

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

ARTHUR PIAS SALGUEIRO

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
AMOSTRAS CITOPATOLÓGICAS NA CARCINOGENESE BUCAL**

PORTO ALEGRE

2017

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

ARTHUR PIAS SALGUEIRO

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
AMOSTRAS CITOPATOLÓGICAS NA CARCINOGENESE BUCAL**

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

PORTO ALEGRE, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Salgueiro, Arthur

Análise morfométrica, morfológica e molecular de amostras citopatológicas na carcinogênese bucal / Arthur Salgueiro. -- 2017.

65 f.

Orientadora: Fernanda Visioli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Câncer bucal. 2. Leucoplasia. 3. Fumo. 4. Álcool. 5. Perda de Heterozigosidade. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A melhor virtude do ser humano é a gratidão, e neste espaço da minha dissertação eu quero agradecer!

Primeiramente a Deus e a minha família, à Deus por me acompanhar sempre, guiar e iluminar os meus caminhos e a minha família que é a base de tudo, as pessoas mais importantes na minha vida, as quais eu amo muito, a minha mãe Denise, meu pai Claudio e meu irmão Victor, além dos meus avós, avôs, tios, tias, primos, primas, afilhados, afilhadas! Sou muito feliz por fazer parte dessa família e por ter todos vocês comigo sempre, em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins!

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida, desde Uruguaiana, Santa Maria até chegar em Porto Alegre.

Ronairo, Lais, Lennon, Andressa, Felipe, Renan, Nana, Nayany, Felipe, Mariana, Viviane, Tai, Alex, Samanta, ao meu anjo que está no céu e sempre comigo Natasha.

Obrigado aos amigos que Poa me presenteou, Camila, Giu, Nicholas, Fabi, Duda, Nati, Manu, Lucas, Carol, Marvin, Mauricio, Rafa, Anna, Julia, Gabi, Vitória, Amanda, Michelle, Jessica, Shanice.

Agradeço em especial a Bru, Nati, Vivi e Isa que foram quatro pessoas que me acolheram, me ensinaram muito, e sou extremamente grato a tudo que vocês fizeram por mim!

Aos meus colegas da patologia, ju e bibi (melhores iuris do mundo amo vcs), tai (tu é demais), Dudu, belkis, tati, nati k, rubia, João, Vivian, ana, paloma.

Aos professores, em especial a professora Márcia e Kivia (minhas professoras da graduação que eu tenho admiração e gratidão eterna), ao professor Pantelis (sou extremamente fã, admiro e aprendo todos os dias ao

seu lado), a professora Márcia de Oliveira (nossas rotinas rendiam, aprendi muito contigo e aprendo sempre, obrigado por tudo)

A minha querida orientadora. Fê sou eternamente grato por tudo que tu fez por mim, sempre digo que te admiro demais, que aprendo contigo, que sou teu maior fã, me puxou a orelha quando tinha que puxar, mas sempre acreditou em mim, cuidou de mim e me deu todo o apoio! Trabalhar contigo foi demais! Obrigado sempre e quero trabalhar contigo muito ainda, amo vc!

Ao Hospital de Clínicas, e em especial ao laboratório da UAMP, a Patricia e o Hugo que estiveram desde o início do trabalho nos dando apoio, suporte e trocando experiências.

A todos os colegas/amigos, funcionários e professores da Patologia Bucal da FO/UFRGS, pelo companheirismo, ajuda técnica e teórica nesses dois anos de grande aprendizado.

Aos pacientes, que são o meu principal motivo de busca por maior conhecimento para que possa ajuda-los cada vez melhor e com mais embasamento.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPQ que tornaram possível a realização desse curso de pós-graduação.

“Não adianta ter mestrado e doutorado se não cumprimentar o porteiro.”

(Mallone Alves)

SALGUEIRO, Arthur Pias. Análise morfométrica, morfológica e molecular de amostras citopatológicas na carcinogênese bucal 2017.65f.Dissertação(Mestrado).Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.Porto Alegre.2017.

RESUMO

O processo de carcinogênese na cavidade bucal ocorre em etapas, apresentando alterações sobre o genoma celular, sendo muitas vezes precedido por lesões denominadas potencialmente malignas. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do Câncer bucal são o fumo e o álcool. O desafio atual é identificar os pacientes com maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal através da utilização de métodos não invasivos e eficazes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de perda de heterozigossidade (LOH) no locus 9p21, a atividade proliferativa celular, o padrão de descamação e relação núcleo/citoplasma na carcinogênese bucal. Para tal finalidade foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos que foram divididos nos seguintes grupos: Controle (n=26), Álcool-Fumo (n=32), Leucoplasia (n=38) e grupo Carcinoma Espinocelular (CEC n=35). A partir do raspado citológico foi confeccionada uma lâmina para impregnação por prata e análise de AgNOR (velocidade de proliferação celular) e realização da técnica de Papanicolau para a análise do padrão de descamação e relação núcleo/citoplasma das células. O restante das células foi utilizado para extração do DNA para amplificação por PCR e sequenciamento. Observamos que a frequência de LOH foi maior no grupo Leucoplasia. A velocidade de proliferação celular foi maior no grupo Leucoplasia em relação ao grupo controle. Na análise de padrão de descamação, observamos maior quantidade de escamas anucleadas no grupo Leucoplasia, de superficiais no grupo controle e de células parabasais no grupo CEC. A relação núcleo/citoplasma foi maior no grupo CEC em comparação aos outros. Concluímos que a LOH e o AgNOR são métodos promissores para o rastreamento e monitoramento dos pacientes com maior risco para o desenvolvimento do Câncer bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal; Leucoplasia; AgNOR; Papanicolau, Fumo; Álcool; Perda de Heterozigossidade; CDKN2A.

SALGUEIRO, Arthur Pias. Análise morfométrica, morfológica e molecular em amostras citopatológicas na carcinogênese bucal 2017.65f.Dissertação(Mestrado).Faculdade de Odontologia,Universidade Federal do Rio Grande do Sul.Porto Alegre.2017.

ABSTRACT

The carcinogenesis process in the bucal cavity occurs in stages, appearing on the cellular genome, and is often preceded by potentially malignant lesions. The main risk factors for the development of bucal cancer are smoking and alcohol intake. The current challenge is to identify patients at greatest risk for the development of bucal cancer through the use of non-invasive and effective methods. The objective of this work is to evaluate the loss of heterozygosity (LOH) in the 9p21 locus, the cell proliferative activity, the pattern of epithelial desquamation and the nucleus/cytoplasm ratio of the epithelial cells. For this purpose a cytopathological sample was collected from individuals of 4 groups: control (n = 26), alcohol-smoking (n = 32), leukoplakia (n = 38) and the squamous cell carcinoma group (SCC n = 35). From the cytological scraping, a slide was silver impregnate for AgNOR analysis (cell proliferation velocity), another slide was stained by the Papanicolau technique for the analysis of the desquamation pattern and nucleus/cytoplasm ratio of the cells. The remaining cells were used for DNA extraction, followed by PCR amplification and fragments sequencing. We observed that the cell proliferation velocity rate was higher in the Leukoplakia group compared to the Control group. The LOH frequency was higher in the Alcohol-smoking and Leukoplakia groups. We observed increased anucleated cells in the leukoplakia group, while the nucleated superficial predominated in the control group and the parabasal cells in the SCC group. An increased nucleus/cytoplasm was detected only in the CEC group. We conclude that LOH and AgNOR methods are promising for the screening and monitoring of individuals at higher risk for the development of bucal cancer.

Key-words: Bucal Cancer; Leukoplakia; AgNOR; Papanicolau; Smoking; Alcohol; Loss of Heterozygosity; CDKN2A.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	9
1.1 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DO CÂNCER BUCAL	9
1.2 ETIOLOGIA	10
1.3 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS	11
1.4 CITOPATOLOGIA	14
1.5 PERDA DA HETEROZIGOSIDADE	20
1.5.1 <i>Lócus 9p21</i>	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4 ARTIGO CIENTÍFICO	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6 ANEXOS	68

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DO CÂNCER BUCAL

Os tumores da cavidade bucal e de faringe, quando analisados em conjunto, ocupam a sexta posição entre as neoplasias malignas mais prevalentes na população mundial (PARKIN et al., 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016), foram estimados, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres.

O carcinoma espinocelular representa a maioria de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, assim é usado, muitas vezes, como sinônimo para o termo câncer bucal. Apesar dos inúmeros esforços realizados no sentido de prevenir, diagnosticar precocemente e buscar novos protocolos de tratamento, o prognóstico desta doença pouco tem se modificado nas últimas décadas (NEVILLE; DAY, 2002; VAN DER WAAL, 2013) sendo mantidas taxas de sobrevida em torno de 50% em 5 anos (ANTUNES et al., 2001; BIAZEVIC et al., 2006). Em função disso, o câncer de boca requer a implementação de estratégias de combate mais eficazes. Em todo o mundo, cerca de 50% dos pacientes com câncer de boca são diagnosticados já com a doença avançada. A redução dos fatores de risco tais como álcool e fumo pode ser uma ferramenta eficaz para reduzir a morbidade e mortalidade (VAN DER WAAL, 2013).

1.2 ETIOLOGIA

A etiologia do câncer bucal é multifatorial. Os fatores etiológicos associados a essa patogenia podem ser intrínsecos - condições sistêmicas e hereditariedade - ou extrínsecos – exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta (no caso específico do câncer de lábio inferior). Diversos estudos mostram que o câncer bucal surge como resultado do acúmulo de eventos mutagênicos, decorrentes principalmente do efeito do tabaco e do álcool (LA VECCHIA et al., 1997).

Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que atuaria como um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular. Ainda que a exposição ao fumo associada ao álcool tenha mostrado efeito multiplicador, o papel do álcool como agente isolado não é tão claro (OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999). O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004). Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos (SQUIER; COX; HALL, 1986). Além disso, o álcool é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação (CARRARD et al., 2004). Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (OGDEN; WIGHT; RICE, 1999).

O risco para desenvolvimento de câncer tem mostrado relação com intensidade e duração dos hábitos de fumar e beber. CASTELLSAGUÉ e colaboradores (2004) afirmam, baseados em um estudo caso-controle, que o risco de desenvolvimento de câncer bucal em indivíduos com alto consumo de fumo e de bebidas alcoólicas foi 50 vezes maior do que o dos indivíduos que nunca tinham bebido ou fumado.

O dano genético causado pela exposição a diferentes agentes mutagênicos pode causar o comprometimento de diversos processos regulatórios celulares, resultando em aumento da proliferação, inibição de processos apoptóticos e potencial para a invasão de tecidos adjacentes (HANAHAN, WEINBERG, 2010). A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna. Uma lesão potencialmente maligna consiste em um tecido alterado onde o câncer ocorre mais frequentemente em comparação a sua contraparte normal (MAO, 1997; REIBEL, 2003).

1.3 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0.42 e 5% (BÁNÓCZY; RIGÓ, 1991; SCHEPMAN et al., 1996; DELİLBAŞI et al., 2003; JAHANBANI, 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003). Segundo CARRARD e colaboradores (2011) a prevalência de leucoplasias na população da região

metropolitana de Porto Alegre é de 1.01%. A leucoplasia se apresenta como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra patologia (BARNES et al., 2005). Ao se deparar com uma leucoplasia há a necessidade de realizar-se uma biópsia para que seja possível o diagnóstico histopatológico, uma vez que estas lesões podem apresentar inúmeras alterações epiteliais (KRAMER et al., 1978).

Os distúrbios epiteliais presentes em leucoplasias são classificados de acordo com suas características morfológicas em hiperplasia epitelial, hiperkeratose (hiperortoceratose ou hiperparaceratose), acantose e displasia epitelial (WARNAKULASURIYA et al., 2008). No diagnóstico histopatológico de uma leucoplasia essas alterações epiteliais podem estar presentes isoladamente ou em conjunto (WALDRON; SHAFER, 1975).

WALDRON e SHAFER (1975) após análise microscópica de 3256 leucoplasias constataram que 80,1% apresentavam diferentes combinações de hiperplasia epitelial, hiperortoceratose, hiperparaceratose e acantose, 12,2% apresentavam displasia epitelial leve à moderada e 4,5% displasia severa ou carcinoma *in situ*. Carcinoma espinocelular foi encontrado em 3,1% das leucoplasias.

A hiperplasia epitelial caracteriza-se pelo aumento do número de células do tecido com manutenção do seu padrão morfofuncional. A hiperkeratose é o espessamento anormal da camada de ceratina que pode ser constituída de paraceratina ou ortoceratina. Na paraceratina as células superficiais achatadas retêm os núcleos e boa parte das organelas, enquanto que na ortoceratina

essas células perdem suas organelas e seu citoplasma é ocupado por grande quantidade de filamentos de citoqueratina. A acantose é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, apresentando como principais características o alongamento das papilas epiteliais e a união entre o tecido conjuntivo e epitelial em linha reta (BARNES et al., 2005).

A displasia epitelial é caracterizada por modificações dos processos de renovação e maturação epitelial, resultando em alterações arquiteturais e citológicas. Segundo KRAMER et al (1978), na displasia epitelial podem-se observar as seguintes alterações:

- Aumento do número de figuras de mitoses (algumas atípicas);
- Presença de mitoses na metade superficial do epitélio;
- Aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- Nucléolos volumosos;
- Duplicação da camada basal;
- Estratificação epitelial irregular;
- Ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa;
- Papilas epiteliais em forma de gota;
- Perda da polaridade das células da camada basal;
- Perda de aderência intercelular;
- Hiperchromatismo nuclear;
- Pleomorfismo celular.

Estima-se que a taxa anual de transformação maligna de leucoplasias seja de 1% (VAN DER WAAL, 2009). Apesar do enorme progresso científico,

não há um marcador ou um conjunto de marcadores que permitam de forma confiável prever a transformação maligna de um leucoplasia. A identificação de indivíduos e lesões com maior risco de desenvolvimento para o câncer bucal tem fundamental importância para a adoção de medidas eficazes que favoreçam o diagnóstico precoce dessa neoplasia, aumentando as taxas de sobrevivência destes pacientes. Além disso, permitiria a utilização de medidas preventivas, como o abandono do uso de substâncias carcinogênicas e outros recursos quimiopreventivos.

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, e um dos temas de destaque tem sido o estudo da mucosa clinicamente normal de indivíduos expostos aos principais fatores de risco, fumo e álcool. Nos últimos anos, as evidências científicas têm demonstrado que é possível detectar alterações incipientes nesses grupos. Isso tem motivado a busca de biomarcadores com possibilidade de utilização em nível populacional que venham a contribuir na identificação de indivíduos com maior risco ao desenvolvimento de câncer bucal (PAIVA et al., 2004).

1.4 CITOPATOLOGIA

Para o estudo da mucosa clinicamente normal a citopatologia é indicada por ser não-invasiva. A citopatologia é um método de análise de células esfoliadas que tem seu emprego mais conhecido no controle do câncer ginecológico (BÁNÓCZY, 1976). Recentemente surgiram estudos utilizando a citopatologia em boca como um recurso de rastreamento de indivíduos com maior risco para câncer bucal (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007).

As células bucais podem ser obtidas por diferentes métodos de raspagem da mucosa. Vários estudos revisaram a confiabilidade dos diferentes instrumentos utilizados na citologia exfoliativa bucal, considerando que o instrumento ideal usado para fazer uma boa citologia deve causar um mínimo trauma e fornecer um adequado e representativo número de células epiteliais. (JONES et al., 1994). As coletas podem ser feitas com espátula de madeira, espátula de metal, escova de dentes lisa, escova Cytobrush®, Medibrush Plus®. Foi comparado o cytobrush com espátula de metal e observaram que o cytobrush foi melhor em relação a homogeneidade, porém nenhuma diferença foi observada em relação aos tipos de células coletadas. (QUEIROZ et al., 2010).

A fim de aumentar a acurácia deste exame, são utilizadas técnicas quantitativas, como por exemplo, a quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados no raspado citológico: células basais, parabasais, intermediárias, superficiais e também, células inflamatórias, com o emprego da coloração de Papanicolau. BURZLAFF e colaboradores (2007) observaram padrões alterados de descamação celular da mucosa bucal em indivíduos expostos à carcinógenos ou com leucoplasias e carcinoma espinocelular. As células mais profundas do epitélio (parabasais e intermediárias) foram encontradas em maior proporção nos grupos com lesões (Carcinomas espinocelulares e Leucoplasias displásicas). Menor proporção de células superficiais nucleadas foi observada em todos os sítios bucais avaliados (lábio inferior, bordo de língua e assoalho bucal) em indivíduos fumantes e alcoolistas quando comparado aos indivíduos do grupo controle.

O teste de Papanicolau foi utilizado para analisar células de mucosa bucal de indivíduos expostos a diferentes substâncias (tabaco, consumidores de álcool, pimentas e indivíduos que consomem comida quente). As modificações celulares avaliadas foram: alteração da relação citoplasmática nuclear, hipercromatismo, aglutinação de cromatina com nucléolos moderadamente proeminentes, bi ou multi-nucleação, escasso citoplasma e variação de tamanho e / ou forma das células. O consumo de alimentos picantes não parece ser um fator de risco, ao contrário dos consumidores de álcool ou tabaco que apresentam células atípicas de leve a moderada. A duração da exposição foi correlacionada com maior número de células atípicas nas amostras. (AHMED et al., 2010).

SEKINE e colaboradores em 2017, exploraram a precisão da citopatologia bucal (através da coloração do Papanicolau) em comparação com o diagnóstico histopatológico, concluindo que o exame histopatológico deve ser recomendado quando houver qualquer alteração epitelial após a realização da citologia esfoliativa. Dessa forma a citopatologia não substitui a biópsia e o exame histopatológico, mas representa uma ferramenta importante para o monitoramento dos pacientes ao longo do tempo.

SILVA e colaboradores em 2017, avaliaram o nível de maturação e proliferação das células epiteliais, correlacionando com a expressão imunocitoquímica de marcadores de adesão (E-caderina) e de diferenciação celular (Involucrina). As amostras citopatológicas foram obtidas através de quatro grupos, incluindo grupo Álcool/fumo, Leucoplasia, Carcinoma espinocelular comparando-os com o grupo Controle. Os resultados obtidos

mostraram o aumento nas células superficiais anucleadas no grupo Álcool/fumo em relação ao grupo Carcinoma e no grupo Leucoplasia em relação aos grupos que não tinham lesões. As células intermediárias foram encontradas em maior número nos grupos sem lesões em relação ao grupo Leucoplasia. Quando esses achados foram correlacionados com a expressão positiva de E-caderina, houve um número menor de células anucleadas e intermediárias. A taxa de proliferação foi maior no grupo Carcinoma espinocelular do que no Grupo controle e no grupo Álcool/fumo em comparação com o grupo Leucoplasia. Além disso, a proliferação celular aumentou na presença de expressão positiva de E-caderina nos grupos Álcool/fumo e Leucoplasia.

Outra análise que pode ser realizada através da coloração de Papanicolau é a citomorfometria das células (OGDEN; COWPE; GREEN, 1990). Nesse tipo de análise é realizada a quantificação da relação núcleo/citoplasma das células encontradas no raspado citológico. Uma das principais alterações celulares durante a carcinogênese é o aumento da relação núcleo/citoplasma. No entanto, essas alterações celulares ocorrem muito antes dos primeiros sinais clínicos. Através da análise citomorfométrica é possível realizar medições de parâmetros como área e diâmetro de núcleo e citoplasma e relação núcleo/citoplasma (KHOT et al., 2015).

NIVIA e colaboradores em 2015, compararam a relação núcleo/citoplasma de indivíduos não fumantes, fumantes sem lesões bucais, fumantes com leucoplasia e fumantes com carcinoma espinocelular e observaram um aumento significativo no valor desse parâmetro nos grupos dos

fumantes, sem lesão e com lesão. KHOT e colaboradores (2015) também observaram um aumento na relação núcleo/citoplasma em fumantes quando comparados à indivíduos não fumantes. Os diâmetros de núcleo e citoplasma também variaram entre fumantes e não fumantes. Fumantes apresentaram um aumento significativo no diâmetro nuclear e uma diminuição significativa no diâmetro citoplasmático (NADAF et al., 2014).

Outra técnica quantitativa associada à citopatologia é a análise de AgNORs. Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são sequências de DNA que codificam o RNA ribossômico, contribuindo, portanto, para a síntese ribossomal. Durante a intérfase, essas regiões se aproximam e, juntamente com o RNAr (RNA ribossômico) e proteínas, formam o nucléolo. Quando essas regiões estão sendo ativamente transcritas, elas se associam a proteínas que têm afinidade pela prata, assim, as NORs ativas aparecem como pontos pretos dentro do núcleo amarelo-acastanhado, sendo então chamadas de AgNORs (HERNANDEZ-VERDUN, 1983; TRERÈ, 2000).

O aumento do número de AgNORs é o reflexo de maior atividade proliferativa das células. Segundo DERENZINI e PLOTON, (1991), quanto mais rápido ocorre o ciclo celular, menor o tempo e a possibilidade de as NORs conseguirem agrupar-se durante a interfase. Além disso, quanto maior a atividade proliferativa de uma célula maior a necessidade de uma célula produzir mais ribossomos para as células-filhas (DERENZINI et al., 1998, 2000). Portanto, a técnica de AgNOR informa a velocidade do ciclo celular e não apenas a fração de crescimento (QUINN; WRIGHT, 1990; DERENZINI et al., 2000).

XIE, et al. (1997) além de utilizarem o número médio de AgNORs/núcleo, consideraram o percentual de núcleos com mais de 1, 2, 3 e 4 AgNORs (pAgNOR) em um estudo comparando mucosa normal, displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares bucais. Constataram que 70% dos núcleos de epitélio normal apresentaram um ou dois AgNORs, enquanto que em carcinomas espinocelulares, 60% das células apresentaram mais de 4 AgNORs.

Estudos observaram maior velocidade proliferativa celular na mucosa bucal de pacientes expostos a carcinógenos, fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle através da técnica da AgNOR (CANÇADO; YURGEL; FILHO, 2001; PAIVA et al., 2004).

O estudo longitudinal de GEDOZ e colaboradores (2007) comprovou o progressivo aumento da velocidade de proliferação celular em mucosa bucal de pacientes fumantes. Os resultados deste trabalho também demonstram que o monitoramento citopatológico pode ser feito, porém sua utilização tem um valor preditivo individual.

Dentro do que é sabido até o momento, é possível constatar-se que a citopatologia é um recurso de monitoramento que vem se mostrando cada vez mais efetivo para a observação de modificações iniciais ou mesmo prévias ao aparecimento de lesões potencialmente malignas ou câncer bucal. No entanto, fica evidente o caráter individual desse tipo de avaliação, sugerindo que alguns indivíduos são mais suscetíveis do que outros aos carcinógenos bucais (GEDOZ et al., 2007).

1.5 PERDA DA HETEROZIGOSIDADE

Apesar dos avanços na pesquisa empregando citopatologia como ferramenta de monitoramento e de diagnóstico de risco existe ainda a necessidade de utilização de testes mais precisos para verificar o potencial de malignização de forma individual. Um dogma central da carcinogênese é que o desenvolvimento do câncer requer a acumulação de múltiplas alterações genéticas. Portanto, lesões que progridem para carcinoma espinocelular tendem a ser geneticamente diferentes de lesões clinicamente semelhantes, mas que não progridem (REIBEL, 2003). Detecção destas alterações pode ser um poderoso preditor de risco para o desenvolvimento de câncer bucal. Como resultado, seria possível identificar quais os pacientes devem ser tratadas de forma mais agressiva, seja por acompanhamento mais frequente ou pelo tratamento precoce, usando abordagens tradicionais como a cirurgia ou técnicas mais recentes, como regimes quimiopreventivos (ROSIN et al., 2000).

Uma das abordagens mais promissoras é a avaliação das lesões para a perda de heterozigidade (LOH). A perda de heterozigidade representa a perda de um alelo em um locus específico, causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo a partir de um par cromossômico, resultando em uma homozigidade anormal (ROSIN et al., 2008).

CALIFANO e colaboradores em 1996 sugeriram um modelo de progressão tumbucal para tumores de cabeça e pescoço a partir da análise de microssatélites para determinar a presença de perda de heterozigidade em 10 locus alélicos frequentemente perdidos no câncer de cabeça e pescoço. As 87 lesões cancerizáveis com diferentes achados histopatológicos pareadas

com amostras normais foram analisadas. A maior frequência de LOH em leucoplasias com hiperplasia ou hiperqueratose ocorreu em 9p21 (20%), seguido por 3p14 (16%) e 17p13 (11%). Este achado indica que LOH nestas regiões é um evento precoce na progressão tumoral. Displasias epiteliais, consideradas um passo intermediário na evolução histopatológica para o câncer, mostraram LOH adicionais em 11q13 (29%), 13q21 (32%) e 14q31 (23%). Como esperado, houve também um aumento na frequência de perdas em 9p21 e 3p14 da etapa de leucoplasia sem displasia para leucoplasia com displasia.

O estudo realizado por ROSIN et al., (2000) teve por objetivo avaliar a perda de heterozigossidade (LOH) comparando leucoplasias que progrediram ou não para o carcinoma espinocelular. Todas as leucoplasias, que progrediram para carcinoma espinocelular apresentavam perda do 3p14 e 9p21, com risco relativo de malignização 24 vezes maior do que as lesões que não apresentavam tal alteração. No entanto, a perda destes alelos específicos, ocorria com significativa frequência também em lesões que não progrediram para carcinoma espinocelular. Logo, outros marcadores foram necessários para a avaliação do potencial de malignização. Lesões cancerizáveis com perda do 3p e/ou 9p e alguma outra perda adicional nos cromossomos 4q, 8p, 11q, 13q e 17p, possuíam risco de transformação em carcinoma espinocelular 33 vezes maior quando comparadas com lesões que não apresentaram perdas em tais alelos.

1.5.1 Locus 9p21

O mesmo grupo em 2012 publicou um estudo prospectivo avaliando, assim como no estudo retrospectivo, a perda da heterozigosidade em sete locus cromossômicos. As lesões leucoplásicas que progrediram para malignidade mostraram pelo menos perda em um dos locus cromossômicos. A região 9p21 onde localiza-se o gene *CDKN2A* mostrou-se a região mais significativa para predizer o risco de transformação maligna (ZHANG et al., 2012).

O gene *CDKN2A* (inibidor 2A da quinase dependente de ciclina) está localizado no cromossomo 9p21, e é considerado um gene supressor de tumor envolvido na regulação do ciclo celular e que muitas vezes está inativo em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. A perda de heterozigotidade no local *CDKN2A* tem sido reconhecida como um dos primeiros eventos na progressão de lesões potencialmente malignas para carcinomas espinocelulares (LOYO et al., 2013).

O gene *CDKN2A* codifica a proteína p16. A proteína p16 desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB (Retinoblastoma), também considerado um gene supressor tumoral. Durante a fase G1, p16 inibe CDK4 (quinase dependente de ciclina 4) e CDK6 (quinase dependente de ciclina 6), impedindo que os mesmos fosforilem Rb, que se mantém ligado ao fator de transcrição E2F (Figura 1), dessa forma impedindo a passagem do ciclo celular para a fase S (GUERRA et al., 2005).

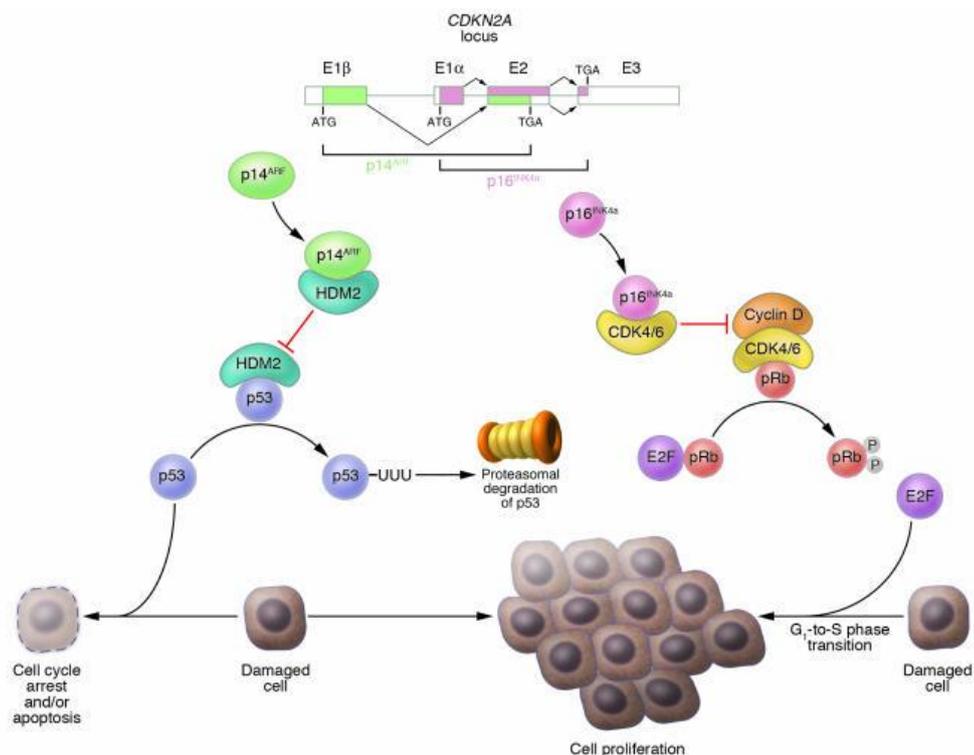


Figura 1: Cascata de sinalização da proteína p16 e p14. Adaptado de Chudnovsky Y, et al, 2005.

Além disso, as alterações genéticas não são o único mecanismo para silenciar *CDKN2A* em carcinomas espinocelulares, mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos (LOYO et al., 2013). A inativação de p16 envolve quatro tipos de alterações genéticas, tais como: hipermetilação, perda de heterozigossidade (LOH) e mutação pontual (LI; POI; TSAI, 2011). Acredita-se que a inativação de p16 é um evento precoce e importante na progressão tumoral (ROCCO; SIDRANSKY, 2001).

O gene *CKKN2A* também codifica a proteína p14ARF, que também atua como reguladora crucial do ciclo celular (SERRANO; HANNON; BEACH, 1993). Essa proteína está localizada predominantemente no locus 9p21 e desempenha um papel importante na formação de tumores (SHARPLESS, 2005). O papel da p14 é manter Mdm2 (ligase ubiquitina E3) localizado no

núcleo e impedir que Mdm2 degrade a proteína p53 que também é um importante gene supressor de tumor (MOLL; PETRENKO, 2003). P14 regula os níveis de p53 que atua na indução da apoptose e na regulação do ciclo celular (YARBROUGH et al., 2002).

O *CDKN2A* é considerado um dos genes que mais sofre mutação nos cânceres humanos, atualmente ficando atrás apenas do gene *TP53*. A frequência de inativação do p16 em cânceres humanos é: 20% em câncer de mama, 65% em câncer de pulmão, 30% de câncer de colo retal, 60% de câncer de bexiga, 50-70% de CEC, 60% em melanomas, 60% em leucemia, 60% em câncer de esôfago, 70% em mieloma múltiplo e 60% em carcinoma do pâncreas (LI; POI; TSAI, 2011).

Diante do que foi exposto, observamos que apesar de esses estudos mostrarem que existe uma forte associação entre perda de heterozigosidade e progressão de leucoplasias para carcinomas espinocelulares, não existem estudos que avaliem esse tipo de alteração em mucosa ainda clinicamente normal, mas expostas aos carcinógenos do fumo e álcool. A análise da perda de heterozigosidade pode ser realizada com o emprego de pouca quantidade de DNA, logo a citologia esfoliativa pode ser uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação da mucosa bucal clinicamente normal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é avaliar o padrão de descamação, da relação núcleo/citoplasma, da proliferação celular e da perda de heterozigosidade de amostras citopatológicas da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos (fumo e álcool), com leucoplasias e com câncer bucal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Comparar a velocidade de proliferação nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Comparar o padrão de maturação das células nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Comparar a citomorfometria das células nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Correlacionar as variáveis estudadas entre si.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H. G. et al. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 7, p. 489–495, jul. 2010.

ANTUNES, J. L. F. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980–1998. **Oral Oncology**, v. 37, n. 4, p. 345–350, 1 jun. 2001.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **International Dental Journal**, v. 26, n. 4, p. 398–404, dez. 1976.

BÁNÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 265–267, out. 1991.

BARNES, L. et al. Epithelial precursor lesions. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. [s.l.] IARC Press, 2005. p. 177–179.

BIAZEVIC, M. G. H. et al. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. **Cadernos De Saude Publica**, v. 22, n. 10, p. 2105–2114, out. 2006.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. **Cytopathology: Official Journal of the British Society for Clinical Cytology**, v. 18, n. 6, p. 367–375, dez. 2007.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488–2492, 1 jun. 1996.

CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; FILHO, M. S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncology**, v. 37, n. 5, p. 446–454, jul. 2001.

CARRARD, V. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Diseases**, v. 17, n. 2, p. 171–179, mar. 2011.

CARRARD, V. C. et al. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 34, n. 2–3, p. 233–238, nov. 2004.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 5, p. 741–749, 20 fev. 2004.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **The Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 185–188, jul. 1989.

DELİLBAŞI, Ç. et al. Prevalence of Oral Precancerous. Lesions in a Selected Turkish Population. v. 33, p. 39–42, 2003.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar function and size in cancer cells. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 5, p. 1291–1297, maio 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. **The Journal of Pathology**, v. 191, n. 2, p. 181–186, jun. 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Review of Experimental Pathology**, v. 32, p. 149–192, 1991.

GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR

staining technique. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 29, n. 4, p. 231–238, ago. 2007.

GUERRA, E. N. DA S. et al. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. v. 51, n. 1, p. 31–37, 2005.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. v. 191, n. 49, 1983.

Home | Smoking Pack Years. Disponível em: <<https://www.smokingpackyears.com/>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. **Oral Diseases**, v. 9, n. 6, p. 302–304, nov. 2003.

JONES, A. C. et al. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 77, n. 1, p. 95–99, jan. 1994.

KHOT, K. et al. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, n. 3, p. 22, 1 ago. 2015.

KRAMER, I. R. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 46, n. 4, p. 518–539, out. 1978.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 33, n. 5, p. 302–312, set. 1997.

LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M.-D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566–5582, 28 jun. 2011.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and

younger: a case-control study in Southern England. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 33, n. 9, p. 525–532, out. 2004.

LOYO, M. et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head & neck**, v. 35, n. 3, p. 454–463, mar. 2013.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Molecular Medicine Today**, v. 3, n. 10, p. 442–448, 1 out. 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2016>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Molecular cancer research: MCR**, v. 1, n. 14, p. 1001–1008, dez. 2003.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leukoplakia: Original study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 18, n. Suppl 1, p. S32–S38, set. 2014.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, ago. 2002.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists**, v. 32, n. 4, p. 253–260, 2015.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **Journal of Oral**

Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, v. 19, n. 2, p. 53–55, fev. 1990.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 4, p. 247–251, ago. 1998.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 28, n. 5, p. 216–220, maio 1999.

PAIVA, R. L. et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 26, n. 3, p. 175–180, jun. 2004.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V. et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. **Oncogene**, v. 14, n. 15, p. 1799–1803, 17 abr. 1997.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, abr. 2005.

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. **The Histochemical Journal**, v. 18, n. 1, p. 5–14, jan. 1986.

QUEIROZ, J. B. et al. Exfoliative cytology of the oral mucosa: comparison of two collection methods. **General Dentistry**, v. 58, n. 5, p. e196-199, out. 2010.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **The Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 93–102, fev. 1990.

REIBEL, J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47–62, 1 jan. 2003.

ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 1, p. 42–55, 10 mar. 2001.

ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 357–362, fev. 2000.

ROSIN, M. P. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 74, n. 3, p. 261–266, abr. 2008.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 619–625, set. 2003.

SCHEPMAN, K. P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. **European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, v. 32B, n. 6, p. 416–419, nov. 1996.

SEKINE, J. et al. Diagnostic accuracy of oral cancer cytology in a pilot study. **Diagnostic Pathology**, v. 12, 16 mar. 2017.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704–707, 16 dez. 1993.

SHARMA, D. et al. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. **International Journal of Health Sciences**, v. 9, n. 3, p. 283–291, jul. 2015.

SHARPLESS, N. E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutation Research**, v. 576, n. 1–2, p. 22–38, 25 ago. 2005.

SILVA, A. D. DA et al. Expression of E-cadherin and involucrin in leukoplakia and oral cancer: an immunocytochemical and immunohistochemical study. **Brazilian Oral Research**, v. 31, 2017.

SPAFFORD, M. F. et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 607–612, mar. 2001.

SQUIER, C. A.; COX, P.; HALL, B. K. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, n. 5, p. 276–279, maio 1986.

TEZAL, M. et al. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 183–189, fev. 2001.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 127–131, 1 abr. 2000.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, maio 2009.

VAN DER WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, n. 1, p. e33–e37, jan. 2013.

WALDRON, C. A.; SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, v. 36, n. 4, p. 1386–1392, out. 1975.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement.

Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, v. 37, n. 3, p. 127–133, mar. 2008.

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**, v. 79, n. 11, p. 2200–2208, 1 jun. 1997.

YARBROUGH, W. G. et al. Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53. **Cancer Research**, v. 62, n. 4, p. 1171–1177, 15 fev. 2002.

ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 9, p. 1081–1089, set. 2012.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Análise morfométrica, morfológica e molecular de amostras citopatológicas na carcinogênese bucal

**Artigo a ser submetido no periódico Cancer Cytopathology (Online ISSN: 1934-6638)

ABSTRACT

The carcinogenesis process in the bucal cavity occurs in stages, appearing on the cellular genome, and is often preceded by potentially malignant lesions. The main risk factors for the development of bucal cancer are smoking and alcohol intake. The current challenge is to identify patients at greatest risk for the development of bucal cancer through the use of non-invasive and effective methods. The objective of this work is to evaluate the loss of heterozygosity (LOH) in the 9p21 locus, the cell proliferative activity, the pattern of epithelial desquamation and the nucleus/cytoplasm ratio of the epithelial cells. For this purpose a cytopathological sample was collected from individuals of 4 groups: control (n=26), alcohol-smoking (n=32), leukoplakia (n=38) and the squamous cell carcinoma group (SCC n=35). From the cytological scraping, a slide was silver impregnated for AgNOR analysis (cell proliferation velocity), another slide was stained by the Papanicolau technique for the analysis of the desquamation pattern and nucleus/cytoplasm ratio of the cells. The remaining cells were used for DNA extraction, followed by PCR amplification and fragments sequencing. We observed that the cell proliferation velocity rate was higher in the Leukoplakia group compared to the Control group. The LOH frequency was higher in the Alcohol-smoking and Leukoplakia groups. We observed increased anucleated cells in the leukoplakia group, while the nucleated superficial predominated in the control group and the parabasal cells in the SCC group. An increased nucleus/cytoplasm ratio was detected only in the CEC group. We conclude that LOH and AgNOR methods are promising for the screening and monitoring of individuals at higher risk for the development of bucal cancer.

Key-words: Bucal Cancer; Leukoplakia; AgNOR; Papanicolau; Smoking; Alcohol; Loss of Heterozigosity; CDKN2A.

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa a maioria de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, assim é usado muitas vezes como sinônimo para o termo câncer bucal. É considerado o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo¹. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer² estimou-se para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.350 em mulheres. Suas taxas de mortalidade são altas e têm se mantido inalteradas nas últimas décadas^{1,3}. Dessa forma, a implementação de estratégias mais eficazes de combate ao câncer são necessárias³.

Diversos estudos mostram que o câncer bucal surge como resultado do acúmulo de eventos mutagênicos, decorrentes principalmente do efeito do tabaco e do álcool(LA VECCHIA et al., 1997). Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que atuaria como um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular. Ainda que a exposição ao fumo associada ao álcool tenha mostrado efeito multiplicador, o papel do álcool como agente isolado não é tão claro(OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999). O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos.

A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna(MAO, 1997; REIBEL, 2003). A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5%(BÁNÓCZY; RIGÓ, 1991; DELILBAŞI et al., 2003; JAHANBANI, 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003; SCHEPMAN et al., 1996).

Evidências científicas têm demonstrado que é possível detectar alterações precoces em pacientes expostos aos fatores de risco e com lesões potencialmente malignas, fato que tem motivado a busca de biomarcadores com possibilidade de utilização em nível populacional que venham a contribuir na identificação de indivíduos com maior risco ao desenvolvimento de câncer bucal(PAIVA et al., 2004).

Nos indivíduos que apresentam a mucosa bucal clinicamente normal, mas são expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, a citologia esfoliativa é uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação de alterações celulares¹⁵. Associada à citopatologia, a análise de AgNORs, Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) é uma técnica quantitativa que demonstra a velocidade de proliferação celular. Estudos prévios identificaram um aumento da velocidade de proliferação celular na mucosa bucal morfológicamente normal de pacientes expostos a carcinógenos, fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle através dessa técnica^{14,16}.

A fim de aumentar a acurácia do exame citopatológico, são utilizadas outras técnicas quantitativas, como por exemplo, a quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados no raspado citológico: células basais, parabasais, intermediárias, superficiais e também, células inflamatórias, com o emprego da coloração de Papanicolau. Outra análise que pode ser realizada através da coloração de Papanicolau é a citomorfometria das células¹⁷. Nesse tipo de análise é realizada a quantificação da relação núcleo/citoplasma das células encontradas no raspado citológico. Uma das principais alterações celulares durante a carcinogênese é o aumento da relação núcleo/citoplasma. No entanto, essas alterações celulares ocorrem muito antes dos primeiros sinais clínicos. Através da análise citomorfométrica é possível realizar medições de parâmetros como área e diâmetro de núcleo e citoplasma e relação núcleo/citoplasma(KHOT et al., 2015).

Apesar dos avanços na pesquisa empregando citopatologia como ferramenta de monitoramento e de diagnóstico de risco existe ainda a necessidade de utilização de testes mais precisos para verificar o potencial de malignização de forma individual. Um dogma central da carcinogênese é que o

desenvolvimento do câncer requer a acumulação de múltiplas alterações genéticas. Portanto, lesões que progridem para carcinoma espinocelular tendem a ser geneticamente diferentes de lesões clinicamente semelhantes, mas que não progridem (REIBEL, 2003). Detecção destas alterações pode ser um poderoso preditor de risco para o desenvolvimento de câncer bucal. Como resultado, seria possível identificar quais os pacientes devem ser tratados de forma mais agressiva, seja por acompanhamento mais frequente ou pelo tratamento precoce, usando abordagens tradicionais como a cirurgia ou técnicas mais recentes, como regimes quimiopreventivos (ROSIN et al., 2000).

Uma das abordagens mais promissoras é a avaliação das lesões para a perda de heterozigidade (LOH). A perda de heterozigidade representa a perda de um alelo em um locus específico, causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo a partir de um par cromossômico, resultando em uma homozigidade anormal (ROSIN et al., 2008). A perda de heterozigidade no locus 9p21 parece ser a mais importante para predição de transformação maligna de leucoplasias bucais (ZHANG et al., 2012). O gene supressor tumbucal *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, é um gene supressor tumbucal, e codifica a proteína p16 que desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB (Retinoblastoma) (LI; POI; TSAI, 2011).

O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de perda de heterozigidade no locus 9p21, a atividade proliferativa celular da mucosa bucal, o padrão de maturação e a citomorfometria das células de indivíduos expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, assim como de indivíduos com câncer bucal e de indivíduos portadores de leucoplasia, comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco. Além disso, avaliar a citopatologia como forma de coleta para análise de DNA.

METODOLOGIA

Amostra

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no ambulatório de atendimento clínico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do

Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 2013 a 2015. Todos os indivíduos assinaram um TCLE (Aprovação Comitê de Ética da UFRGS – número 261.037- Anexo 1). A amostra foi dividida em 4 grupos:

(1) Grupo Controle: constituído por pacientes que não apresentam lesões bucais, e que não são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal. Pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que bebem, em média, menos de uma dose de bebida alcoólica por dia. Segundo Tezal et al. (2001)²³, 340 ml de cerveja, 113 ml de vinho e 28 ml de destilados contêm a mesma quantidade aproximadamente de etanol.

(2) Grupo Álcool /Fumo: constituídos por pacientes que não apresentam lesões bucais, mas são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal (fumo/álcool). Pacientes que fumam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos associado ou não consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica é caracterizado pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia segundo o indicado por Tezal et al. 2001 (TEZAL et al., 2001), por no mínimo um ano.

(3) Grupo Leucoplasia: constituído por pacientes que apresentaram clinicamente leucoplasias bucais, confirmadas no exame de biópsia e diagnóstico histopatológico. Esses pacientes foram classificados em leucoplasias displásicas e não displásicas.

(4) Grupo CEC: constituído por pacientes que apresentaram clinicamente lesão de carcinoma espinocelular bucal primário confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico.

Os critérios de exclusão deste estudo foram: idade inferior a 30 anos, presença de lesão bucal clinicamente visível, com exceção do CEC e da leucoplasia. O cálculo amostral foi baseado num nível de significância de 5%, para poder de 80% e com uma diferença esperada em relação à frequência de perda de heterozigosidade entre os grupos de 60% (CALIFANO et al., 1996), dessa forma a amostra deveria ser constituída de 27 pacientes por grupo.

Após a concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE (Anexo 2), foi realizado um questionário com informações pertinentes ao estudo. Foram coletados dados comportamentais e demográficos (Anexo 3). Para análise da exposição ao fumo foi calculado o índice de packyears. O packyear é definido com 20 cigarros fumados todos os dias por ano (<http://smokingpackyears.com>)²⁵.

Coleta Citopatológica

Com auxílio de um cytobrush pacientes do grupo 1 e grupo 2 foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal no sítio borda de língua (um dos sítios de maior incidência do câncer bucal), e os pacientes do grupo 3 e grupo 4 foram submetidos à realização de exame citológico na região onde está localizada a leucoplasia ou CEC. O esfregaço citopatológico foi transferido para uma lâmina de vidro. Após, o cytobrush foi então imerso em tubo contendo solução PBS (Phosphate buffer saline) para obtenção de células para extração de DNA. A solução foi centrifugada a 10.000 RPM (rotações por minuto) durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet celular foi ressuspenso em 25µL de PBS e transferido para cartão FTA (Whatman International Ltd, Abingdon, Cambridge, UK).

Coleta de Sangue Periférico

Além da coleta citopatológica, foi obtida uma amostra de sangue periférico de cada indivíduo para obtenção de DNA controle para a técnica de análise de perda de heterozigosidade. O sangue foi obtido por punção digital com o uso de lanceta. As gotas de sangue foram coletadas em cartões de papel FTA card (Whatman International Ltd, Abingdon, Cambridge, UK).

Extração DNA

O isolamento de DNA foi realizado a partir de discos de 3mm de papel obtido do cartão FTA. Os discos eram colocados em tubo do tipo eppendorf,

lavados com 500µL de água ultrapura (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Em seguida era adicionado 30µL de água ultrapura e aquecido a 95°C durante 30 minutos. A concentração e pureza do DNA foram avaliadas com espectrofotômetro. A pureza foi determinada pela razão da Absorbância 260/Absorbância 280.

Amplificação por PCR e análise dos fragmentos

A perda alélica foi analisada utilizando-se o marcador de microssatélite IFNA localizado no cromossomo 9p21. O primer forward foi marcado com fluorescência FAM.

As reações de PCR foram realizadas num volume total de 20µL contendo 10ng de DNA, primers forward e reverse, solução tampão, oligonucleotídeos e enzima Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A amplificação por PCR foi realizada no equipamento StepOnePlus (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e consistiu em 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 70°C por 60 segundos. Em seguida a análise dos fragmentos foi realizada por eletroforese capilar no equipamento ABI Genetic Prism 3500 e os dados analisados através do software GeneScan Analysis (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

A perda de heterozigosidade (LOH) foi determinada pelo cálculo da proporção entre a altura de pico de alelos normais e tumbuciais, utilizando a fórmula: $(\text{altura do pico do alelo 1 da amostra de interesse} / \text{altura do pico do alelo 2 da amostra de interesse}) / (\text{altura do pico do alelo 1 da amostra controle} / \text{altura do pico do alelo 2 na amostra controle})$. A proporção de mais de 0.5 indica LOH. A instabilidade de microssatélite (MSI) foi definida como a presença de novos tamanhos de fragmentos na amostra de interesse, que estavam ausentes no DNA controle (Figura 1). A eletroforese capilar foi realizada na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

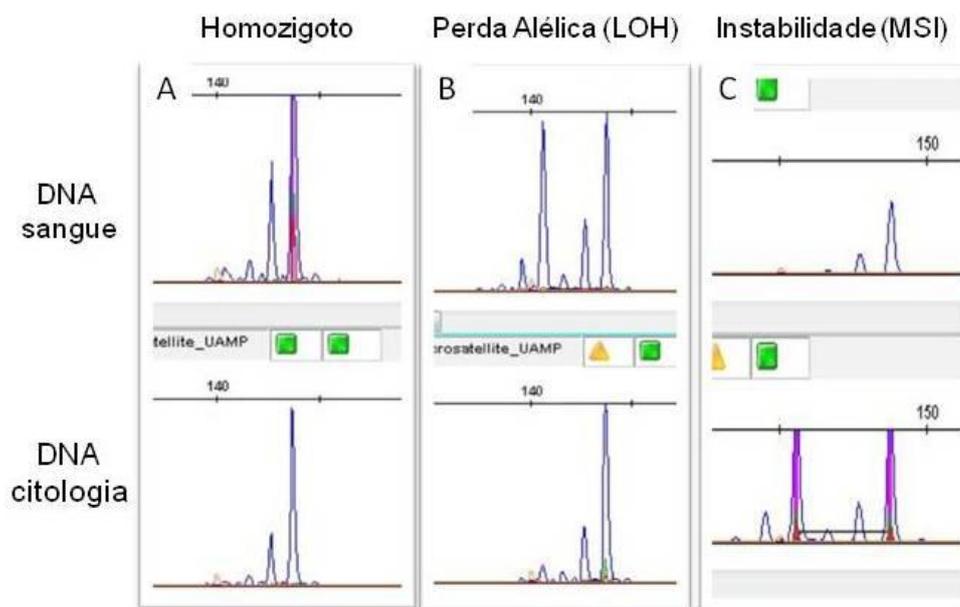


Figura 1. Aspecto representativo da análise de fragmentos. A) amostra homozigota. B) amostra com perda alélica. C) amostra com instabilidade de microssatélites.

Técnica para quantificação das AgNORs

A técnica seguiu os critérios estabelecidos por PLOTON et al., 1986. No esfregaço citológico submetido à impregnação pela prata, foram capturadas imagens de 50 células, bem distendidas e não sobrepostas, em um microscópio binocular, em aumento 1000x, com óleo de imersão. Foi realizada a contagem das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989)(CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989) e então foi calculada a média de AgNORs/núcleo (mAgNOR). Um segundo parâmetro de avaliação utilizado foi o percentual de células com mais do que 1, 2, 3 e 4 AgNORs/núcleo (pAgNOR), de acordo com metodologia proposta por Xie et al. (1997)²⁷. A quantificação de AgNORs foi realizada por dois pesquisadores cegos e calibrados. A calibragem intra e inter-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ($\geq 0,75$).

Técnica para análise Morfológica (Papanicolau)

A análise morfológica dos esfregaços foi realizada pela observação das primeiras 100 células epiteliais distendidas e não sobrepostas, com o auxílio de microscópio binocular em aumento de 400x. Os diferentes tipos celulares foram quantificados: Célula anucleada, célula superficial com núcleo, célula intermediária, célula parabasal ou célula binucleada. A presença ou não de células inflamatórias foi descrita, porém não quantificada.

Análise Citomorfométrica

A análise citomorfométrica dos esfregaços foi realizada pela captura de imagem das primeiras 50 células epiteliais distendidas e não sobrepostas, com o auxílio do microscópio binocular em aumento de 400x acoplado a um software de captura de imagens (CellSens, Olympus) das lâminas histológicas. Foi traçado o contorno do núcleo e da célula usando o software ImageJ (National Institutes of Health), que fornece a área dessas medidas em unidade de μm . A partir dos dados coletados, foi obtida a relação núcleo/citoplasma das células capturadas. Para cada indivíduo foi calculada a média da relação núcleo/citoplasma das 50 células avaliadas.

Análise Estatística

Foi realizada a análise de distribuição dos dados para escolha dos testes estatísticos. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-wallis, ANOVA e teste T, de acordo com a distribuição dos dados. Foi considerada significância estatística quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Um total de 131 pacientes foi incluído no estudo, porém não foi possível realizar todas as análises para todos os pacientes, em função de perdas de amostras e o n amostral dos experimentos foram indicados em cada análise. As características demográficas da amostra estão descritas na tabela 1. Observamos que os pacientes dos grupos com lesões (Leucoplasia e CEC)

apresentaram média de idade mais elevada do que os demais. Observamos também um índice alto de ex-fumantes e ex-alcoolistas no grupo dos pacientes com CEC. A maior parte das lesões estava localizada em língua, rebordo alveolar e assoalho bucal. As leucoplasias foram subdivididas e analisadas em displásicas (n=11) e não displásicas (n=27).

Tabela 1. Dados demográficos e de hábitos dos pacientes incluídos no estudo.

	Grupo controle (n=26)	Grupo álcool/fumo (n=32)	Grupo leucoplasia (n=38)	Grupo CEC (n=35)
IDADE (média + DP)	50,92 (±16,03)	49,42 (±11,89)	60,16 (±11,51)	63,24 (±11,1)
GÊNERO	84,62% Masculino	93,75% Masculino	44,74% Masculino	88,58% Masculino
	15,38% Feminino	6,25% Feminino	55,26% Feminino	11,42% Feminino
FREQUÊNCIA DE FUMANTES	-----	71,87%	63,15%	34,28%
		15,6% Ex-fumantes	13,15 % Ex-fumantes	48,57% Ex-fumantes
PACKYEARS (média + DP)	-----	29,02 (±19,16)	32,83 (±23,19)	57,36 (±76,73)
BEBIDAS ALCÓOLICAS	-----	78,12%	39,47%	45,71%
		9,37% Ex-consumidor	2,56% Ex-consumidor	42,85% Ex-consumidor
LOCALIZAÇÃO DA LESÃO	-----	-----	LÍNGUA -----26,9%	ASSOALHO BUCAL—58,33%
			REBORDO ALVEOLAR-- 26,9%	LÍNGUA-----16,6%
			PALATO ----- 23,07%	REBORDO ALVEOLAR--16,6%
			ASSOALHO BUCAL ----- 11,5%	MUCOSA LABIAL ----- 8,3 %

MUCOSA JUGAL----- 3,8%

MUCOSA LABIAL ----- 3,8 %

O gráfico 2 apresenta os resultados referentes à análise de padrão de descamação das células nos diferentes grupos. Em relação à frequência de células inflamatórias, o grupo CEC apresentou 61,90 %, o grupo Leucoplasia 7,4 %, o grupo Álcool/fumo 4,3 % e o grupo Controle 5%. As células mais profundas do epitélio (parabasais e intermediárias) foram encontradas em maior número no grupo CEC. As células superficiais estavam presentes em maior número no grupo Controle e as escamas anucleadas estavam presentes em maior número no grupo Leucoplasia. As células binucleadas também foram analisadas e foram observadas médias de 0,52 ($\pm 2,06$) no grupo controle, 0,45 ($\pm 0,96$) no grupo álcool/fumo, 0,25 ($\pm 1,03$) no grupo leucoplasia e 1,33 ($\pm 1,68$) no grupo CEC.

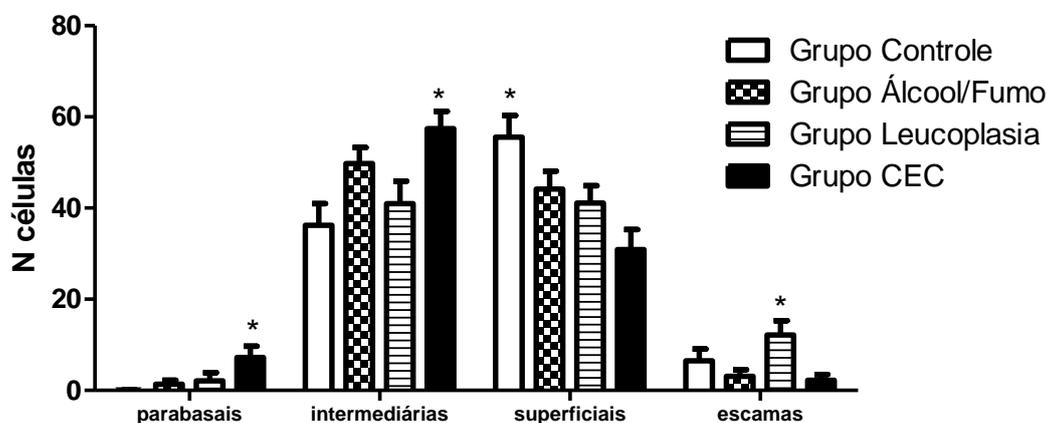


Gráfico 2. Distribuição dos tipos celulares encontrados nos esfregaços de acordo com os grupos. $p < 0,001$, Teste de ANOVA.

A tabela 2 apresenta os resultados referentes à velocidade de proliferação (AgNOR) das células nos diferentes grupos. O grupo Leucoplasia apresentou média e $p > 4$ maior que o grupo Controle ($p < 0,05$).

O gráfico 3 representa a relação núcleo/citoplasma das células nos diferentes grupos estudados. O grupo CEC apresentou uma maior relação núcleo/citoplasma estatisticamente significativa em relação aos outros grupos.

Após a quantificação, utilizamos o DNA para avaliar se há alteração cromossômica no locus 9p21 (tabela 4). Observamos um aumento na frequência de mutações por perda de heterozigosidade e instabilidade nos grupos expostos aos carcinógenos e no grupo Leucoplasia.

As Leucoplasias foram subdivididas em displásicas e não displásicas onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das variáveis estudadas.

Tabela 2. Dados referentes à velocidade de proliferação (AgNOR) de acordo com os grupos. p, Kruskal-wallis.

	mAgNOR		pAgNOR>1		pAgNOR>2		pAgNOR>3		pAgNOR>4	
	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3
Controle	2,48 ^a	(2.05-3.03)	77	(68-9,50)	52	(31-72,5)	20	(10-40)	4 ^a	(2-18,5)
Álcool-Fumo	2,90 ^{a,b}	(2.5-3.33)	86	(76-93)	58	(46,5-71)	31	(16.5-43)	14 ^{a,b}	(8,5-17,5)
Leucoplasia	3,19 ^b	(2.62-3.98)	92	(80-98)	72	(52-90)	40	(20-66)	18 ^b	(8-36)
L. Não displásica	3,06	(2.48-4.11)	88	(78-95)	62	(52-88)	40	(16-64)	18	(07-37)
L. displásica	3,40	(2.62-3.81)	92	(78-100)	74	(46-93)	40	(24-70)	20	(12-43)
CEC	3,00 ^{a,b}	(2.37-3.30)	88	(76-94)	66	(44-72)	30	(14-38)	10 ^{a,b}	(6-18)
<i>p</i>	0,0126		0,0576		0,0755		0,0594		0,0211	

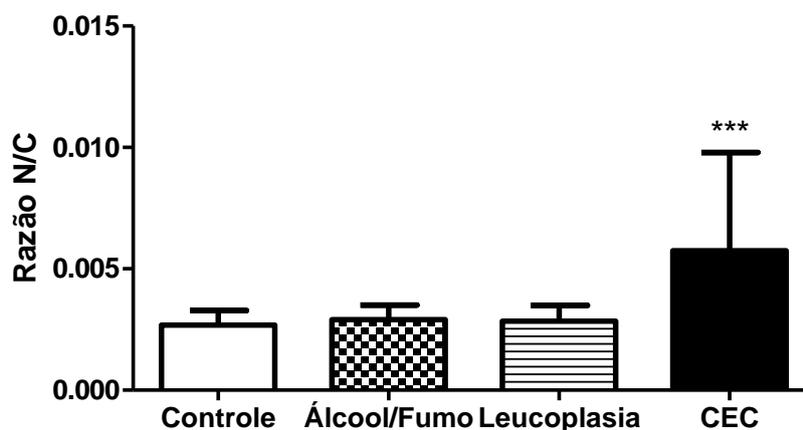


Gráfico 3. Distribuição da relação núcleo/citoplasma das células nos diferentes grupos estudados, de acordo com os grupos. $p < 0.001$, Teste de ANOVA.

Tabela 4. Frequência das alterações encontradas no locus 9p21 de acordo com os grupos estudados

	Homozigoto N (%)	Perda alélica (LOH) N (%)	Instabilidade (MSI) N (%)	Total Mutações em 9p21 N (%)
Controle N= 22	5 (23,80%)	3 (14,28%)	4 (19,04%)	7 (33,33%)
Álcool-fumo N= 29	4 (13,79%)	11 (37,93%)	6 (20,68%)	17 (58,62)
Leucoplasia N= 23	3 (12%)	12 (48%)	3 (12%)	15 (65,21%)
L. Não displásica N= 17	2 (11,76%)	10 (58,82%)	1 (5,8%)	11 (64,5%)
L. displásica N= 6	1 (16,6%)	2 (33,33%)	2 (33,33%)	4 (66,6%)
CEC N= 22	2 (9,52%)	4 (19,04%)	4 (19,04%)	8 (38,09%)

Avaliamos a associação de alterações em 9p21 com as outras técnicas (AgnOR, Papanicolau e Citomorfometria). Não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre nenhuma das associações.

Tabela 5. Dados referentes à mutação em 9p21 associando com as outras técnicas $p < 0,05$, teste T.

	Não mutado	Mutado	<i>P</i>
	Média (DP)	Média (DP)	
mAgNOR	2,92 (0,64)	3,1(0,79)	0,2795
AgNOR $p > 1$	84,81(12,64)	84,58 (12,36)	0,9360
AgNOR $p > 2$	58,94 (22,78)	61,54 (21,18)	0,6026
AgNOR $p > 3$	32,06 (19,15)	34,88 (21,82)	0,5552
AgNOR $p > 4$	11,88 (9,24)	16,71 (14,24)	0,0941
Cél. parabasais	1,33 (3,46)	3,87 (11,67)	0,3378
Cél. intermediárias	41 (21,94)	46,19 (24,46)	0,4430
Cél. superficiais	49,60 (21,34)	39,22 (21,96)	0,0999
Escamas anucleadas	5,40 (9,97)	7,81 (13,02)	0,4823
Cél. binucleadas	0,30 (0,92)	0,55 (1,70)	0,5503
Citomorfometria	0,002846 (0,0009966)	0,003787 (0,002955)	0,1468

DISCUSSÃO

Na busca de biomarcadores que sinalizem maior risco de transformação maligna, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21, a atividade proliferativa celular da mucosa bucal, a citomorfometria e o padrão de descamação das células de indivíduos em grupos de risco para o câncer de boca (grupos Álcool/fumo e Leucoplasia) comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos a carcinógenos, ou

então já com a presença de CEC. A citopatologia é uma metodologia com aplicação muito importante para realizar o rastreamento dos indivíduos com maior risco de desenvolver câncer, pois é uma forma de coleta não invasiva. Dessa forma, permite a análise da mucosa clinicamente normal, onde uma biópsia não seria indicada, além de permitir a coleta sistemática de amostras biológicas^{14,16}.

Através da coloração de Papanicolau realizamos duas análises, o padrão de descamação das células e a relação núcleo/citoplasma. Nossos resultados referentes ao padrão de descamação foram similares à literatura prévia. Verificamos que as células mais profundas ou menos diferenciadas do epitélio estavam presentes no CEC, assim como, Burzlaff et al. (2007)²⁸. Com o aumento das células intermediárias observamos uma diminuição das células superficiais nucleadas. Em contrapartida, as escamas anucleadas aumentaram significativamente no grupo Leucoplasia, assim como no estudo de Silva et al. (2017)²⁹. Dessa forma, podemos concluir que quanto maior a gravidade da lesão maior o número de células profundas ou indiferenciadas do epitélio, e nos pacientes com Leucoplasia, por ser uma lesão branca ceratinizada uma maior quantidade de células escamas anucleadas. Como observamos resultados estatisticamente significativos apenas em relação ao grupo CEC e considerando a maior ceratinização das Leucoplasias, a análise do padrão de descamação celular talvez não consiga mostrar as alterações precoces que ocorrem na mucosa bucal durante o processo de carcinogênese.

Em relação à aferição da razão núcleo/citoplasma celular encontramos aumento apenas no grupo CEC. Esse resultado é semelhante ao observado na análise do padrão de descamação, isso é esperado considerando que o padrão de descamação é determinado em parte pelo volume nuclear em relação ao volume celular. Khot et al. (2015)¹⁸, Sharma et al. (2015)³⁰ e Nivia et al. (2015)³¹ também observaram um aumento da relação núcleo/citoplasma no grupo CEC. Assim como em relação ao padrão de descamação, e considerando que o objetivo do nosso estudo é identificar os pacientes com maior risco para desenvolver o câncer bucal, os achados referentes à

citomorfometria não conseguem diferenciar os grupos de risco estudados em relação ao controle, portanto a utilização dessa técnica pode não ser eficaz.

Através da coleta citopatológica avaliamos a perda de heterozigosidade (LOH) no locus 9p21 nos diferentes grupos estudados. A maior frequência encontrada de mutações foram nos grupos expostos aos fatores de risco e no grupo Leucoplasia. Esses resultados confirmam essa análise como um possível e eficaz método de rastreamento nos pacientes com maior risco para o desenvolvimento do CEC. Califano et al. (1996)²⁴, já haviam observado em displasias epiteliais 57% de LOH no locus 9p21. Papadimitrakopoulou et al. (1997)³² observaram que a LOH acontece em torno de 39% das leucoplasias bucais, enquanto que em nosso estudo a LOH de 9p21 ocorreu em torno de 60% das leucoplasias estudadas.

O grupo de pesquisa de Rosin realizou dois estudos para avaliar a LOH em 9p21 e em outras regiões cromossômicas em leucoplasias. No primeiro estudo retrospectivo observaram uma frequência de 41,60% de LOH em 9p21 e no segundo estudo que era prospectivo observaram uma média 55,32%^{19,21}. No estudo prospectivo, 94,87% dos casos de leucoplasias que progrediram apresentava perda de 9p. Dessa forma, a LOH é um teste promissor para a detecção precoce dos pacientes com maior pré-disposição ao desenvolvimento do Câncer de boca.

Uma observação importante nos nossos resultados é que a frequência no grupo CEC foi menor em relação ao grupo Leucoplasia. Isso possivelmente se deve a um viés da coleta, pois no momento da coleta ocorre sangramento e o sangue é coletado juntamente com as células esfoliadas. Dessa forma, temos a presença de células do estroma no esfregaço, alterando assim as taxas de perda de heterozigosidade nesse grupo.

Outra análise que realizamos foi a velocidade de proliferação celular através da técnica de AgNOR. Observamos uma taxa de proliferação celular maior no grupo Leucoplasia em relação ao controle. Nos pacientes expostos e sem lesão os valores de AgNOR foram também maiores do que o controle apesar de não significativo. Considerando que o foco principal do nosso estudo são os pacientes de maior risco para o desenvolvimento do Câncer, logo, a

análise da velocidade de proliferação celular também parece ser um método promissor para o rastreamento desses pacientes. Nossos resultados são semelhantes com a literatura prévia, Cançado et al. (2001)³³, Paiva et al. (2004)¹⁴ e Ahmed et al. (2009)³⁴ utilizaram o método da citologia para estudar pacientes controle e expostos aos fatores de risco álcool/fumo e também observaram um aumento de mAgNOR nos pacientes expostos em relação aos controles. No entanto, Silva et al. (2017)²⁹ observaram que a taxa de proliferação foi maior no grupo CEC do que no Grupo controle e no grupo Álcool/Fumo em comparação com o grupo Leucoplasia. As médias e as diferenças entre os grupos variaram nos diferentes trabalhos, o que pode sugerir que a técnica é sensível a variação do observador e das amostras estudadas, sugerindo que a avaliação e interpretação deve ser individual.

O gene CDKN2A é um gene supressor de tumor e está localizado no locus 9p21. Quando inativado ocorre o descontrole do ciclo celular e uma proliferação celular desordenada. Detectamos uma tendência de maior atividade proliferativa nos pacientes com mutação em 9p21, apesar de não ser estatisticamente significativo. Observamos um aumento na atividade proliferativa, assim como uma maior frequência de mutações em 9p21 nos indivíduos expostos aos fatores de risco para o câncer de boca, assim como nos pacientes com lesões cancerizáveis. Dessa forma, a associação dessas duas técnicas pode ser útil no rastreamento e monitoramento de indivíduos em relação à carcinogênese bucal.

REFERÊNCIAS

AHMED, H. G. et al. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 7, p. 489–495, jul. 2010.

ANTUNES, J. L. F. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980–1998. **Oral Oncology**, v. 37, n. 4, p. 345–350, 1 jun. 2001.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **International Dental Journal**, v. 26, n. 4, p. 398–404, dez. 1976.

BÁNÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 265–267, out. 1991.

BARNES, L. et al. Epithelial precursor lesions. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. [s.l.] IARC Press, 2005. p. 177–179.

BIAZEVIC, M. G. H. et al. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. **Cadernos De Saude Publica**, v. 22, n. 10, p. 2105–2114, out. 2006.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. **Cytopathology: Official Journal of the British Society for Clinical Cytology**, v. 18, n. 6, p. 367–375, dez. 2007.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488–2492, 1 jun. 1996.

CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; FILHO, M. S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncology**, v. 37, n. 5, p. 446–454, jul. 2001.

CARRARD, V. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Diseases**, v. 17, n. 2, p. 171–179, mar. 2011.

CARRARD, V. C. et al. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 34, n. 2–3, p. 233–238, nov. 2004.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 5, p. 741–749, 20 fev. 2004.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **The Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 185–188, jul. 1989.

DELİLBAŞI, Ç. et al. Prevalence of Oral Precancerous. Lesions in a Selected Turkish Population. v. 33, p. 39–42, 2003.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar function and size in cancer cells. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 5, p. 1291–1297, maio 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. **The Journal of Pathology**, v. 191, n. 2, p. 181–186, jun. 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Review of Experimental Pathology**, v. 32, p. 149–192, 1991.

GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 29, n. 4, p. 231–238, ago. 2007.

GUERRA, E. N. DA S. et al. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. v. 51, n. 1, p. 31–37, 2005.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. v. 191, n. 49, 1983.

Home | **Smoking Pack Years.** Disponível em:
<<https://www.smokingpackyears.com/>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. **Oral Diseases**, v. 9, n. 6, p. 302–304, nov. 2003.

JONES, A. C. et al. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 77, n. 1, p. 95–99, jan. 1994.

KHOT, K. et al. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, n. 3, p. 22, 1 ago. 2015.

KRAMER, I. R. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 46, n. 4, p. 518–539, out. 1978.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 33, n. 5, p. 302–312, set. 1997.

LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M.-D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566–5582, 28 jun. 2011.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 33, n. 9, p. 525–532, out. 2004.

LOYO, M. et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head & neck**, v. 35, n. 3, p. 454–463, mar. 2013.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Molecular Medicine Today**, v. 3, n. 10, p. 442–448, 1 out. 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2016>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Molecular cancer research: MCR**, v. 1, n. 14, p. 1001–1008, dez. 2003.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leukoplakia: Original study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 18, n. Suppl 1, p. S32–S38, set. 2014.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, ago. 2002.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists**, v. 32, n. 4, p. 253–260, 2015.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 19, n. 2, p. 53–55, fev. 1990.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 4, p. 247–251, ago. 1998.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 28, n. 5, p. 216–220, maio 1999.

PAIVA, R. L. et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 26, n. 3, p. 175–180, jun. 2004.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V. et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. **Oncogene**, v. 14, n. 15, p. 1799–1803, 17 abr. 1997.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, abr. 2005.

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. **The Histochemical Journal**, v. 18, n. 1, p. 5–14, jan. 1986.

QUEIROZ, J. B. et al. Exfoliative cytology of the oral mucosa: comparison of two collection methods. **General Dentistry**, v. 58, n. 5, p. e196-199, out. 2010.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **The Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 93–102, fev. 1990.

REIBEL, J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47–62, 1 jan. 2003.

ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 1, p. 42–55, 10 mar. 2001.

ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 357–362, fev. 2000.

ROSIN, M. P. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 74, n. 3, p. 261–266, abr. 2008.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 619–625, set. 2003.

SCHEPMAN, K. P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. **European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, v. 32B, n. 6, p. 416–419, nov. 1996.

SEKINE, J. et al. Diagnostic accuracy of oral cancer cytology in a pilot study. **Diagnostic Pathology**, v. 12, 16 mar. 2017.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704–707, 16 dez. 1993.

SHARMA, D. et al. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. **International Journal of Health Sciences**, v. 9, n. 3, p. 283–291, jul. 2015.

SHARPLESS, N. E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutation Research**, v. 576, n. 1–2, p. 22–38, 25 ago. 2005.

SILVA, A. D. DA et al. Expression of E-cadherin and involucrin in leukoplakia and oral cancer: an immunocytochemical and immunohistochemical study. **Brazilian Oral Research**, v. 31, 2017.

SPAFFORD, M. F. et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 607–612, mar. 2001.

SQUIER, C. A.; COX, P.; HALL, B. K. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, n. 5, p. 276–279, maio 1986.

TEZAL, M. et al. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 183–189, fev. 2001.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 127–131, 1 abr. 2000.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, maio 2009.

VAN DER WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, n. 1, p. e33–e37, jan. 2013.

WALDRON, C. A.; SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, v. 36, n. 4, p. 1386–1392, out. 1975.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 37, n. 3, p. 127–133, mar. 2008.

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**, v. 79, n. 11, p. 2200–2208, 1 jun. 1997.

YARBROUGH, W. G. et al. Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53. **Cancer Research**, v. 62, n. 4, p. 1171–1177, 15 fev. 2002.

ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 9, p. 1081–1089, set. 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular (CEC) representa a maioria de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal. Apesar dos inúmeros esforços realizados no sentido de prevenir, diagnosticar precocemente e buscar novos protocolos de tratamento, o prognóstico desta doença pouco tem se modificado nas últimas décadas (NEVILLE; DAY, 2002; VAN DER WAAL, 2013), sendo mantidas taxas de sobrevida em torno de 50% em 5 anos (ANTUNES et al., 2001; BIAZEVIC et al., 2006). Em função disso, o câncer de boca requer a implementação de estratégias de combate mais eficazes. No entanto, além das campanhas de prevenção, para reduzirmos a mortalidade causada pelo câncer, é fundamental investir na pesquisa sobre detecção precoce dessas lesões, assim como na identificação de indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca. Dessa forma, seria possível agir de forma mais eficaz, insistindo na cessação de hábitos nocivos e utilizando-se terapias quimiopreventivas, por exemplo.

A literatura demonstra que é possível detectar alterações precoces em indivíduos expostos a esses fatores de risco (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007). O desafio atual é buscar biomarcadores que indiquem os pacientes com maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal. E a citopatologia tornou-se uma técnica promissora e eficaz nessa busca (GEDOZ et al., 2007).

Por acreditarmos no potencial desse tipo de metodologia utilizamos no nosso estudo algumas análises, dentre elas, a avaliação da perda de heterozigosidade (LOH) no locus 9p21, a avaliação da atividade proliferativa

celular através da técnica de AgNOR e o padrão de descamação e relação núcleo/citoplasma das células através da coloração de Papanicolau.

Encontramos resultados significativos através da LOH no locus 9p21 e na velocidade de proliferação celular nos pacientes de risco, com Leucoplasias e expostos à carcinógenos. Tornando esses métodos promissores no rastreamento e monitoramento de pacientes para o Câncer bucal.

As nossas perspectivas são o acompanhamento longitudinal dos pacientes, utilizando as técnicas propostas e verificando se elas são capazes de determinar alterações durante o processo de carcinogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H. G. et al. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 7, p. 489–495, jul. 2010.

ANTUNES, J. L. F. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980–1998. **Oral Oncology**, v. 37, n. 4, p. 345–350, 1 jun. 2001.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **International Dental Journal**, v. 26, n. 4, p. 398–404, dez. 1976.

BÁNÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 265–267, out. 1991.

BARNES, L. et al. Epithelial precursor lesions. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. [s.l.] IARC Press, 2005. p. 177–179.

BIAZEVIC, M. G. H. et al. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. **Cadernos De Saude Publica**, v. 22, n. 10, p. 2105–2114, out. 2006.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. **Cytopathology: Official Journal of the British Society for Clinical Cytology**, v. 18, n. 6, p. 367–375, dez. 2007.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488–2492, 1 jun. 1996.

CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; FILHO, M. S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncology**, v. 37, n. 5, p. 446–454, jul. 2001.

CARRARD, V. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Diseases**, v. 17, n. 2, p. 171–179, mar. 2011.

CARRARD, V. C. et al. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 34, n. 2–3, p. 233–238, nov. 2004.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 5, p. 741–749, 20 fev. 2004.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **The Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 185–188, jul. 1989.

DELİLBAŞI, Ç. et al. Prevalence of Oral Precancerous. Lesions in a Selected Turkish Population. v. 33, p. 39–42, 2003.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar function and size in cancer cells. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 5, p. 1291–1297, maio 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. **The Journal of Pathology**, v. 191, n. 2, p. 181–186, jun. 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Review of Experimental Pathology**, v. 32, p. 149–192, 1991.

GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 29, n. 4, p. 231–238, ago. 2007.

GUERRA, E. N. DA S. et al. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. v. 51, n. 1, p. 31–37, 2005.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. v. 191, n. 49, 1983.

Home | **Smoking Pack Years.** Disponível em:
<<https://www.smokingpackyears.com/>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. **Oral Diseases**, v. 9, n. 6, p. 302–304, nov. 2003.

JONES, A. C. et al. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 77, n. 1, p. 95–99, jan. 1994.

KHOT, K. et al. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, n. 3, p. 22, 1 ago. 2015.

KRAMER, I. R. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 46, n. 4, p. 518–539, out. 1978.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 33, n. 5, p. 302–312, set. 1997.

LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M.-D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566–5582, 28 jun. 2011.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 33, n. 9, p. 525–532, out. 2004.

LOYO, M. et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head & neck**, v. 35, n. 3, p. 454–463, mar. 2013.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Molecular Medicine Today**, v. 3, n. 10, p. 442–448, 1 out. 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2016>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Molecular cancer research: MCR**, v. 1, n. 14, p. 1001–1008, dez. 2003.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leukoplakia: Original study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 18, n. Suppl 1, p. S32–S38, set. 2014.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, ago. 2002.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists**, v. 32, n. 4, p. 253–260, 2015.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 19, n. 2, p. 53–55, fev. 1990.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 4, p. 247–251, ago. 1998.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 28, n. 5, p. 216–220, maio 1999.

PAIVA, R. L. et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 26, n. 3, p. 175–180, jun. 2004.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V. et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. **Oncogene**, v. 14, n. 15, p. 1799–1803, 17 abr. 1997.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, abr. 2005.

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. **The Histochemical Journal**, v. 18, n. 1, p. 5–14, jan. 1986.

QUEIROZ, J. B. et al. Exfoliative cytology of the oral mucosa: comparison of two collection methods. **General Dentistry**, v. 58, n. 5, p. e196-199, out. 2010.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **The Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 93–102, fev. 1990.

REIBEL, J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47–62, 1 jan. 2003.

ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 1, p. 42–55, 10 mar. 2001.

ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 357–362, fev. 2000.

ROSIN, M. P. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 74, n. 3, p. 261–266, abr. 2008.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 619–625, set. 2003.

SCHEPMAN, K. P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. **European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, v. 32B, n. 6, p. 416–419, nov. 1996.

SEKINE, J. et al. Diagnostic accuracy of oral cancer cytology in a pilot study. **Diagnostic Pathology**, v. 12, 16 mar. 2017.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704–707, 16 dez. 1993.

SHARMA, D. et al. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. **International Journal of Health Sciences**, v. 9, n. 3, p. 283–291, jul. 2015.

SHARPLESS, N. E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutation Research**, v. 576, n. 1–2, p. 22–38, 25 ago. 2005.

SILVA, A. D. DA et al. Expression of E-cadherin and involucrin in leukoplakia and oral cancer: an immunocytochemical and immunohistochemical study. **Brazilian Oral Research**, v. 31, 2017.

SPAFFORD, M. F. et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 607–612, mar. 2001.

SQUIER, C. A.; COX, P.; HALL, B. K. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, n. 5, p. 276–279, maio 1986.

TEZAL, M. et al. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 183–189, fev. 2001.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 127–131, 1 abr. 2000.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, maio 2009.

VAN DER WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, n. 1, p. e33–e37, jan. 2013.

WALDRON, C. A.; SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, v. 36, n. 4, p. 1386–1392, out. 1975.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 37, n. 3, p. 127–133, mar. 2008.

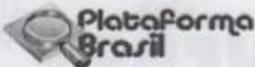
XIE, X. et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 79, n. 11, p. 2200–2208, 1 jun. 1997.

YARBROUGH, W. G. et al. Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53. **Cancer Research**, v. 62, n. 4, p. 1171–1177, 15 fev. 2002.

ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 9, p. 1081–1089, set. 2012.

6 ANEXOS

Anexo 1

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-REITORIA DE PESQUISA -	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL		
Pesquisador: Fernanda Visioli		
Área Temática:		
Versão: 3		
CAAE: 06949612.7.0000.5347		
Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul		
Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 261.037		
Data da Relatoria: 04/04/2013		
Apresentação do Projeto:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Objetivo da Pesquisa:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060 UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br		
		Página 01 de 02



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 261.037

Recomendações:

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 02 de Maio de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Bruno Cassel Neto
Vice-Pró-Reitor de Pesquisa
PROPEQUIFRG

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- pacientes sem lesão

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: **“ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL”** será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo determinar a frequência de perda de heterozigidade, uma alteração genética associada à maior risco de desenvolvimento de câncer de boca. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá sua boca examinada e terá células coletadas, aplicando uma pequena escova na sua mucosa da borda da língua e abaixo da mesma, e também uma gota de sangue do seu dedo para obtenção de amostras de DNA para posterior avaliação genética de suas células. Se você concordar, suas amostras de DNA poderão ser armazenadas por um período de até 5 anos para possíveis estudos complementares a esse com o mesmo objetivo de identificar alterações associadas com maior risco de câncer de boca. Você aceita que suas amostras sejam armazenadas? () Aceito () Não aceito

Além disso, você poderá entrar em contato a qualquer momento para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização das suas amostras. Fica assegurado que você será informado de qualquer resultado que possa influenciar seu tratamento. Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes de um exame odontológico comum e à punção digital do seu dedo para coleta de sangue. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas.

Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa. Caso decida participar e depois mude de idéia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento.

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

Nome Completo: _____

Telefone: _____

Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 201__.

O pesquisador responsável por este estudo é Fernanda Visioli, telefone de contato: (51) 33085011.

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

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o telefone para contato é: (51) 33083629

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- pacientes com lesão

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: **“ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL”** será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo determinar a frequência de perda de heterozigosidade, uma alteração genética associada à maior risco de desenvolvimento de câncer de boca. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá sua boca examinada e terá células coletadas, aplicando uma pequena escova na sua mucosa da borda da língua e abaixo da mesma, e também uma gota de sangue do seu dedo para obtenção de amostras de DNA para posterior avaliação genética de suas células. Além disso, será feita uma biópsia para determinar por meio de um exame microscópico as alterações existentes nas células deste local. Este procedimento deve ser realizado independente da sua participação no estudo, pois o mesmo é fundamental para definição do melhor tratamento para o seu caso. Se você concordar, suas amostras de DNA poderão ser armazenadas por um período de até 5 anos para possíveis estudos complementares a esse com o mesmo objetivo de identificar alterações associadas com maior risco de câncer de boca.

Você aceita que suas amostras sejam armazenadas? ()Aceito ()Não aceito

Você poderá entrar em contato a qualquer momento para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização das suas amostras. Fica assegurado que você será informado de qualquer resultado que possa influenciar seu tratamento. Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes de um exame odontológico comum e à punção digital do seu dedo para coleta de sangue. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas.

Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa. Caso decida participar e depois mude de idéia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento.

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

Nome Completo: _____

Telefone: _____

Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 201__.

O pesquisador responsável por este estudo é Fernanda Visioli, telefone de contato: 51.33085011

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

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o telefone para contato é: (51) 33083629

Anexo 3

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

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

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

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

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

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

1.10. Você estudou até:

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

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

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

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

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

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

2.4. Você usa algum produto para bochecho

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

2.5. Com que frequência

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

2.6. Quando iniciou o uso?

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

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

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

3. Fatores comportamentais

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

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos _____

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

3.5 Quantos cigarros por dia _____

3.6 Por quantos anos _____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

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

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

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

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

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

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4. Artrite () () ()

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

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

4.7. Qual ? _____

Anexo 4

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:

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

da gelatina e, uma em água destilada na temperatura ambiente.

- Reidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Permount (Fisher ChemAlert®).

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