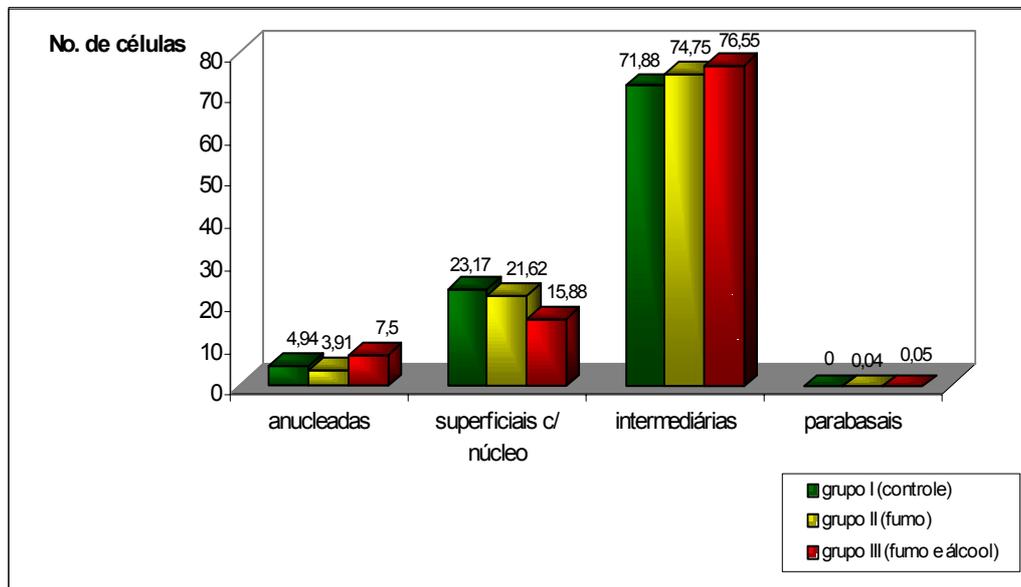
Analisando a borda da língua, no grupo I (controle) foram avaliadas 17 lâminas com 4,94±4,4% de células anucleadas, 23,17±13,78% de células superficiais com núcleo e 71,88±13,10% de células intermediárias. No grupo II (fumo), foram avaliados 24 esfregaços citológicos com 3,91±3,82% de células anucleadas, 21,62±16,72% de células superficiais com núcleo, 74,75±16,27% de células intermediárias e 0,04±0,2% de células parabasais. Um esfregaço citológico foi insatisfatório para análise da maturação epitelial. No grupo III (fumo e álcool), foram avaliados 18 esfregaços citológicos com 7,5±12,53% de células anucleadas, 15,88±11,91% de células superficiais com núcleo, 76,55±15,07% de células intermediárias e 0,05±0,23% de células parabasais (Tabela 5 e Gráfico 3). Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo I (controle) e o grupo III (fumo e álcool) para as células superficiais com núcleo.

Tabela 5- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais na borda de língua. Porto Alegre. 2002/2003.

	Anucleadas	Superficiais c/ núcleo	Intermediárias	Parabasais
grupo I (controle)	4,94±4,4	23,17±13,78	71,88±13,10	0
grupo II (fumo)	3,91±3,82	21,62±16,72	74,75±16,27	0,04±0,2
grupo III (fumo e álcool)	7,5±12,53	15,88±11,91	76,55±15,07	0,05±0,23

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 3- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais na borda de língua. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

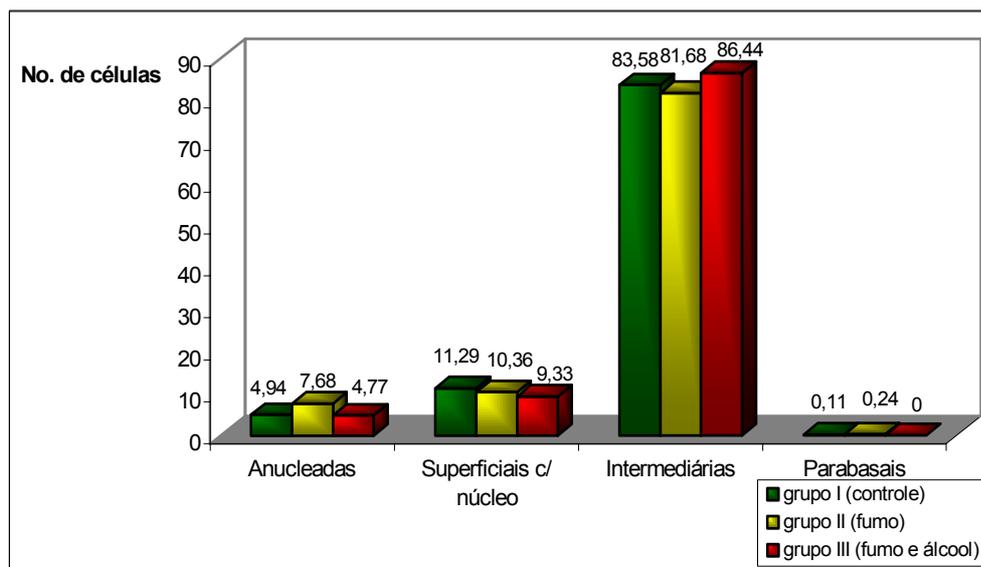
Com relação ao assoalho bucal, no grupo I (controle) foram analisadas 17 lâminas com $4,94 \pm 4,91\%$ de células anucleadas, $11,29 \pm 6,3\%$ de células superficiais com núcleo, $83,58 \pm 9,02\%$ de células intermediárias e $0,11 \pm 0,33\%$ de células parabasais. No grupo II (fumo), foram avaliados 25 esfregaços citológicos com $7,68 \pm 9,96\%$ de células anucleadas, $10,36 \pm 11,03\%$ de células superficiais com núcleo, $81,68 \pm 13,80\%$ de células intermediárias e $0,24 \pm 0,59\%$ de células parabasais. No grupo III (fumo e álcool), foram avaliados 18 esfregaços citológicos com $4,77 \pm 8,76\%$ de células anucleadas, $9,33 \pm 7,66\%$ de células superficiais com núcleo e $86,44 \pm 10,58\%$ de células intermediárias (Tabela 6 e Gráfico 4). Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo I (controle) e o grupo III (fumo e álcool) para as células superficiais com núcleo.

Tabela 6- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.

	Anucleadas	Superficiais c/ núcleo	Intermediárias	Parabasais
grupo I (controle)	4,94±4,91	11,29±6,3	83,58±9,02	0,11± 0,33
grupo II (fumo)	7,68±9,96	10,36±11,03	81,68±13,80	0,24±0,59
grupo III (fumo e álcool)	4,77±8,76	9,33±7,66	86,44±10,58	0

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 4- Distribuição das células anucleadas, superficiais com núcleo, intermediárias e parabasais no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

5.2 MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS REGIÕES

ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (AgNORS)

A quantificação das AgNORS foi realizada por um pesquisador com valores de *kappa*, antes da análise das lâminas, inter e intra-observador de 0,88 e 0,94, respectivamente.

No grupo I (controle), foram avaliadas 41 lâminas, ao total, nos três sítios

anatômicos. Foram perdidas 5 lâminas do total dos esfregaços citológicos obtidos da mucosa do lábio inferior; 2 lâminas da borda da língua e 3 lâminas do assoalho bucal. No grupo II (fumo), foram analisados, ao total, 59 esfregaços citológicos nos três sítios anatômicos. Foram perdidas 7 lâminas do total dos esfregaços citológicos obtidos da mucosa do lábio inferior; 3 lâminas da borda da língua e 6 lâminas do assoalho bucal. No grupo III (fumo e álcool), foram analisados, ao total, 39 esfregaços citológicos nos três sítios anatômicos. Foram perdidas 8 lâminas do total dos esfregaços citológicos obtidos da mucosa do lábio inferior; 6 lâminas da borda da língua e 1 lâminas do assoalho bucal.

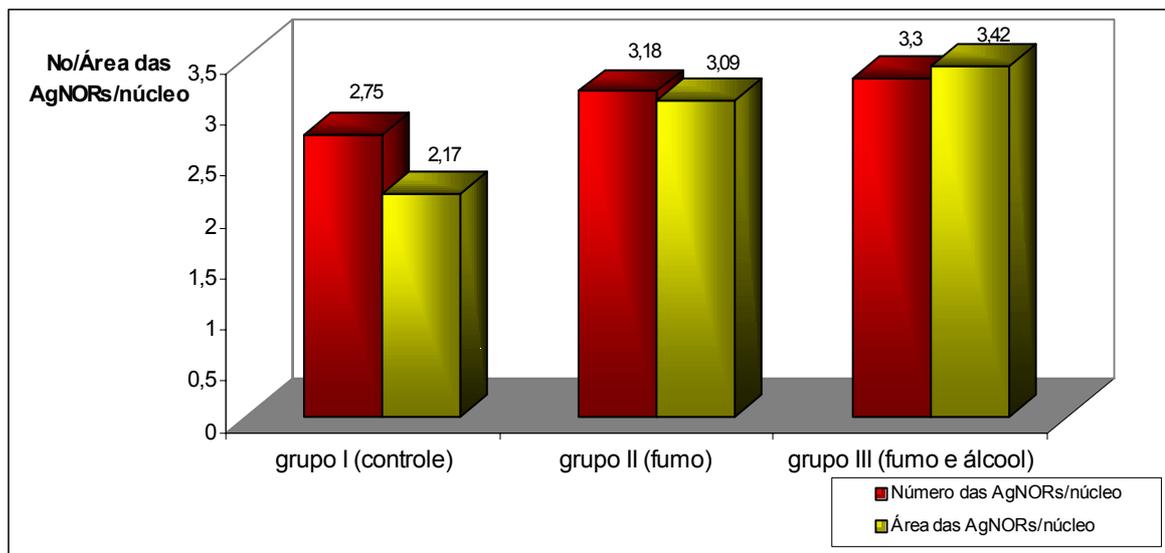
Considerando os três sítios anatômicos juntos, no grupo I (controle), a média do número das AgNORs/núcleo foi de $2,75 \pm 0,66$; no grupo II (fumo), foi de $3,18 \pm 0,62$; e no grupo III (fumo e álcool), foi de $3,30 \pm 0,56$. Com relação à média da área das AgNORs/núcleo, no grupo I (controle), foi de $2,17 \pm 0,67 \mu^2$; no grupo II (fumo), foi de $3,09 \pm 0,88 \mu^2$; enquanto, no grupo III (fumo e álcool), foi de $3,42 \pm 1,08 \mu^2$ (Tabela 7 e Gráfico 5). A média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs, no grupo I (controle), foi de $26,58 \pm 18,48$. Já no grupo II (fumo) observou-se $37,38 \pm 18,31$ e no grupo III (fumo e álcool), $39,43 \pm 16,27$. Considerando a média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs, no grupo I (controle), foi de $2,92 \pm 3,84$; no grupo II (fumo), obteve-se $5,08 \pm 5,55$; e, no grupo III (fumo e álcool), $6,15 \pm 5,66$ (Tabela 7 e Gráfico 6). Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo I (controle) comparado aos grupos II (fumo) e III (fumo e álcool) para a média do número e da área das AgNORs/núcleo.

Tabela 7- Comparação da média do número e área das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs. Porto Alegre. 2002/2003.

	No das AgNORs/núcleo	Área das AgNORs/núcleo	Núcleo/+ de 3AgNORs	Núcleo/+ de 5AgNORs
grupo I (controle)	2,75±0,66	2,17±0,67	26,58±18,48	2,92±3,84
grupo II (fumo)	3,18±0,62	3,09±0,88	37,38±18,31	5,08±5,55
grupo III (fumo e álcool)	3,30±0,56	3,42±1,08	39,43±16,27	6,15±5,66

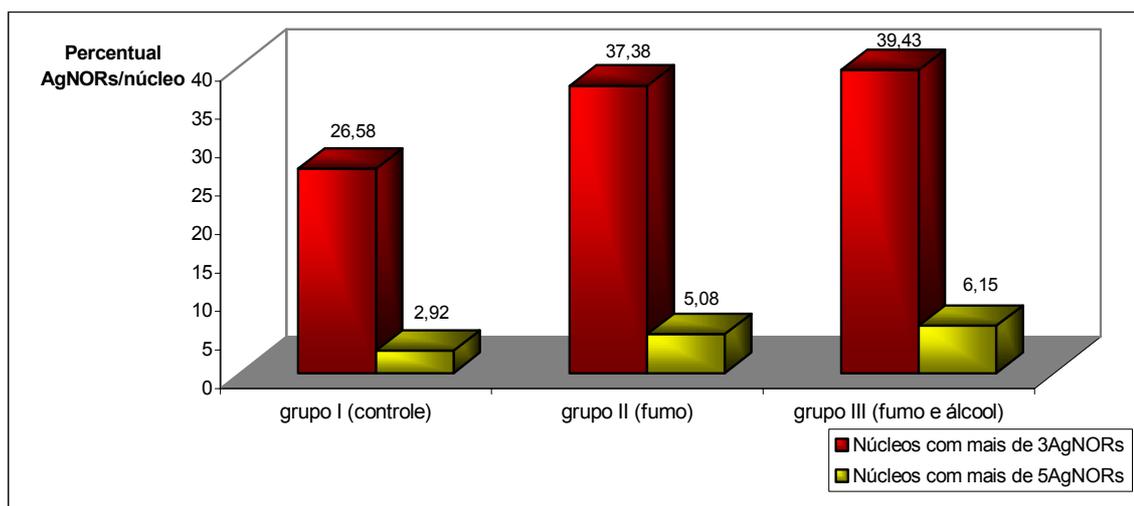
Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre 2002/2003.

Gráfico 5- Comparação da média do número e da área das AgNORs/núcleo. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre 2002/2003.

Gráfico 6- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre 2002/2003

Avaliando a mucosa do lábio inferior, no grupo I (controle), foram observadas 12 lâminas com média do número das AgNORs/núcleo de $3,28 \pm 0,52$. No grupo II (fumo), foram avaliadas 18 lâminas com média do número das AgNORs/núcleo de $3,34 \pm 0,55$; e no grupo III (fumo e álcool) avaliaram-se 10 lâminas, obtendo-se o valor de $3,31 \pm 0,26$. Na borda da língua, avaliaram-se, no grupo I (controle), 15 lâminas com média do número das AgNORs/núcleo de $2,22 \pm 0,43$. No grupo II (fumo), analisaram-se 22 lâminas e a média do número das AgNORs/núcleo foi de $2,78 \pm 0,51$; e, no grupo III (fumo e álcool), com as 12 lâminas avaliadas o valor obtido foi de $2,90 \pm 0,48$. Com relação ao assoalho bucal, 14 lâminas foram avaliadas no grupo I (controle), com média do número das AgNORs/núcleo de $2,87 \pm 0,58$. No grupo II (fumo), analisaram-se 19 lâminas com o valor de $3,48 \pm 0,59$; enquanto, no grupo III (fumo e álcool), com as 17 lâminas analisadas, obteve-se $3,57 \pm 0,60$.

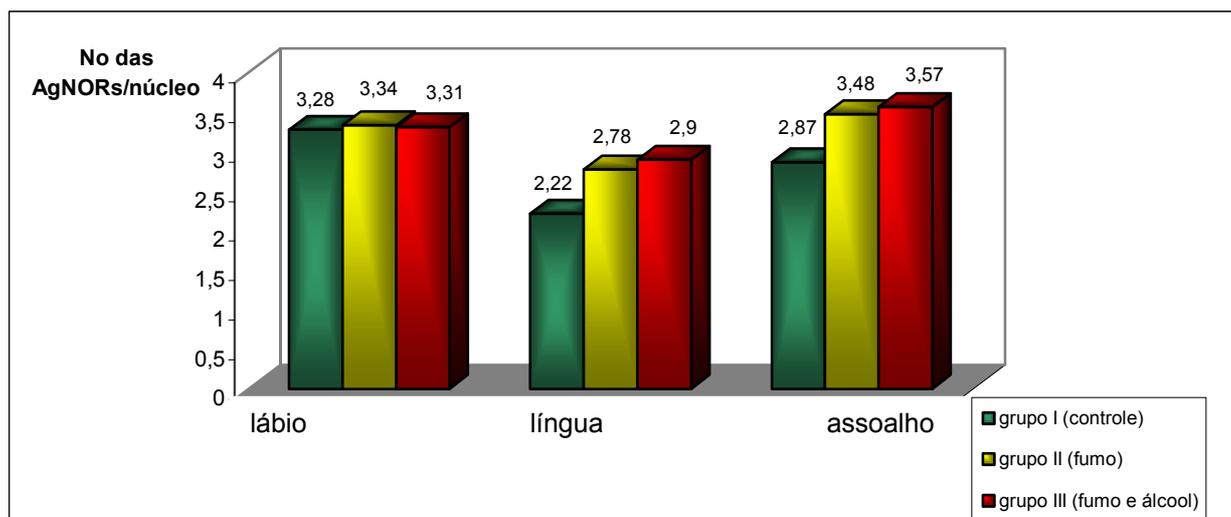
(Tabela 8 e Gráfico 7). Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) da média do número das AgNORs/núcleo na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal, entre o grupo I (controle) comparado aos grupos II (fumo) e III (fumo e álcool).

Tabela 8- Comparação da média do número das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.

	lábio	língua	assoalho
grupo I (controle)	3,28±0,52	2,22±0,43	2,87±0,58
grupo II (fumo)	3,34±0,55	2,78±0,51	3,48±0,59
grupo III (fumo e álcool)	3,31±0,26	2,90±0,48	3,57±0,60

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 7- Comparação da média do número das AgNORs/núcleo na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre 2002/2003.

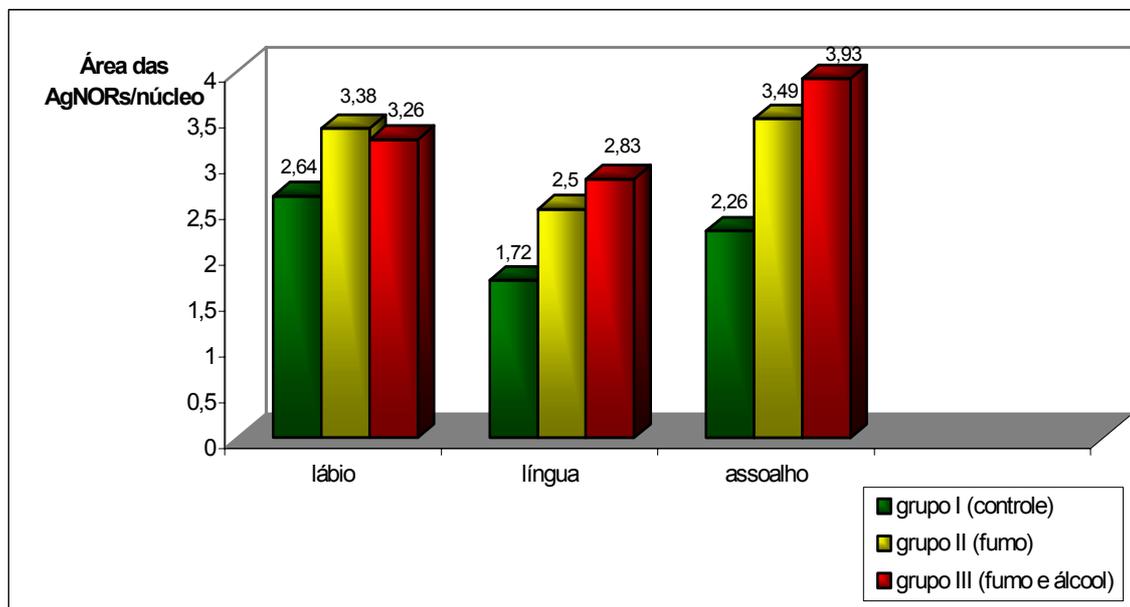
Considerando a média da área das AgNORs/núcleo na mucosa do lábio inferior, no grupo I (controle), obteve-se o valor de $2,64 \pm 0,59 \mu^2$. No grupo II (fumo), o valor foi de $3,38 \pm 0,63 \mu^2$; e, no grupo III (fumo e álcool), $3,26 \pm 0,56 \mu^2$. Na borda da língua, a média da área das AgNORs/núcleo do grupo I (controle) foi de $1,72 \pm 0,51 \mu^2$, no grupo II (fumo) obteve-se o valor de $2,50 \pm 0,65 \mu^2$ e no grupo III (fumo e álcool), $2,83 \pm 0,83 \mu^2$. A análise da média da área das AgNORs/núcleo no assoalho bucal do grupo I (controle) resultou no valor de $2,26 \pm 0,60 \mu^2$. No grupo II (fumo), o valor obtido foi de $3,49 \pm 0,98 \mu^2$; e, no grupo III (fumo e álcool), foi de $3,93 \pm 1,26 \mu^2$ (Tabela 9 e Gráfico 8). Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) da média da área das AgNORs/núcleo na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal, entre o grupo I (controle) comparado aos grupos II (fumo) e III (fumo e álcool).

Tabela 9- Comparação da média da área das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.

	<u>lábio</u>	<u>língua</u>	<u>assoalho</u>
grupo I (controle)	$2,64 \pm 0,59$	$1,72 \pm 0,51$	$2,26 \pm 0,60$
grupo II (fumo)	$3,38 \pm 0,63$	$2,50 \pm 0,65$	$3,49 \pm 0,98$
grupo III (fumo e álcool)	$3,26 \pm 0,56$	$2,83 \pm 0,83$	$3,93 \pm 1,26$

Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 8- Comparação da média da área das AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Avaliando-se a média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs na mucosa do lábio inferior, obteve-se como resultados: no grupo I (controle) $42 \pm 15,81$; no grupo II (fumo) $43,66 \pm 18,52$; e no grupo III (fumo e álcool) $39 \pm 8,75$. Já a média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs no grupo I (controle) foi de $5,83 \pm 5,55$; no grupo II (fumo) foi de $5,11 \pm 5,27$; e no grupo III (fumo e álcool) foi de $5 \pm 3,29$. Com relação à borda da língua, os valores obtidos para a média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs foram: no grupo I (controle), $12,26 \pm 8,77$; no grupo II (fumo), $27,18 \pm 13,24$; e, no grupo III (fumo e álcool), $29,16 \pm 12,10$. A análise da média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs resultou em $1,06 \pm 1,48$ no grupo I (controle), $3,27 \pm 4,64$ no grupo II (fumo) e $3,33 \pm 2,87$ no grupo III (fumo e álcool). No assoalho bucal, a média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs foi de $28,71 \pm 17,19$ no grupo I (controle), $43,23 \pm 18,68$ no grupo II (fumo) e $46,94 \pm 18,60$ no grupo III (fumo e álcool). Nos núcleos com mais de 5 AgNORs, a média percentual

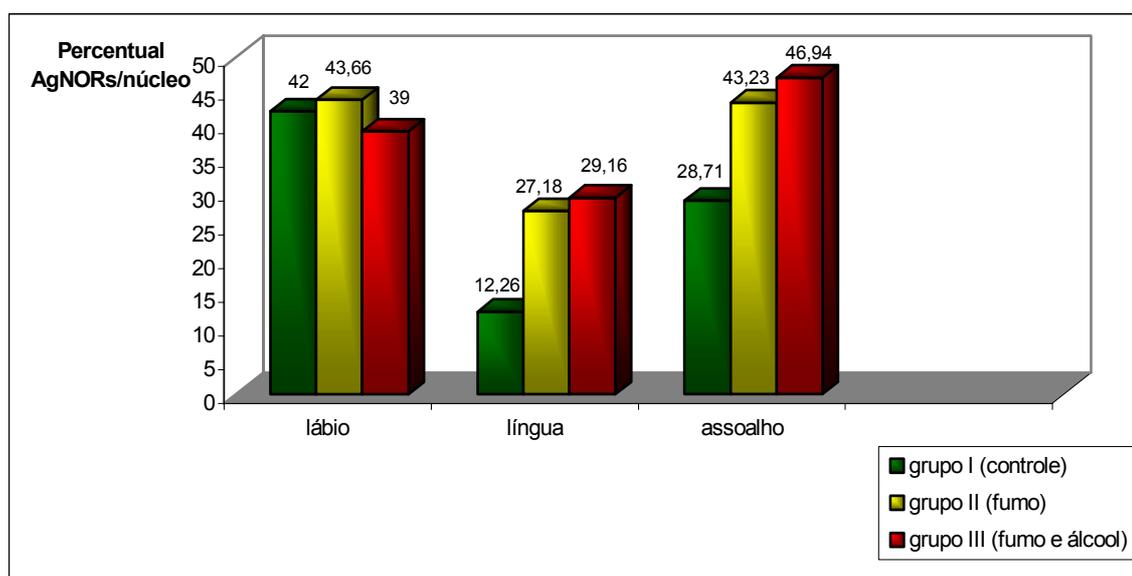
foi de $2,42 \pm 2,24$ no grupo I (controle), $7,15 \pm 6,26$ no grupo II (fumo) e $8,82 \pm 7,07$ no grupo III (fumo e álcool). (Tabela 10 e Gráficos 9 e 10). Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs na borda da língua e no assoalho bucal, entre o grupo I (controle) comparado aos grupos II (fumo) e III (fumo e álcool).

Tabela 10- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs/núcleo no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.

	lábio		língua		assoalho	
	+ de 3AgNORs	+ de 5AgNORs	+ de 3AgNORs	+ de 5AgNORs	+ de 3AgNORs	+ de 5AgNORs
grupo I (controle)	42±15,81	5,83±5,55	12,26±8,77	1,06±1,48	28,71±17,19	2,42±2,24
grupo II (fumo)	43,66±18,52	5,11±5,27	27,18±13,24	3,27±4,64	43,23±18,68	7,15±6,26
grupo III (fumo e álcool)	39±8,75	5±3,29	29,16±12,10	3,33±2,87	46,94±18,60	8,82±7,07

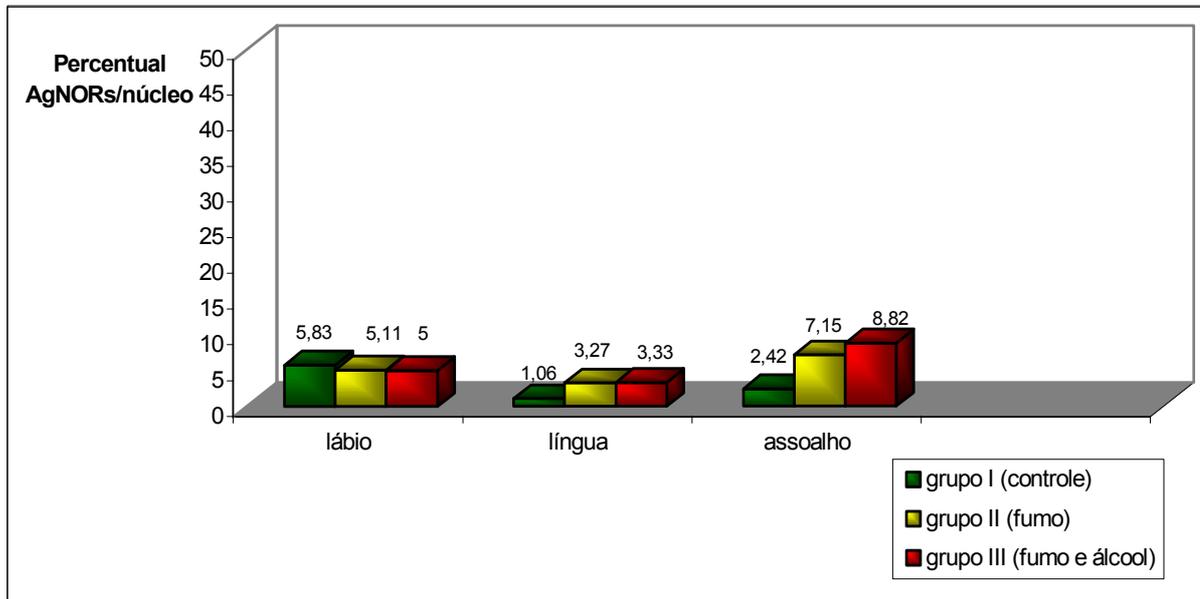
Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 9- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

Gráfico 10- Comparação da média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs no lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal. Porto Alegre. 2002/2003.



Fonte: Pacientes atendidos no DMAE e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre. 2002/2003.

A borda da língua apresentou menor média do número e da área das AgNORs/núcleo e média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparada à mucosa do lábio inferior e assoalho bucal nos três grupos avaliados: grupo I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool) (Tabelas 8 a 10 e Gráficos 7 a 10).

6. DISCUSSÃO

Os estudos epidemiológicos demonstram a alta prevalência do carcinoma espinocelular em homens expostos ao fumo e álcool, acima de 40 anos e em sítios anatômicos preferenciais (KROLLS; HOFFMAN, 1976; RICH; RADDEN, 1986; JOVANOVIC et al., 1993; LLEWELYN; MITCHELL, 1994; De STEFANI et al., 1998; FIORETTI et al., 1998; ZAVRAS et al., 2000; IZARZUGAZA; ESPARZA; AGUIRRE, 2001). Sendo assim, a amostra deste estudo, visando reforçar o caráter preventivo da citopatologia bucal, constitui-se de indivíduos do sexo masculino, acima de 30 anos e expostos ao fumo e álcool.

A técnica de Papanicolaou Modificada e a técnica da AgNOR já foram aplicadas na citopatologia bucal para analisar as alterações celulares na mucosa bucal clinicamente normal, sob a ação isolada do fumo (ZIMMERMAM; ZIMMERMAM, 1965; HILLMAN; KISSIN, 1976; SOARES PINTO, 2000; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001). Este estudo buscou verificar, além da ação do fumo, a ação do álcool na mucosa bucal clinicamente normal. Além dos três grupos existentes (grupo I (controle), grupo II (fumo) e grupo III (fumo e álcool)), planejou-se, inicialmente, incluir um grupo de pacientes expostos somente ao álcool. Entretanto, a dificuldade de selecionar pacientes expostos somente ao álcool, ou mesmo, a subestimação do consumo de álcool relatado pelos pacientes no momento da entrevista, impossibilitaram a obtenção de uma amostra suficiente para completar este grupo. A dificuldade de isolar a ação do álcool e fumo já foi relatada em estudo epidemiológico (RICH; RADDEN, 1986). Considerando que a grande maioria dos pacientes do grupo III (fumo e álcool), associava dois ou mais tipos de bebidas alcólicas, padronizou-se, segundo Fioretti et al. (1998) que 330 ml de cerveja, 120 ml de vinho e 30 ml de bebida destilada continham a mesma quantidade aproximada

de etanol de 12 - 15 mg.

Este estudo resultou, na grande maioria, em esfregaços citológicos classes I e II segundo Papanicolaou e Traut (1947), concordando com os estudos de Silverman, Becks e Farber (1958), Silva e Rados (1997), Kapczinski (1997), Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001), Romanini (1999) e Soares Pinto (2000).

A ocorrência dos esfregaços citológicos classe 0 justifica-se pela natureza seca e maior grau de maturação celular da mucosa do lábio inferior, resultando em esfregaços citológicos com poucas células epiteliais passíveis de análise morfológica, bem como pelo uso da espátula de madeira seca como método de coleta utilizado neste estudo. Ogden, Cowpe e Green (1992) sugerem a utilização do "cytobrush" que confere maior número de células bem distendidas e não sobrepostas ao esfregaço citológico em relação à espátula de madeira. Um ponto positivo a ser considerado é que a coleta do material foi realizada por um pesquisador previamente treinado.

Romanini (1999) e Soares Pinto (2000) atribuíram classe III, segundo classificação de Papanicolaou e Traut (1947), pela presença de células atípicas. No entanto, não descreveram quais as alterações morfológicas presentes nestes esfregaços citológicos. Atribuímos classe III, segundo classificação de Papanicolaou e Traut (1947), na borda da língua e no assoalho bucal de pacientes do grupo II (fumo) não em decorrência da presença de células epiteliais atípicas, mas pela observação de células parabasais em mais de dois campos do esfregaço citológico. Segundo a classificação de Papanicolaou e Traut (1947), a presença de poucas células parabasais representa uma displasia leve. Carvalho (2002) relata que as células parabasais possam significar alguma anormalidade do esfregaço citológico ou excesso de força no momento da coleta do material citológico.

A citologia cérvico-vaginal baseou-se na classificação de Papanicolaou até a formulação do Sistema de Bethesda em 1988 (THE 1988 Bethesda..., 1989) que surge para facilitar a comunicação entre os citopatologistas e os clínicos, a correlação da citologia com a histologia e a pesquisa das doenças cérvico-vaginais, tendo a sua terminologia reformulada em 2001 (SOLOMON et al.,2002). Considerando-se o enfoque da citopatologia bucal como um recurso de diagnóstico prévio ao aparecimento de lesões, utilizou-se o Sistema de Bethesda (2001) com algumas particularidades. Os resultados obtidos foram negativo para lesão intra-epitelial maligna e negativo para lesão intra epitelial maligna com presença de inflamação na quase totalidade dos esfregaços citológicos. Quatro lâminas analisadas foram insatisfatórias para avaliação, pela ausência de cem células adequadas para análise morfológica; e três esfregaços citológicos, um na borda da língua e dois no assoalho bucal de pacientes do grupo II (fumo), foram classificados como (A.S.C.U.S) pela presença das células parabasais em pelo menos dois campos da lâmina (Tabela 3). Classificaram-se as células parabasais como atípicas de significado indeterminado (A.S.C.U.S), já que o termo atipia no Sistema de Bethesda (2001) não se refere a alterações celulares inflamatórias, pré-neoplásicas ou neoplásicas e, como já mencionado, o significado deste tipo celular no esfregaço citológico permanece incerto (CARVALHO, 2002).

Acreditamos que a presença das células parabasais não seja decorrente de força excessiva no momento da coleta de material, já que os esfregaços citológicos dos três grupos avaliados foram realizados por um pesquisador previamente treinado. A ocorrência deste tipo celular em mais de dois campos da lâmina de pacientes expostos ao fumo, observada em nosso estudo, associado aos achados de Silva e Rados (1997) que constataram células parabasais em esfregaços

citológicos de fumantes, sugere uma alteração do padrão de maturação celular. Os pacientes que obtiveram o diagnóstico de classe III ou A.S.C.U.S, segundo classificação de Papanicolaou e Traut (1947) e Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal, estão em controle através do exame clínico e da realização de novo esfregaço citopatológico na Faculdade de Odontologia da UFRGS. O significado da presença de células parabasais na citopatologia bucal deve ser confirmado com a realização de novos estudos, considerando a possibilidade de este tipo celular indicar alteração precoce frente aos carcinógenos fumo e álcool.

A utilização de diferentes critérios para definição do padrão de maturação celular da cavidade bucal dificultou a comparação entre os estudos. Montgomery (1951), Silverman, Becks e Farber (1958), Zimmermam e Zimmermam (1965), Meyer, Rubinstein e Medak (1970) e Hillman e Kissin (1976) valorizaram mais a coloração do citoplasma do que a morfologia nuclear para a definição do tipo celular. Já Kapczinski (1997) e Silva e Rados (1997) determinaram o tipo celular segundo a morfologia do núcleo, considerando a coloração do citoplasma em casos de indefinição. Adotamos a morfologia nuclear, como critério para determinar o tipo celular devido à existência de células com o citoplasma apresentando mais de uma tonalidade de cor, tornando ambíguo o critério que considera a coloração do citoplasma.

Na análise do padrão de maturação celular entre os sítios anatômicos nos três grupos avaliados (grupo I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool)), constatou-se o predomínio de células anucleadas na mucosa do lábio inferior e diminuição das células superficiais com núcleo no assoalho bucal. Com relação ao número das células intermediárias, observou-se uma diminuição progressiva no assoalho bucal,

borda da língua e mucosa do lábio inferior (Tabelas 4 a 6 e Gráficos 2 a 4). Todas estas observações apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Considerando os diferentes critérios utilizados para definição do padrão de maturação celular, outros estudos também confirmaram que cada sítio anatômico da mucosa bucal clinicamente normal possui um padrão de maturação celular próprio (MONTGOMERY, 1951; SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958; KAPCZINSKI, 1997; SILVA; RADOS, 1997).

Na mucosa do lábio inferior e na borda da língua, observou-se, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$), uma diminuição das células superficiais com núcleo no grupo III (fumo e álcool) em relação ao grupo I (controle), associada a uma tendência no aumento das células anucleadas nestes dois sítios anatômicos do grupo III (fumo e álcool). Sugere-se uma maior ceratinização da mucosa do lábio inferior e da borda da língua quando expostas ao fumo e ao álcool (Tabelas 4 e 5 Gráficos 2 e 3). No assoalho bucal, a diminuição das células superficiais com núcleo com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) no grupo III (fumo e álcool) em relação ao grupo I (controle), ocorreu em decorrência do aumento das células intermediárias e evidencia possível aumento da velocidade de renovação celular (Tabela 6 e Gráfico 4). Este achado concorda com Kapczinski (1997) que também observou a diminuição das células superficiais com núcleo no assoalho bucal de pacientes fumantes em decorrência do aumento das células intermediárias. Zimmermam e Zimmermam (1965), Meyer, Rubinstein e Medak (1970) e Hillman e Kissin (1976) constataram um aumento da velocidade de renovação celular na mucosa bucal de fumantes, devido ao aumento das células com menor grau de maturação celular. Já Silva e Rados (1997) observaram o aumento do número das células anucleadas no assoalho bucal de fumantes com diferença estatisticamente

significante. Baláez et al. (1986) e Baláez, Díaz e Pérez (1989) constataram maior grau de ceratinização no palato e mucosa jugal de fumantes.

A quantificação dos tipos celulares da mucosa bucal, utilizando a técnica de Papanicolaou Modificada, exprimiou o grau de maturação celular dos diferentes sítios anatômicos. Apesar da exposição sinérgica do fumo e álcool ter alterado o padrão de maturação celular na mucosa do lábio inferior, na borda da língua e no assoalho bucal, a discrepância dos resultados dos estudos (ZIMMERMAM;ZIMMERMAM, 1965, MEYER;RUBINSTEIN;MEDAK, 1970; HILLMAN; KISSIN, 1976; BALÁEZ et al., 1986; BALÁEZ;DÍAZ; PÉREZ, 1989; KAPCZINSKI, 1997; SILVA; RADOS, 1997) limita a sua utilização para identificação de alterações precoces do epitélio bucal. Com base nestes aspectos, concordamos com a afirmação de Ogden (1997) ao mencionar que a morfologia celular na citopatologia bucal tem um caráter subjetivo e limitado, necessitando associação com outros marcadores para melhor acurácia no diagnóstico precoce.

Diversos estudos confirmam a utilização da técnica da AgNOR como um marcador de proliferação celular (TRERÈ; PESSION; DERENZINI, 1989; DERVAN et al., 1989; SANJAY; SINGH; BLATIA, 1995; COSTA et al., 1999; THEREÈ et al., 1991; CHU et al., 2001; DERENZINI et al., 2000). A citologia esfoliativa é favorecida pela utilização do álcool como fixador (TRERÈ, 2000) e possibilita a avaliação de todo o núcleo (MAO, 1995; SUJATHAN et al., 1996). Entretanto, na citopatologia bucal, a técnica da AgNOR fica prejudicada pela presença de muco que tem afinidade com a prata. No presente trabalho, esta foi a razão principal da perda dos esfregaços citológicos. Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) observaram o mesmo entrave na aplicação desta técnica na cavidade bucal. Sugere-se a utilização de outros métodos de coleta, como a citologia em meio líquido, que resultem em menor

quantidade de muco e restos alimentares nos esfregaços citológicos da cavidade bucal.

Analisando a média de idade dos três grupos (I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool)), constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre o grupo I (controle) e grupo III (fumo e álcool), comparado ao grupo II (fumo) (Tabela 1 e Gráfico 1). Porém, Sampaio et al. (1999) e Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) demonstraram que a idade não influenciou a atividade de proliferação celular, já que não observaram correlação entre a média de idade e a média do número das AgNORs/núcleo.

A atividade de proliferação celular avaliada pela técnica da AgNOR foi utilizada em sítios anatômicos de maior prevalência do carcinoma espinocelular bucal (KROLLS; HOFFMAN, 1976; RODER, 1982; RICH; RADDEN, 1986; JOVANOVIC et al., 1993; LEWELYN; MITCHELL, 1994), utilizando, como parâmetros, a média do número e da área das AgNORs/núcleo e a média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs. A contagem das AgNORs, apesar das recomendações de Crocker et al. (1989), é subjetiva e pouco reproduzível, enquanto a mensuração da área das AgNORs é mais reproduzível e precisa (TRERÈ, 2000). Carbonelli et al. (1994) e Schwint et al. (1996) constataram que a mensuração da área das AgNORs foi mais sensível na detecção de alterações celulares. O uso da média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs baseou-se no estudo de Xie et al. (1997) que constataram 70% dos núcleos de epitélio normal apresentarem 1 ou 2 AgNORs e de Giri et al. (1989)b que observaram núcleos com mais de 3 AgNORs serem sugestivos de malignidade. Já a utilização da média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs fundamentou-se no estudo de Chern et al. (1997) que observaram a média das AgNORs/núcleo em todas as lesões benignas pulmonares

avaliadas através da citologia esfoliativa não ultrapassarem valor de 5. Xie et al. (1997) observaram que aproximadamente 60% dos núcleos de carcinomas espinocelulares bucais apresentaram 5 ou mais AgNORs. Acreditamos que, com a realização somente da média do número das AgNORs/núcleo, subestima-se a presença de células com maior atividade proliferativa, ou seja, núcleos com mais de 3 AgNORs.

A borda da língua apresentou menor atividade de proliferação celular em relação à mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal em todos os grupos estudados (I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool)), já que se constatou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) para os parâmetros da média do número e da área das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs (Tabelas 8 a 10 e Gráficos 7 a 10). Apesar do *turnover time* (tempo necessário para substituir todas as células do epitélio) ser menor no epitélio não ceratinizado, comparado ao epitélio ceratinizado (TEN CATE, 1994), não se observou diferença de proliferação celular entre a mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal nos grupos estudados (I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool)). Constatou-se que a atividade de proliferação celular comportou-se de maneira semelhante no epitélio ceratinizado e não ceratinizado. Pillai et al. (1994) confirmaram esta observação ao não constatarem diferença estatisticamente significativa da média do número das AgNORs/núcleo entre a mucosa gengival e a mucosa jugal clinicamente normal. Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) sugeriram que o epitélio não ceratinizado da mucosa bucal é mais suscetível à ação do fumo do que o epitélio ceratinizado, visto que observaram diferença estatisticamente significativa na média do número das AgNORs/núcleo entre a borda da língua e o assoalho bucal, somente nos fumantes. Não observamos este achado, visto que a proliferação celular na

mucosa do lábio inferior e no assoalho bucal, expostos ou não ao fumo e ao fumo e álcool, manteve-se semelhante.

A mucosa bucal exposta ao fumo e ao fumo e álcool tem a sua atividade de proliferação celular aumentada. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre o grupo II (fumo) e III (fumo e álcool) em relação ao grupo I (controle) na mucosa do lábio inferior, borda da língua e no assoalho bucal, para a média do número e da área das AgNORs/núcleo (Tabelas 8 e 9 e Gráficos 7 e 8). No parâmetro da média percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre o grupo II (fumo) e III (fumo e álcool) em relação ao grupo I (controle) na borda da língua e no assoalho bucal. (Tabela 10 e Gráfico 9). Este achado concorda com o estudo de Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) que observaram, com diferença estatisticamente significativa, maior média do número das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 3 e 5 AgNORs nos fumantes em relação aos não fumantes, na borda da língua e no assoalho bucal. Sampaio et al. (1999) constataram, com diferença estatisticamente significativa, maior média do número das AgNORs/núcleo e da média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs na mucosa jugal de fumantes. Soares Pinto (2001) observou, com diferença estatisticamente significativa, maior média do número das AgNORs/núcleo no assoalho bucal de fumantes. Com relação à média percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs, observamos uma tendência de valores maiores no grupo II (fumo) e III (fumo e álcool) na borda da língua e no assoalho bucal, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) (Tabela 10 e Gráfico 10). A amostra deste estudo deve ter sido insuficiente, considerando que Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) e Sampaio et al. (1999) observaram diferença estatisticamente significativa para este parâmetro.

A ação de outros agentes, como a exposição solar, não controlados neste estudo devem ter influenciado na atividade de proliferação celular da mucosa do lábio inferior. Observou-se menor discrepância dos valores das médias das AgNORs em todos os parâmetros entre os grupos I (controle), II (fumo) e III (fumo e álcool) quando comparados aos da borda da língua e do assoalho bucal (Tabela 8 a 10 e Gráficos 7 a 10). Este achado concorda com Soares Pinto (2001) que constatou uma semelhança da média do número das AgNORs/núcleo no lábio inferior de fumantes e não fumantes.

Trerè et al. (1991), Antonangelo et al. (1994) e Ceccarelli et al. (2000) relacionaram a área das AgNORs/núcleo com proliferação celular, com distinção de lesão benigna e maligna e com predição de prognóstico, respectivamente. Carbonelli et al. (1994) e Schwint et al. (1996) constataram que a área das AgNORs/núcleo foi o parâmetro mais sensível na detecção de alterações celulares no processo de carcinogênese induzido em animais. Baseado nestas constatações, decidiu-se incluir neste estudo o parâmetro da média da área das AgNORs/núcleo, não avaliado previamente em trabalhos de metodologia semelhante (SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001; SOARES PINTO, 2001). No entanto, neste trabalho, observou-se que a utilização da média da área das AgNORs/núcleo não foi mais sensível para avaliar a atividade de proliferação celular quando comparada à contagem das AgNORs. Trerè (2000) referiu-se à contagem das AgNORs como um método subjetivo. Entretanto, na mucosa bucal normal, o padrão das AgNORs, como pontos pretos arredondados, homogêneos e em pequeno número dentro do núcleo (CHATTOPADHYAY et al., 1994; XIE et al., 1997; SAMPAIO et al., 1999; SOARES PINTO, 2001; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001), facilita a utilização do método de contagem, tornando-o mais reproduzível. A

média do número das AgNORs/núcleo obtidos nos outros estudos que utilizaram a citopatologia na mucosa bucal clinicamente normal variou entre 1,79 e 3,53. (SAMPAIO et al., 1999; SOARES PINTO, 2001; CANÇADO; YURGEL; SANT'ANNA, 2001). Neste trabalho, a média do número das AgNORs/núcleo oscilou de 2,22 a 3,57 (Tabela 8 e Gráfico 7). A semelhança das médias do número das AgNORs/núcleo resultou também da padronização da técnica e do critério de contagem adotado nestes trabalhos. Nas neoplasias malignas, as AgNORs são irregulares, estão em maior número e dispersas pelo núcleo (HOWAT et al., 1988; GIRI et al., 1989; CARDILLO et al., 1992; CHERN et al., 1997; SUJATHAN et al., 1996; CORTEZ-GUTIÉRREZ et al., 2001), dificultando o método de contagem das AgNORs. Avaliando a média do número das AgNORs/núcleo em carcinomas espinocelulares bucais, constatou-se uma variação de 3,48 a 9,74 (SANO et al., 1992; CHATTOPADHYAY et al., 1994). Sendo assim, a utilização da média da área das AgNORs/núcleo é mais precisa em células com alto índice de proliferação celular, como sugerido por Toikkanen et al. (1992) e Ceccarelli et al. (2000) em relação aos tumores de mama.

A citopatologia bucal deve ser usada em indivíduos expostos cronicamente ao álcool e fumo e em sítios anatômicos de maior prevalência do câncer bucal (SUGERMAN; SAVAGE, 1996), visto que os constituintes genotóxicos e carcinógenos resultantes da queima do tabaco são considerados agentes iniciadores (LÖFROTH, 1988; FRANKS, 1996) e o acetaldeído, primeiro produto metabólico do etanol, um agente promotor da carcinogênese bucal (Timmons; Nwankwa; Domann, 2002). A técnica da AgNOR é um marcador que detecta alterações de proliferação celular ocorridas na fase de promoção da carcinogênese (CARBONELLI et al., 1994). Neste estudo, constatou-se que a média do número das AgNORs/núcleo foi

suficiente para informar com acurácia a atividade de proliferação celular da mucosa bucal clinicamente normal, viabilizando o uso da técnica da AgNOR em âmbito populacional, já que a contagem das AgNORs/núcleo é de fácil execução e de baixo custo quando comparada ao método morfométrico (Chern et al., 1997, Trerè, 2000). A mucosa bucal exposta ao fumo e ao fumo e álcool tem a sua atividade de proliferação celular aumentada. Entretanto, concordamos com Cançado, Yurgel e Sant'Anna (2001) na necessidade de um estudo prospectivo para determinar o valor da técnica da AgNOR na citopatologia bucal como monitoramento de indivíduos expostos a estes carcinógenos.

7. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia deste estudo e baseado na análise dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os sítios anatômicos avaliados apresentaram diferentes padrões de maturação celular
- O fumo e o fumo e álcool aumentaram a atividade de proliferação celular da mucosa clinicamente normal do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal
- A borda da língua teve menor atividade de proliferação celular quando exposta, ou não, ao fumo ou ao fumo e álcool quando comparada à mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal
- A média do número das AgNORs/núcleo foi suficiente para avaliar a atividade de de proliferação celular da mucosa clinicamente normal do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

THE 1988 Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses.

Developed and Approved at the national Cancer Institute Workshop, Bethesda,

Maryland, USA, December 12-13, 1988. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 35, no. 5, p. 567-574, Sept./Oct. 1989.

ANTONANGELO, L. et al. Utility of Computerized Morphometry Combined with AgNOR Staining in Distinguishing Benign from Malignant Pleural Effusions. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 16, no. 4, p. 247-252, Aug. 1994.

BALÁEZ, A. B. ; DÍAZ, E. M. ; PERÉZ, H. R. Influencia de la edad, duracion del habito de fumar y consumo de cigarrillos sobre los indices de queratinizacion de la mucosa bucal. **Rev. Cub. Estomatol.**, Havana, v. 6, n. 1-2, p. 87-95, ene./jun. 1989.

BALÁEZ, A. B. et al. Modificaciones de los indices de exfoliacion celular en la mucosa del paladar y carrilo de fumadores de tabacos (puros). **Rev. Cub. Estomatol.**, Havana, v. 23, n. 3, p. 177-181, set./dic. 1986.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative Cytology Examinations in the Early Diagnosis of Oral Cancer. **Int. Dent. J.**, Bristol, v. 26, no. 4, p. 398-404, Dec. 1976.

BIRD, R. P. ; DRAPER, H. H. ; BASRUR, P. K. Effect of Malonaldehyde and Acetaldehyde on Cultured Mammalian Cells. Production of Micronuclei and Chromosomal Aberrations. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 101, no. 3, p. 237-246, May 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil: 2003.** Disponível em:

[http:// < www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregiões >](http://www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregiões). Acesso em: 22 maio 2003.

BUYS, C. H.; OSINGA, J. Abundance of Protein - Bound Sulfhydryl and Disulfide Groups at Chromosomal Nucleolus Organizing Regions: A Cytochemical Study on the Selective Silver Staining of NORs. **Chromosoma**, Berlin, v. 77, no.1, p. 1-11, 1980.

CABRINI R. L. et al. Morphometric Study of Nucleolar Organizer Regions in Human Oral Normal Mucosa, Papilloma and Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 6, p. 275-279, July 1992.

CALIFANO, J. et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, no. 11, p. 2488-2492, June 1996.

CANÇADO, R. P. ; YURGEL, L. S. ; FILHO, M. S. Evaluation of 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, July 2001.

CARBONELLI, D. L. et al. Nucleolar Organizer as a Marker of Incipient Transformation in a Model of Experimental Carcinogenesis. **Virchows Archiv.**, Berlin, v. 425, no. 2, p. 165-170, May 1994.

CARDILLO, M. R. Ag - NOR Technique in Fine Needle Aspiration Cytology of Salivary Gland Masses. **Acta Cytol**, St Louis, v. 36, no. 2, p.147-151, Mar./Apr. 1992.

CARVALHO, G. Estudo dos Epitélios Escamoso e Glandular da Cavidade Oral e das Células que Deles Descamam; Suas Relações e Interpretações. In:_____. **Citologia Oral**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. Cap. 3, p. 9-17.

CECCARELLI, C. et al. AgNORs in Breast Tumours. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p.143-149, Apr. 2000.

CHATTOPADHYAY, A. ; CHAWDA, J. G. ; DOSHI, J. J. Silver – Binding Nucleolar Organizing Regions: A Study of Oral Leukoplasias and Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**, Copenhagen, v. 23, no. 6 Pt1, p. 374-377, Dec. 1994.

CHERN, J. H. ; LEE, Y. C. ; YANG, M. H. Usefulness of AgNOR Score in Differentiating Benign from Malignant Pulmonary Aspiration Cytology. **Acta Cytol**, St. Louis , v. 41, no. 2, p. 393-398, Mar./Apr. 1997.

CHU, R. M. et al. Proliferation Characteristics of Canine Transmissible Veneral Tumor. **Anticancer Res**, Atenas, v. 21, no. 6A, p. 4017-4024, Nov./Dec. 2001.

COSTA, A. de L. et al. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR Double Staining in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med**, Copenhagen, v. 28, no. 10, p. 438-441, Nov. 1999.

CROCKER, J. ; BOLDY, D. A. R. ; EGAN, M. J. How Should we Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. **J. Pathol.**, Chichester, v. 158, no. 3, p. 185-188, July 1989.

DE STEFANI, E. et al. Diet and Risk of Cancer of the Upper Aerodigestive Tract. II. Nutrients. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 1, p. 22-26, Jan. 1999.

DE STEFANI. E. et al. Hard Liquor Drinking is Associated with Higher Risk of Cancer of the Oral Cavity and Pharynx than Wine Drinking. A Case – Control Study in Uruguay. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 2, p. 99-104, Mar. 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissues. **J. Pathol.**, Chichester, v. 191, no. 2, p. 181-186, June 2000.

DERVAN, P. A. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Counts Correlate with Ki67 Scores. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 92, p. 401-407, 1989.

FARTHING, P. M. ; LESLEY, W. J. Changes in Immune Function with Age. In: SQUIER, C. A.; HILL, M. W. **The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin**. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap. 13, p. 113-120.

FIORETTI, F. et al. Risk Factors for Oral Pharyngeal Cancer in Never Smokers. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 4, p. 375-378, July 1999.

FOLSOM, T. C. et al. Oral Exfoliative Study: Review of the Literature and Report of Three Year Study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis , v. 33, no. 1, p. 61-74, Jan. 1972.

FONSECA, I. ; SOARES, J. Adenoid Cystic Carcinoma : A Study of Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) Count and the Relation to Prognosis. **J. Pathol.**, Chichester , v. 169, no. 2, p. 255-258, Feb. 1993.

FRANKS, L. M. What is cancer ? In: FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. 3rd. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996. Cap. 1, p. 1-20.

GAIGER, M. de O. et al. Quantificação de AgNORs e Expressão do PCNA em Ceratocisto Odontogênico. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 43, n. 2, p. 51-56, dez. 2001.

GIRI, D. D. et al. Silver – Binding Nucleoli and Nucleolar Organizer Regions in Fine Needle Aspiration Cytology of the Breast. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 33, no. 2, p. 173-175, Mar./Apr. 1989a.

GIRI, D. D. et al. Silver – Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Benign and Malignant Breast Lesions: Correlations with Ploidy and Growth Phase by DNA Flow Cytometry. **J. Pathol.**, Chichester, v. 157, no. 4, p. 307-313, Apr. 1989b.

GOODPASTURE, C. ; BLOOM, S. E. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, no. 1, p. 37-50, Nov. 1975.

HILLMAN, R. W. ; KISSIN, B. Oral Cytologic Patterns in Relation to Smoking Habits. Some Epithelial, Microfloral, and Leucocytic Characteristics. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 42, no. 3, p. 366-374, Sept. 1976.

HOMANN, N. et al. Poor Dental Status Increases Acetaldehyde Production from Ethanol in Saliva: A Possible Link to Increased Oral Cancer Risk Among Heavy Drinkers. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 2, p. 153-158, Feb. 2001.

HOWAT, A. J. et al. Silver –Stained Nucleoli and Nucleolar Organizer Region Counts are of No Prognostic Value in Thick Cutaneous Malignant Melanoma. **J. Pathol.**, Chichester, v. 156, no. 3, p. 227-232, Nov. 1988.

IZARZUGAZA, M. I. ; ESPARZA, H. ; AGUIRRE, J. M. Epidemiological Aspects of Oral and Pharyngeal Cancers in the Basque Country. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 30, no. 9, p. 521-526, Oct. 2001.

JOVANOVIC, A. et al. Squamous Cell Carcinoma of the Lip and Oral Cavity in the Netherlands: An Epidemiological Study of 740 Patients. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 21, no. 4, p. 149-152, June 1993a.

JOVANOVIC, A. et al. Tobacco and Alcohol Related to the Anatomical Site of Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, no. 10, p. 459-462, Nov. 1993b.

KAPCZINSKI, M. P. **Estudo das Células Epiteliais em Mucosa Bucal Clinicamente Normal de Mulheres através do Uso da Citologia Esfoliativa.** 1997. 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KHAN, E. M. ; PANDEY. R. Differential Diagnosis of the Fine Needle Aspiration Smears of Thyroid Nodules. Cytologic Features and AgNORs. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 40, no. 5, p. 959-962, Sept./Oct. 1996.

KROLLS, S. O. ; HOFFMAN, S. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Soft Tissues: A Statistical Analysis of 14,253 Cases by Age, Sex, and Race of Patients. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 92, no. 3, p. 571-574, Mar. 1976.

LLEWELYN, J. ; MITCHELL, R. Smoking, Alcohol and Oral Cancer in South East Scotland: A 10 Year Experience. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 32, no. 3, p. 146-152, June 1994.

LÖFROTH, G. Environmental Tobacco Smoke: Overview of Chemical Composition and Genotoxic Components. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 222, no. 2, p. 73-80, Feb. 1989.

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, Sept. 1995.

MEYER, J. ; RUBINSTEIN, A. S. ; MEDAK, H. Early Effects on Surface Cytology of the Oral Mucosa. Cell Changes in Smokers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 30, no. 5, p. 700-710, Nov. 1970.

MIGALDI, M. et al. p 120 and AgNOR Nucleolar Protein Expression. A Comparison with Nuclear Proliferation Markers in Oral Pathology. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 85, no. 2, p. 189-196, Feb. 1998.

MILLER, D. A. et al. Suppression of Human Nucleolus Organizer Activity in Mouse - Human Somatic Hybrid Cells. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 101, no. 2, p. 235-243, Sept. 1976.

MONTGOMERY, P. W. A Study of Exfoliative Cytology of Normal Human Oral Mucosa. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 30, no. 1, p. 12-18, Feb. 1951.

MOORE, S. R. et al. The Epidemiology of Lip Cancer: A Review of Global Incidence and Aetiology. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 5, no. 3, p. 185-195, July 1999.

MOSGOELLER, W. ; JORDAN, E. G. ; HERNANDEZ - VERDUN, D. News and Views on the Nucleolus in 1996. Report on the 'Coloquium on the Nucleolus', a Meeting at Paris-Grignon, July 18-20. **Biol. Cell**, Paris, v. 88, no. 1-2, p. 1-4, July 1996.

MUNERATO, C. J. et. al. Avaliação Quantitativa da Expressão da Proteína PCNA e das AgNORs em Ameloblastomas. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 41, n. 1, p. 39-43, jul. 2000.

OGDEN, G.R. The Future Role for Oral Exfoliative Cytology - Bleak or Bright ? **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, no. 1, p. 2-4, Jan. 1997.

OGDEN, G. R. ; COWPE, J. G. ; GREEN, M. W. Quantitative Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa: Effect of Smoking. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, no. 2, p. 53-55, Feb. 1990.

OGDEN, G. R. ; WIGHT, A. J. ; COWPE, J. G. Quantitative Oral Exfoliative Cytology. Effect of alcohol on Normal Buccal Mucosa. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 21, no. 2, p. 126-130, Apr. 1999.

PAPANICOLAOU, G. N. ; TRAUT, H. F. The Diagnostic Value of Vaginal Smears in Carcinoma of the Uterus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 42, no. 2, p. 193-206, Aug. 1941.

PAPANICOLAOU, G. N. ; TRAUT, H. F. **Diagnosis of Uterine Cancer by Vaginal Smears**. New York: Commonwealth Foundation, 1947. 75p.

PILLAI, K. R. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in the Evaluation of Tumour Progression in the Oral Mucosa: Correlation with Tissue Pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, Berlin, v. 120, no. 12, p. 723-726, Aug. 1994.

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.**, Dordrecht, v. 18, no. 1, p. 5-14, Jan. 1986.

RATH - WOLFSON, L. et al. Nucleolar Organizer Regions in Breast Cytology Material. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 39, no. 5, p. 852-857, Sept./Oct. 1995.

REIS, S. R. et al. Efeito Genotóxico do Etanol em Células da Mucosa Bucal. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 221-225, 2002.

REIS, S. R. de A. et al. Fatores de Risco do Câncer da Cavidade Oral e da Orofaringe. I. Fumo, Álcool e Outros Determinantes. **RPG.**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 127-132, abr./maio/jun. 1997.

RICH, A. M. ; RADDEN, B. G. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Mucosa: A Review of 244 Cases in Australia. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 13, no. 5, p. 459-471, Oct. 1984.

RODER, D. Oral Cancer in South Australia - Incidence and Case Survival. **Aus. Dent. J.**, Sydney, v. 29, no. 5, p. 312-315, Oct. 1983.

ROMANINI, J. **Utilização da Citopatologia em Campanha de Prevenção do Câncer Bucal**. 1999. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROVIN, S. An Assessment of the Negative Oral Cytologic Diagnosis. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 74, no. 4, p. 759-762, Mar. 1967.

SAMPAIO, H. de C. et al. AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of smoking. **Acta Cytol**, St. Louis , v. 43, no. 2, p. 117-120, Mar./Apr. 1999.

SANDLER, H. C. Reliability of Oral Exfoliative Cytology for Detection of Oral Cancer. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 68, no. 5, p. 489-499, Apr. 1964.

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, Aug. 1960.

SANO, K. et al. Prognostic Implication of Silver – Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, no. 2, p. 53-56, Feb. 1991.

SCHWINT, A. E. et al. AgNOR Mark Epithelial Foci in Malignant Transformation in Hamster Cheek Pouch Carcinogenesis. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, no. 1, p. 20-24, Jan. 1996.

SILVA, M. C. A. ; RADOS, P. V. Citopatologia: Um Recurso Auxiliar na Prevenção do Câncer Bucal em Pacientes do Sexo Masculino. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 38, n. 2, p. 3-10, dez. 1997.

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

SINHA, S. K. ; SINGH, U. R. ; BHATIA, A. C-erb B2 Oncoprotein Expression. Correlation with the Ki-67 Labeling Index and AgNOR Counts in Breast Carcinoma on Fine Needle Aspiration Cytology. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 40, no. 6, p. 1217-1220, Nov./Dec. 1996.

SIRRI, V. et al. Amount of the Two Major Ag - NOR Proteins, Nucleolin, and Protein B23 is Cell - Cycle Dependent. **Cytometry**, Baltimore, v. 28, no. 2, p. 147-156,

June 1997.

SOARES PINTO, T. A. **Quantificação do Número de AgNORs em Células Descamadas da Mucosa Bucal e sua Relação com o Tamanho do Núcleo em Indivíduos Fumantes**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **JAMA**, Chicago, v. 287, no. 16, p. 2114-2119, Apr. 2002.

SPECTOR, D. L. ; OCHS, R. L. ; BUSCH, H. Silver Staining, Immunofluorescence, and Immunoelectron Microscopic Localization of Nucleolar Phosphoproteins B23 and C23. **Chromosoma**, Berlin, v. 90, no. 2, p. 139-148, 1984.

STICH, H. F. ; ROSIN, M. P. Quantitating the Sinergistic Effect of Smoking and Alcohol Consumption with the Micronucleus Test on Human Buccal Mucosa Cells. **Int. J. Cancer**, New York, v. 31, no. 3, p. 305-308, Mar. 1983.

SUGERMAN, P. B.; SAVAGE, N. W. Exfoliative Cytology in Clinical Oral Pathology. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 41, no. 2, p. 71-74, Apr. 1996.

SUJATHAN, K. et al. Significance of AgNOR Count in Differentiating Malignant Cells from Reactive Mesothelial Cells in Serous Effusions. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 40, no. 4, p. 724-728, July/Aug. 1996.

TAN, K. N. Cancer of the Lip in Australia. **Aus. Dent. J.**, Sydney, v. 15, no. 3, p. 179-184, June 1970.

TEN CATE, A. R. Oral Mucosa. In:_____. **Oral Histology**. Development, Structure, and Function. 4thed. St Louis: Mosby, 1994. Cap. 18, p 397-401.

TIMMONS, S. R. ; NWANKWO, J. O. ; DOMANN, F. E. Acetaldehyde Activates Jun/AP-1 Expression and DNA Binding Activity in Human Oral keratinocytes. **Oral**

Oncol., Oxford, v. 38, no. 3, p. 281-290, Apr. 2002.

TOIKKANEN, S. ; JOENSUU, H. AgNOR Counts Have No Prognostic Value in Breast Cancer. **J. Pathol.**, Chichester, v. 169, no. 2, p. 251-254, Feb. 1993.

TREERÈ, D. AgNOR Staining and Quantification. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 127-131, Apr. 2000.

TREERÈ, D.; PESSIÒN, A.; DERENZINI, M. The Silver-Stained Proteins of Interphasic Nucleolar Organizer Regions as a Parameter of Cell Duplication Rate. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 184, no. 1, p. 131-137, Sept. 1989.

TREERÈ, D. et al. AgNOR Area in Interphase Nuclei of Human Tumours Correlates with the Proliferative Activity Evaluated by Bromodeoxyuridine Labelling and Ki - 67 Immunostaining. **J. Pathol.**, Chichester, v. 165, no. 1, p. 53-59, Sept. 1991

UNDERWOOD, J. C. E. (Ed.). **Pathology of the Nucleus**. Berlin : Springer-Verlag, 1990. (Current Topics in Pathology, 82).

VELLY, A. et al. Relationship Between Dental Factors and Risk of Upper Aerodigestive Tract Cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 4, p. 284-291, July 1998.

WARNAKULASURIYA, K. A . A. S. ; JOHNSON, N. W. Nucleolar Organizer Region (NOR) Distribution as a Diagnostic Marker in Oral Keratosis, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, no. 2, p. 77-81, Feb. 1993.

WIGHT, A. J. ; OGDEN, G. R. Possible Mechanisms by which Alcohol May Influence the Development of Oral Cancer - A Review. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 6, p. 441-447, Nov. 1998.

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, June 1997.

ZAVRAS, A.I. et al. Smoking and Alcohol in the Etiology of Oral Cancer: Gender - Specific Risk Profiles in the South of Greece. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 1, p. 28-35, Jan. 2001.

ZHENG, T. et al. Risk of Tongue Cancer Associated with Tobacco Smoking and Alcohol Consumption: A Case – Control Study. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, no. 2, p. 82-85, Mar. 1997.

ZIMMERMAN, E. R. ; ZIMMERMAN, A. L. Effects of Race, Age, Smoking Habits, Oral and Systemic Disease on Oral Exfoliative Cytology. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 44, no. 4, p. 627-631, July/Aug. 1965.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

CONSENTIMENTO INFORMADO

- I- Justificativa e objetos da pesquisa: avaliar, através da quantificação do conteúdo de DNA e da quantificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs), o efeito do álcool e do fumo, sobre as células da mucosa bucal normal.
- II- Procedimentos que serão realizados e seus propósitos: serão realizados dois esfregaços mediante a utilização de uma espátula de madeira , de três áreas anatômicas bucais de maior prevalência de câncer: vermelhão do lábio, borda de língua e soalho bucal. Será utilizada uma espátula de madeira para a raspagem de cada indivíduo. Como esta pesquisa busca estudar a existência de mudanças no padrão de descamação celular da mucosa dos pacientes, 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: 3316.50.23 ou 3316.50.11).

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

Requisição para exame citopatológico

Dados do Paciente

Nome : -----

Data de nascimento: ---/---/---- Idade:----- Sexo:----- Raça:-----

Profissão:-----

Endereço: -----

Cidade:----- CEP: -----

Telefone: -----

Doenças sistêmicas:-----

Medicamentos:-----

Hábitos:

Café: quantidade de xícaras por dia -----

Chimarrão: quantidade de cuias por dia -----

Fuma ? ----- Quantidade de cigarros por dia ----- Há quanto tempo?-----

Já fumou ?-----Quantos cigarros fumava por dia?-----Parou há quanto tempo?---

Ingere álcool? Tipo: -----Quantidade de doses por dia -----Há quanto tempo?-----

Já ingeriu álcool? ----- Tipo:-----Quanto ingeria por dia?-----Parou há quanto tempo?-----

ANEXO C

TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA 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 colóide de prata deve ser preparada, na hora de uso, pela dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, misturada numa proporção de 1:2 partes, com solução aquosa de nitrato de prata em concentração de 50%.

Duas lavagens em água destilada aquecida a 45 °C, para facilitar a remoção da gelatina e, uma em água destilada na temperatura ambiente.

Reidratação em três banhos de álcool etílico absoluto

Clareamento em xilol

Montagem em Permout (Fisher ChemAlert®).

*A técnica foi adaptada por Isabel Lauxen e Márcia Oliveira para utilização em esfregaços citológicos da mucosa bucal. O tempo e a temperatura de impregnação pela prata devem ser adaptados de acordo com o tecido em estudo. (Laboratório de Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia da UFRGS. Fone: (051) 3316-5023. E-mail: ppgod@ufrgs.br

ANEXO D

*TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO

Álcool absoluto 15 segundos;

Álcool absoluto 15 segundos;

Álcool absoluto 15 segundos;

Álcool absoluto 15 segundos;

Água destilada 15 segundos;

Hematoxilina de Harris, com 0.5 g de Ácido Acético Glacial – 60 segundos;

Descansar em papel absorvente;

Lavar em água corrente até que esta permaneça límpida;

Carbonato de Lítio** 0,25% durante 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Orange G6 durante 60 segundos, com Ácido Fosfotúngstico (0,15 g/l);

Descansar em papel absorvente;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Policromo*** durante 3 minutos;

Descansar em papel absorvente;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Álcool 15 segundos;

Descansar em papel absorvente;

Xilol durante 5 minutos;

Xilol durante 5 minutos;

Montagem com Bálsamo do Canadá;

*Técnica preconizada por Papanicolaou (1941) e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo utilizada no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**O Carbonato de Lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada. Deve-se trocar a solução, no momento que ocorrer turvamento.

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

ANEXO E

Crítérios para Análise Morfológica dos Esfregaços Obtidos pelo Método de Papanicolaou Modificado.

Os critérios utilizados para análise da morfologia celular seguiram os mesmos citados por Papanicolaou e Traut (1947), como indicativos de malignidade. Sendo estes:

Presença de núcleos aumentados

Aumento da relação núcleo/citoplasma

Hipercromatismo nuclear

Alterações no padrão de distribuição da cromatina nuclear

Espessamento acentuado e irregular da membrana nuclear íntegra

Nucléolos múltiplos e proeminentes

Pleomorfismo nuclear

Mitoses atípicas

ANEXO F

Crêterios para Classifica o dos Esfregaços pelo Método de Papanicolaou Modificado

A classifica o utilizada segue os cr terios descritos por Papanicolaou e Traut (1947), descritos abaixo:

Classe 0 - Amostra inválida

Material insuficiente ou inadequado para análise.

Classe I – Esfregaço normal

As células observadas apresentam padrão morfológico normal em todo o esfregaço.

Classe II – Esfregaço normal com altera es inflamatórias

Observa-se presença de células inflamatórias em pelo menos dois campos no esfregaço analisado. Núcleo e citoplasma continuam tendo características benignas, podendo existir pequenas altera es na rela o núcleo/citoplasma, em favor do núcleo. Células multinucleadas e presença de halos perinucleares podem estar presentes.

Classe III – Esfregaço suspeito – Altera es Displ sicas

Presença de altera es celulares no mínimo em dois campos do esfregaço. Foram consideradas displásicas, células cujos núcleos apresentavam alguns cr terios de malignidade, mas que mantinham o citoplasma normal. As altera es consideradas foram: discreta hipercromasia nuclear, núcleos levemente aumentado (o maior diâmetro do núcleo   ainda menor que o maior raio do citoplasma), observa o de grânulos e cordões de cromatina, mas não verdadeiros espaços vazios nucleares. Observou-se a presença de multinuclea o. Na presença de displasia leve, as células são do tipo superficial e intermediário, com raras células

parabasais. Em uma displasia severa, as células, em sua maioria, são do tipo parabasal ou intermediário de pequeno tamanho.

Classe IV – Carcinoma *in situ* - Fortemente indicativo, mas não conclusivo de malignidade.

Presença de alterações celulares em dois ou mais campos. O número de células anormais, nas amostras, é maior que nas displasias. O carcinoma *in situ* é caracterizado pela presença de células malignas imaturas, ou seja, células das camadas basal e parabasal que são redondas ou ovais, com núcleo em posição central. Podem aparecer células com núcleos volumosos e escasso citoplasma. A membrana nuclear é vivamente delimitada, a cromatina é irregular ou em grânulos grosseiros. O núcleo é difusamente hiper cromático. Podem ser observadas multinucleação e binucleação com núcleos ovalados e unidos. O citoplasma pode conter vacúolos. Observa-se sincícios celulares com bordas celulares indistintas e, pode ser visto, arranjo celular em fila.

Classe V – Esfregaço maligno – Carcinoma invasivo

Presença de alterações celulares compatíveis com neoplasia maligna. O núcleo mostra grânulos grosseiros de cromatina, espaços vazios e acentuado pleomorfismo. Há evidente aumento da relação núcleo/citoplasma. O núcleo é hiper cromático. Há presença de pleomorfismo celular e mitoses atípicas.

ANEXO G

Sistema de Bethesda (2001) Adaptado para a Cavidade Bucal pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ADEQUAÇÃO DO ESPÉCIME

- Satisfatório para avaliação
- Insatisfatório para avaliação

Espécime rejeitado / não processado

Espécime processado e examinado, mas insatisfatório para avaliação, porque (especificar)

CLASSIFICAÇÃO GERAL

- Negativos para Lesão Intra-Epitelial ou Malignidade
- Presença de Anormalidade Epitelial

INTERPRETAÇÃO (RESULTADO)

- Negativos para Lesão Intra-Epitelial ou Malignidade

Fungo (Cândida)

Bactérias presentes no esfregaço

Células inflamatórias presentes no esfregaço

- Anormalidade Celular Epitelial

Células Escamosas Atípicas de significado indeterminado (A.S.C.U.S)

As demais alterações caracterizadas no Sistema Bestheda (2001) representam, na citologia bucal, a presença de alterações clinicamente visíveis. Conforme a indicação, determina-se a necessidade da realização de biópsia total ou parcial.

ANEXO H

Tipos celulares segundo Carvalho (2002):

- Células anucleadas: São células achatadas, poligonais como as superficiais, porém sem núcleo. Ocasionalmente, leve vestígio da presença de um núcleo poderá ser percebida. O citoplasma é intensamente ceratinizado e se cora, mais comumente, em amarelo alaranjado ou vermelho.
- Células superficiais: São células grandes, achatadas, de tendência poligonal e de citoplasma pouco transparente. Este é eosinófilo, isto é, cora-se numa variação do amarelo-claro ao vermelho-púrpura. A coloração mais comum, entretanto, é a rósea. As bordas citoplasmáticas são bem delineadas. O núcleo é inteiramente picnótico, isto é, apertado sobre si mesmo, pequeno e sem nenhuma estrutura identificável de cromatina. Aparece como um pequeno ponto preto, arredondado ou, às vezes, ligeiramente alongado.
- Células intermediárias: São células cianófilas com coloração mais clara que as das camadas mais profundas. As bordas externas do citoplasma mostram tendência acentuada para linhas retas, conferindo forma poligonal. A predominância do citoplasma sobre o núcleo é muito acentuada. O citoplasma se dobra com facilidade, tornando-se transparente. O núcleo tem a forma mais ou menos ovalada, a cromatina é finamente granular e uniformemente distribuída, mas, já pode-se presenciar alguns grânulos e esboços de cordões de cromatina.
- Células parabasais: São células de forma oval, embora, ainda, possam aparecer arredondadas. O citoplasma tem coloração basófila ou cianófila. O núcleo assume posição central de formato ovalado, ocupando metade da área celular. A cromatina é menos abundante, granular e uniformemente distribuída.

