



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**RAFAEL JOSÉ VARGAS ALVES**

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLEOS PARA O**  
**DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL**

Porto Alegre,  
julho de 2012

**RAFAEL JOSÉ VARGAS ALVES**

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLEOS PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

Porto Alegre,  
julho de 2012

**RAFAEL JOSÉ VARGAS ALVES**

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLEOS PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

**Banca Examinadora**

---

**Profa. Dra. Juliana Balbinot Hilgert**, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

---

**Prof. Dr. Fernando Neves Hugo**, Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de  
Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

---

**Profa. Dra. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade.**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio de Pádua e Giselle Vargas Alves, ao meu irmão, Felipe Vargas Alves e a minha noiva e futura mãe dos meus filhos Johanna Dagort Billig, pelo apoio irrestrito durante todo este processo.

## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este estudo, deixo o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que me auxiliaram na realização desta dissertação.

À professora Mary Clarisse Bozzetti, pela orientação neste trabalho e pelas oportunidades de crescimento geradas.

Ao bolsista Francisco de Assis Carvalho Medella Junior, pela colaboração na coleta e armazenamento dos dados.

À professora Dra. Maria Cristina Muneratto, por todo apoio logístico nas coletas e agendamento com os pacientes.

À Dra. Ada Regina Schenini Diehl, por compartilhar o seu extenso conhecimento sobre citologia e acima de tudo o seu entusiasmo com a pesquisa científica.

À Izeti Pacheco da Silveiro, pelo comprometimento nas análises dos micronúcleos.

À Vera Lúcia Sievert, pelo carinho, comprometimento e profissionalismo na execução deste projeto com a preparação e armazenamento das lâminas.

Ao serviço de Citopatologia do HCPA, pelo carinho com que me receberam e pelo auxílio no decorrer do trabalho.

Agradeço ainda o apoio financeiro e metodológico do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA.

Agradeço, por fim, ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e todos os seus professores pelo apoio constante e nível de excelência.

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
1.1 O câncer de cavidade oral: um problema de saúde pública.....	11
1.2 O Teste de Micronúcleos e o Câncer.....	13
1.3 O Teste de Micronúcleos e o Câncer de Cavidade Oral.....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>19</b>
<b>ARTIGO</b> .....	<b>23</b>
<b>THE DIAGNOSTIC ACCURACY OF MICRONUCLEUS ASSAY IN ORAL CAVITY LESIONS.</b> .....	<b>24</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>24</b>
Methodology.....	25
Participants .....	25
Sample size.....	25
Cell collection, fixation and staining.....	25
Scoring criteria .....	26
Statistical analysis .....	26
Results .....	27
Discussion.....	27
<b>REFERENCES</b> .....	<b>377</b>
<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>39</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>40</b>

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

CCO	Câncer de Cavidade Oral
CO	Cavidade oral
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MN	Micronúcleos
TMN	Teste de Micronúcleos
FMN	Frequência de Micronúcleos
OMS	Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

A incidência de câncer de cavidade oral vem aumentando progressivamente em todo mundo, conforme dados da OMS. Não obstante, o diagnóstico de CCO costuma ser feito tardiamente, resultando em uma menor sobrevida para esses pacientes. Por isso, a investigação de novos métodos de diagnóstico precoce pode contribuir para a redução da mortalidade dessa neoplasia. O teste de micronúcleos para o monitoramento de indivíduos com alto risco de CCO vem demonstrando ser um método de baixo custo e de fácil aplicação. É relevante ressaltar; entretanto, que não há relatos na literatura sobre a acurácia diagnóstica do teste de micronúcleos para lesões da cavidade oral. Desta forma, o presente estudo teve o objetivo de verificar a sensibilidade e a especificidade do teste de micronúcleos para detectar lesões de cavidade oral malignas ou potencialmente malignas. Trata-se de um estudo transversal com 48 participantes, que foram submetidos à biópsia de lesões da cavidade oral no ambulatório de Estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras de células esfoliadas foram coletadas em dois sítios diferentes da cavidade oral e a coloração de *Feulgen* foi utilizada para análise dos micronúcleos. As frequências de micronúcleos em amostras da área peri-lesional que foram maiores que 0,0005 apresentaram uma sensibilidade de 63,6% (49,9 – 77,2) e uma especificidade de 43,2% (29,1 – 57,9). Os valores preditivo positivo e preditivo negativo foram respectivamente de 25% (12,7 – 37,2) e 80% (68,6 – 91,3). Esses resultados sugerem que o teste de micronúcleos é pouco sensível e específico.

## ABSTRACT

The World Health Organization predicts a continuing worldwide increase in the number of patients with oral cancer. Moreover, late diagnosis is often a reality for oral cavity cancer patients, leading to a poor overall survival rate. Investigations of screening methods that could contribute to early detection of cancer are; therefore, highly desirable. The micronucleus assay is a non-evasive, rapid, simple, sensitive and cost-effective bio-marker of chromosome damage. Nevertheless, as far as we know, there are no reports of the sensitivity and specificity of micronucleus test frequency for detecting malignant or potentially malignant oral cavity lesions in the literature. In order to fill this gap, we carried out a cross-sectional study with 48 participants presenting oral cavity lesion, who were indicated to undergo surgery biopsy (our reference standard) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Samples of exfoliated cells were collected from two different sites in the oral cavity and Feulgen-Fast-Green staining was used to analyze the micronucleus. Eleven patients (22.9%) presented malignant or potentially malignant oral cavity lesions. In samples of perilesional area, micronucleus frequencies that were higher than 0.0005 had a sensitivity of 63.6% (49.9 - 77.2) and a specificity of 43.2% (29.1 - 57.9). The predictive positive (PPV) and negative (PNV) values were 25% (12.7 - 37.2) and 80% (68.6 - 91.3) respectively. These results suggest that the micronucleus test is low sensitivity and specificity.

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na dissertação de mestrado intitulada “DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLEOS PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 25 de julho de 2012. O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

- 1) Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos;
- 2) Artigo(s);
- 3) Conclusões e Considerações Finais.

Documentos de apoio, incluindo o Projeto de Pesquisa, estão apresentados nos anexos.

## INTRODUÇÃO

O câncer de cavidade oral está entre as dez neoplasias de maior incidência no mundo, apresentando algumas variações entre as diferentes regiões geográficas [1]. A OMS estima um aumento na incidência do CCO para as próximas décadas [2]. No Brasil, estimam-se 9.990 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.180 em mulheres para o ano de 2012 [3]. Aproximadamente 95% das neoplasias da cavidade oral são carcinomas de células escamosas, e o tabagismo e o etilismo são importantes fatores de risco [4].

Apesar dos avanços nas áreas de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida de cinco anos do CCO pouco se alterou nas últimas décadas, permanecendo em torno de 60% [5]. Sendo assim, o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico precoce em conjunto com melhorias no acesso à saúde pela população são medidas essenciais para alterar esse panorama mundial do câncer de cavidade oral.

Uma revisão sistemática (*The screening programmes for early detection and prevention of oral cancer - Cochrane Review*) tem investigado a efetividade de diferentes métodos de rastreamento que possam diminuir a mortalidade do câncer de cavidade oral. Os pesquisadores concluíram que, por enquanto, não há evidências sólidas que apontem a inspeção visual ou qualquer outro método como efetivos para diminuição da mortalidade. [6].

O teste de micronúcleos com células esfoliadas da cavidade oral tem-se mostrado um biomarcador e preditor de lesões malignas da cavidade oral [7-8]. A formação de um micronúcleo é um indicador de mutação cromossômica – uma alteração genética que resulta em instabilidade genômica e é uma alteração comum em muitas neoplasias [9]. Entretanto, não há disponibilidade na literatura de estudos que reportem as propriedades diagnósticas (sensibilidade e especificidade) do teste de micronúcleos nas lesões malignas da cavidade oral.

Portanto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar as propriedades diagnósticas do teste de micronúcleos em células esfoliadas da cavidade oral.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 O câncer de cavidade oral: um problema de saúde pública

A cavidade oral é definida como a região que se estende dos lábios à junção entre o palato duro e mole, superiormente, e a linha das papilas circunvaladas, inferiormente. A CO pode ser subdividida em regiões como lábios, gengivas, língua, assoalho da boca, palato duro e trigono retromolar. A mucosa das diferentes regiões da CO relaciona-se de maneira distinta com as estruturas adjacentes. Essa variabilidade resulta nas características de desenvolvimento dos tumores nessas regiões que podem diferir, quanto à tendência de invasão e o potencial metastático.

O carcinoma de células escamosas é o grande representante (90-95%) das neoplasias da CO [4-10]. A célula de origem do CCE é o Queratinócito. Mutações no DNA dos Queratinócitos podem ser o ponto de partida do processo carcinogênico, induzindo uma célula de Queratinócito sadia a progredir para uma lesão pré-maligna ou potencialmente maligna. Conseqüentemente, os Queratinócitos tornam-se autônomos, apresentando características histológicas como a invasão da membrana basal e posteriormente metástases para linfonodos e demais órgãos. [10]

O câncer de cavidade oral representa 40% das neoplasias de cabeça e pescoço, ocupando uma posição de destaque devido a sua alta incidência e elevadas taxas de morbidade e mortalidade [11]. A incidência do CCO é alta, variando de 1-10 casos por 100.000 habitantes em muitos países. No sul do continente asiático, o CCO está entre as três neoplasias mais prevalentes. Na Índia, a incidência chega a 12,6 casos para 100.000 habitantes. O CCO é mais comum em países em desenvolvimento [12]. Entretanto, tem-se observado o aumento da incidência em países desenvolvidos como, por exemplo, Dinamarca, França, Alemanha, Escócia, Japão, Austrália e Estados Unidos da América. [12]

Segundo dados do INCA, no Brasil, estimam-se 9.990 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.180 em mulheres para o ano de 2012. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres [8].

A disparidade entre as diferenças de prevalências entre homens e mulheres (2:1) tem-se alterado ultimamente, seguindo uma tendência para a igualdade. Provavelmente, essa

tendência se deve ao aumento da exposição de carcinógenos (tabaco e álcool) entre as mulheres [13-14].

O perfil epidemiológico do CCO vem apresentando algumas mudanças nas últimas décadas. O CCO no lábio vem apresentando um declínio na sua incidência. Provavelmente, pelo maior esclarecimento sobre os cuidados com a radiação ultravioleta. Entretanto, alguns pesquisadores têm observado um aumento significativo na incidência de CCO na língua, principalmente entre a população jovem, fato este atribuído ao consumo exagerado de álcool e tabaco [10].

O risco de um tabagista ativo desenvolver um CCO é de cinco a nove vezes maior do que o de um não fumante. Além disso, esse risco pode chegar a ser 17 vezes maior em tabagistas pesados (mais de 80 cigarros por dia) [15,16]. A maconha também tem sido apontada como risco potencial no desenvolvimento de CCO, e esse dado também poderia contribuir para o aumento da incidência de CCO na população mais jovem [17].

O consumo de bebida alcoólica tem sido apontado como o maior fator de risco para o desenvolvimento de cânceres do trato aéreo-digestivo. Um estudo francês, por exemplo, mostrou que etilistas pesados (>100g de álcool/dia) [18] têm 30 vezes mais chances de desenvolver CCO, e que quando associado ao tabagismo esse risco absoluto aumenta para 100 vezes. Esse sinergismo entre o tabaco e o álcool tem sido estudado em diversas neoplasias, pois se acredita que o álcool possa potencializar o efeito carcinogênico do tabaco pela solubilização de compostos carcinogênicos presentes no mesmo [19].

Ademais, evidências recentes têm mostrado também uma associação entre o Papiloma vírus humano (HPV 16 e 18) e o CCO [20]. Fatores dietéticos como, por exemplo, baixo consumo de frutas e vegetais, também tem sido relatado como fator de risco para CCO. [21]

Apesar dos avanços nas áreas de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida em cinco anos do CCO pouco se alterou, nas últimas décadas, permanecendo em torno de 60% [5].

Provavelmente, o fato de as neoplasias se apresentarem de forma assintomática, atrasando seu diagnóstico, e a falta de acesso da população aos serviços de saúde são fatores que contribuíram para manter a sobrevida do CCO quase que inalterada nas últimas décadas. A dificuldade de acesso aos serviços de saúde é um fator importante no qual há uma relação direta com fatores socioculturais. Fatores que podem ser ilustrados no estudo prospectivo, entre 1985 e 1996, que mostrou que a sobrevida em cinco anos do CCO de língua em afro-americanos foi de 27%, enquanto a sobrevida na raça branca foi de 47% [22]. Leite &

Koifman observaram que 50% dos pacientes diagnosticados com CCO atendidos em um hospital de referência na cidade do Rio de Janeiro (Brasil) já se encontravam em estágio IV e apenas 8,1% em estágio I [23]. Além disso, Miglorati e colaboradores observaram que indivíduos com CCO do momento do diagnóstico até o início da terapia decorriam em média 65,7 dias [24].

Em suma, há uma relação direta entre a dificuldade de acesso ao serviço de saúde e a realização do diagnóstico precoce. Portanto, concomitante com a política de prevenção, é necessário garantir o acesso dos usuários ao serviço de saúde em conjunto com o desenvolvimento de ferramentas que possam auxiliar no diagnóstico precoce.

## 1.2 O Teste de Micronúcleos e o Câncer

Os micronúcleos (MN) são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico.

No início do século XX, os MN foram observados pela primeira vez por Howell no citoplasma de eritrócitos que os designou como “fragmento de material nuclear”. Posteriormente, Evans *et al.* [25] utilizaram os MN como marcadores de dano citogenético quando irradiaram *in vitro* raízes de cebola (*Vicia faba*) para verificar o dano mutagênico. Em 1970, Boller & Schimid utilizaram pela primeira vez a designação Teste de Micronúcleos (TMN) ao testarem *in vivo* na medula óssea de roedores.

O TMN baseia-se na identificação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula - formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo. A análise de MN é usada como padrão de aberrações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes que interferem no processo de ligação do cromossomo às microfibras do fuso ou aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas. Desta forma, uma frequência elevada de micronúcleos é um dado essencial na identificação de grupos de populações - expostas a agentes aneugênicos e/ou clastogênicos - e, portanto com risco elevado de desenvolver câncer [26]. Há relatos na literatura sobre o potencial do teste de micronúcleos no diagnóstico de neoplasias em geral. Entretanto, são poucos os estudos que relatam as propriedades do teste de micronúcleo como, por exemplo, sensibilidade, especificidade, acurácia e seus valores preditivos positivos e negativos. Além

disso, a maior parte dos estudos, que possui um delineamento aceitável para avaliação de um teste diagnóstico, foi realizada com o teste de micronúcleos *in vitro*. Um exemplo deste tipo de estudo foi o estudo de caso e controle realizado na Itália que avaliou o teste de micronúcleos em cultura de linfócitos como biomarcador para câncer. O estudo italiano mostrou que os indivíduos que apresentaram uma frequência de micronúcleos maior ou igual a 2.5/1000 células apresentaram uma maior associação com o desenvolvimento de câncer (OR=10.7; 95% IC=4.6-24.9;  $p < 0.0001$ ) [26]. El-Zein *et al.* [27] mostraram que o teste de micronúcleos em cultura de linfócitos pode ser uma boa ferramenta para rastreamento de câncer de pulmão entre fumantes com um valor preditivo positivo de 94,8% e preditivo negativo de 92,6%. Recentemente, Bonassi *et al.* [28] publicou um estudo com mais de 6.700 indivíduos de dez países diferentes que corroborou para uma associação entre o desenvolvimento de câncer e o aumento de micronúcleos em cultura de linfócitos.

Entretanto, como mencionado anteriormente, os estudos que relatam acurácia do teste de micronúcleos utilizam a metodologia com cultura de linfócitos *in vitro*. Este fato prejudica uma maior generalização dos resultados para tipos específicos de neoplasias.

O TMN apresenta várias etapas (coleta das células, tipo de coloração e análise) de sua execução que são suscetíveis a vieses. Sendo assim, diversos pesquisadores da área criaram o *Human Micronucleus Project* (HUMN), que coleta e organiza informações sobre as frequências dos micronúcleos nas diferentes populações, analisa os fatores de variância e compara diversas técnicas empregadas. O objetivo principal é a padronização de protocolos e a realização de estudos prospectivos que permitam avaliar o teste de micronúcleo (*in vitro*) como biomarcador de risco de câncer, assim como de outras doenças crônicas [29].

### **1.3 O Teste de Micronúcleos e o Câncer de Cavidade Oral**

Em células esfoliadas da cavidade oral, o TMN foi aplicado pela primeira vez por Stich *et al.* em 1982 [30]. Mais tarde, diversos estudos comprovaram a eficácia do TMN (*in vivo*) como indicador de danos citogenéticos em células do epitélio de revestimento oral, brônquico e esofágico [30-31].

O TMN permite identificar um aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. Além disso, o TMN com células esfoliadas permite observar direto no tecido alvo a ação de diversos agentes genotóxicos nas mucosas expostas a tabaco, álcool e radiação [29].

Yildirim *et al.* [32] observaram que pacientes com câncer e sem tratamento prévio apresentaram uma maior instabilidade genômica em células da mucosa oral quando comparados com pacientes saudáveis, sugerindo que o aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral poderia ser um biomarcador de risco de câncer no trato aéreo-digestivo superior. Essa hipótese é sustentada pela teoria da cancerização de campo [33]. Além disso, um aumento significativo da frequência de micronúcleos em células bucais foi observado em pacientes com neoplasias de útero e mama quando comparados com indivíduos saudáveis [34].

Desta forma, a avaliação das células da mucosa oral é de grande valia, pois é a primeira barreira que entra em contato, via inalação ou ingestão, com produtos de potencial carcinogênico. Aproximadamente 90% das neoplasias são de origem epitelial. Sendo assim, o tecido epitelial é o sítio preferido para eventos genotóxicos induzidos por agentes carcinogênicos que entram em contato direto com a mucosa.

A mucosa oral apresenta uma contínua renovação celular. As células novas são produzidas na membrana basal e posteriormente migram para a camada superficial da mucosa, substituindo as células que sofreram apoptose ou necrose. A membrana basal possui células-tronco que podem apresentar danos genéticos (quebra ou perda cromossômica), como os micronúcleos durante a sua divisão celular.

Carvalho *et al.* [35] avaliaram a FMN como preditor de risco de recidiva local e desenvolvimento de um segundo sítio primário em vinte e sete pacientes com CCO que foram acompanhados. Os pesquisadores não encontraram uma relação entre a FMN e o risco de recidiva local e/ou desenvolvimento de um segundo sítio primário. Apenas evidenciaram um incremento estatisticamente significativo da FMN dos pacientes com tumores em estágios iniciais (I e II) quando comparados com os pacientes em estágios mais avançados.

Ramirez & Saldanha [36] observaram um aumento na frequência de micronúcleos nas células bucais esfoliadas da mucosa adjacente a carcinomas de pacientes alcoolistas quando comparados aos da mucosa clinicamente normal do sítio contralateral. Bloching *et al.* [37] e Casartelli *et al.* [38] tiveram achados similares em raspados de carcinomas quando comparados a lesões pré-malignas e nessas quando comparadas à mucosa normal.

Kamboj & Mahajan [7] realizaram um estudo no qual compararam a FMN de pacientes com CCO, Leucoplasia e hígidos. Os autores observaram um aumento significativo da FMN de pacientes com CCO e Leucoplasia quando comparados com os indivíduos sadios. Além disso, os pesquisadores observaram um aumento na sensibilidade de detecção de micronúcleos quando esses eram analisados com aditivo da fluorescência na coloração em

células coletadas da área Perilesional. Da mesma forma, Chatterjee *et al.* [39] compararam a FMN entre três diferentes grupos: pacientes com CCO ou Leucoplasia, doenças benignas da cavidade oral e indivíduos hígidos. A FMN entre os pacientes com CCO foi quatro vezes maior quando comparada com os indivíduos com outras doenças da cavidade oral.

Outro estudo indiano realizado por Saran *et al.* [8] também mostrou um aumento da FMN em pacientes com CCO e lesões pré-neoplásicas em comparação com pacientes hígidos. Entretanto, o estudo citado recebeu muitas críticas, pois 70% da amostra não foi submetida ao TMN e não foi reportada nenhuma explicação sobre as exclusões.

Nenhum dos estudos mencionados reportou a acurácia do teste de micronúcleos, quando pesquisado em células bucais.

A acurácia do teste foi bem descrita em um estudo transversal realizado no Brasil, no qual os pesquisadores compararam a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da cavidade bucal entre pacientes com câncer de cavidade oral e pessoas saudáveis. O teste de micronúcleo apresentou uma sensibilidade de 27,2%, especificidade de 97% e valores preditivo positivo e negativo de 32,8% e 96,2% respectivamente[40]. Entretanto, nem todos os indivíduos foram submetidos ao padrão ouro (biópsia). Além disso, não houve pareamento correto entre algumas variáveis que podem resultar em viés de confusão como, por exemplo, a variável sexo masculino que se encontrava distribuída desigualmente entre o grupo câncer e o controle (63% vs. 35%).

A sobrevida dos pacientes com câncer de cavidade oral pouco progrediu nas últimas quatro décadas, mesmo com a grande evolução nos tratamentos oncológicos. A curta sobrevida dessas neoplasias está estritamente ligada ao seu diagnóstico tardio.

O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, de baixo custo, não invasivo e que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico (fumantes e elitistas). Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que o hábito de consumo crônico de álcool e tabaco não está só relacionado com o aumento das taxas de desenvolvimento de carcinomas orais, mas também com o aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral [41-44].

Provavelmente, devido à falta de estudos que oferecessem um melhor embasamento do potencial do teste de micronúcleos em diferenciar lesões benignas e malignas da cavidade oral, Holland *et al.*[9] criaram o Projeto HUMNXL (HUMANMicroNucleus/eXfoLiAted), que tem como principal objetivo buscar a padronização da metodologia da realização do teste de micronúcleos em células humanas da cavidade oral. O projeto também tem como objetivo avaliar se a elevada taxa de micronúcleos, em células da cavidade oral, é um fator preditivo

para o desenvolvimento de câncer [9]. Em 2009, os mesmos pesquisadores publicaram na *Nature Protocols* [41] um protocolo de coleta de células e análise de micronúcleos que poderia ser considerado o padrão-ouro na literatura mundial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a acurácia do teste de micronúcleos para o diagnóstico de lesões da cavidade oral.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a acurácia do teste de micronúcleos para diferenciar lesões malignas ou potencialmente malignas de lesões benignas da cavidade oral;
- Identificar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e seus respectivos intervalos de confiança do teste de micronúcleos com base nos dados obtidos no presente estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Who. Oral health. [Internet]. Global Data on Incidence of Oral Cancer. [acesso em 2012 20 jan.] Disponível em:  
[http://www.who.int/entity/oral\\_health/publications/cancer\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/entity/oral_health/publications/cancer_maps/en/index.html).
2. World Health Organization. The World Oral Health Report 2003. Geneva: World Health Organization; 2003: p.6-7.
3. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (Brasil); Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2012. [acesso em 2012 jan. 20]. Disponível em:  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
4. LaVecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997; 33:302-12.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/), based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.
6. Kujan O, Glennly AM, Oliver RJ, Thakker N, Sloan P. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
7. Kamboj M, Mahajan S. Micronucleus--an upcoming marker of genotoxic damage. *Clin Oral Investig*. 2007 jun;11(2):121-6. Epub 2006 Oct 10.
8. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol*. 2008 apr;44(4):354-60. Epub 2007 Oct 23.
9. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* (2008), DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>.
10. Crispian Scully and Jose Bagan. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology* 2009; 45:301–308.
11. Dedivitis, RA; França, CM; Mafra, ACB; Guimarães, FT; Guimarães, AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev. Bras. de Otorrinolaringologia* 2004 jan-fev; 70: 35-40.

12. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol.* 2009 abr-mai; 45(4-5): 454-60.
13. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268- 274.
14. Silverman SJR. Epidemiology. In: Silverman SJR. *Oral Cancer*. 4th ed. Hamilton: BC Decker Inc;1998. p.1-6.
15. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72:1369-1375.
16. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:459-462.
17. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, et al. Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1071-1078.
18. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282- 3287.
19. Andre K, Schraub S, Mercier M, et al. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995;31B:301-309.
20. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011 Apr 17; Suppl 1:58-72. DOI <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x>.
21. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 1995;61:437S-445S.
22. Silverman, SJR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001;132:7S-11S.
23. Leite, ICG, Koifman, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* 1998; 34: 347-52.
24. Costa, ED, Migliorati, CA. Câncer bucal: avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. *Rev. Bras. de Cancerologia* 2001; 47 (3): 283-289.
25. Savage JRK, Neary GJ, Evans HJ. The Rejoining Time of Chromatid Breaks Induced by Gamma Radiation in Vicia faba Root Tips at 3°C. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960 feb; 7(1): 79-85.

26. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res*. 2008 mar;639(1-2):27- Epub 2007 Nov 13.
27. El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 May;17(5):1111-9.
28. Bonassi M, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland NT, Kirsch-Volders N, Zeiger E, Ban S, Barale B, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulski-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Jaksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2006 (E-pub).
29. Fenech M, Holland N, Chang PW, Zeiger E, Bonassi S. The human micronucleus project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research* 1999; 428: 271-283.
30. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer* 1982; 30:553-9.
31. Lippman SM, Peters E J, Wargovich M J. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int J Cancer* 1990; 45:811-5.
32. Yildirim IH, Yesilada E, Yologlu S. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Genetika* 2006; 42:705-710.
33. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer (Phila)* 1953; 6:963-968.
34. Nersisyan AK, Adamyan RT. Micronuclei level in exfoliated buccal mucosa cells of patients with benign and malignant tumors of female reproductive organs and breast. *Tsitol Genet*. 2004; 38:72-75.
35. Carvalho MB et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(4): 317-22
36. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. *Genet. Mol. Res*. 2002 sept; 1(3): 246-260.
37. Bloching, M. et al. Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa to Predict the Relative Risk of Cancer in the Upper Aerodigestive Tract Using the MN-assay. *Oral Oncol*. 2000 nov; 36 (6): 550-555.

38. Casaeteli, G. et al. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. *Anal.Quant.Cytol. Histol.* 2000 dec; 22 (6): 486-492.
39. SumanaChatterjee, SoujatyaDhar, BaniSengupta, AshishGhosh, Manas De, Sumit Roy, Ranjan Roy Chowdhury,SilaChakrabarti. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: The micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2009; 19(6–7), 427–433.
- 40 Skeff, M. A. Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal. [dissertação] [internet]. Fortaleza – CE. Universidade Federal do Ceará; 2006. [acesso em 2012 Fev 21]. Disponível em:  
[http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1882/1/2006\\_dis\\_maspmiranda.pdf](http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1882/1/2006_dis_maspmiranda.pdf).
- 41 Kayal J, Trivedi A, Dave B,Nair J, Nair U, Bhide S, Goswami U,Adhvaryu S, Incidence of micronuclei in oral mucosa of users of tobacco products singly or in various combinations, *Mutagenesis* 8 (1993) 31–33.
- 42 Konopacka M., Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells, *Neoplasma* 50 (2003) 380–382.
- 43 Suhas S, Ganapathy K, Gayatri M, Ramesh C, Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer, *Mutat. Res.* 561 (2004) 15–21
- 44 Stich H, Rosin M, Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells, *Int. J. Cancer* 31 (1983) 305–308.
45. Thomas P, Holland N,Bolognesi C, Kirsch-Volders M,Bonassi S,Zeiger E,Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleuscytome assay. *Nature Protocols* 2009; 4(6).

## ARTIGO

O presente estudo teve o objetivo de verificar a acurácia do teste de micronúcleos para o diagnóstico de lesões malignas ou potencialmente malignas da cavidade oral. Trata-se de um estudo transversal com pacientes, virgens de tratamento oncológico, que realizaram uma biópsia de lesão da cavidade oral. Os indivíduos da pesquisa são pacientes que consultaram no serviço de Estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de janeiro de 2010 a janeiro de 2011. No período de estudo 146 biópsias foram realizadas no serviço de Estomatologia. Entretanto, apenas 50 indivíduos preenchem todos os critérios de inclusão, pois a maioria dos pacientes (n=68), que foram submetidos à biópsia, já tinham realizado algum tratamento oncológico prévio (critério de exclusão).

A coleta de células foi realizada em dois sítios diferentes: (A) mucosa jugal de sítio anatômico oposto ao sítio da lesão primária a ser submetida à biópsia e (B) mucosa da área peri-lesional. As coletas foram realizadas com auxílio de uma escova Citobrush Plus. Após a coleta as amostras foram fixadas em lâminas com etanol 100%. As lâminas foram coradas pela reação de Feulgen e analisadas em microscópio óptico no laboratório de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os indivíduos foram estratificados conforme o resultado do exame anatomopatológico: pacientes com lesões malignas ou potencialmente malignas (n=11) e pacientes com lesões benignas (n=37). As características clínicas e demográficas eram semelhantes entre os dois grupos, exceto pelo consumo de álcool ter sido mais prevalente no grupo de lesões malignas.

Quando utilizamos como ponto de corte uma frequência de micronúcleos maior que 0,0005, observamos uma sensibilidade e especificidade de 63,6% e 43,2% respectivamente, para células da região peri-lesional. Utilizando o mesmo ponto de corte, mas com células da mucosa jugal, observamos uma sensibilidade de 45,4% e uma especificidade de 45,9%. Tanto as amostras da região Peri-lesional quanto as amostras da mucosa jugal apresentaram um valor preditivo negativo em torno de 80%.

A *performance* diagnóstica do teste de micronúcleos foi abaixo de nossas expectativas. Entretanto, esses resultados podem ser atribuídos a algumas limitações do estudo, principalmente o tamanho da amostra. Contudo, acreditamos que a discussão levantada no presente estudo acerca de questões metodológicas possa vir a contribuir para pesquisas futuras.

## **The diagnostic accuracy of micronucleus assay in oral cavity lesions.**

Rafael José Vargas Alves

Maria Cristina Munerato

Francisco de Assis Carvalho Medella

Ada Regina Schenini Diehl

Izeti Pacheco da Silveiro

Vera Lúcia Sievert

Mary Clarisse Bozzetti

### **INTRODUCTION**

Oral cancer is a serious global healthcare problem due to its rising incidence and common late-stage presentation. Oral cancer holds the fifteenth position in the cancer incidence ranking worldwide, with epidemiologic variations between different geographic regions [1]. The World Health Organization expects a rise in worldwide oral cancer incidence in the next decades [2]. It is estimated that these tumors will account for 310,520 new cases and 151,614 deaths in the worldwide in 2015 [1]. In Brazil, 14,170 new cases of oral cancer are expected for 2012 [3]. Approximately 95% of oral cancers are squamous cell carcinoma; smoking and alcohol intake being important risk factors [4-7].

Despite the advancements in therapy approaches adopted (surgery, radiation, and chemotherapy), the 5-year survival rate of oral cancer has not been significantly improved over the past several decades, remaining at about 50 to 60% [8]. In fact, this cancer has a low survival rate, largely due to the fact that it often goes undiagnosed until it is at an advanced stage. This aspect points out the importance of effective screening methods capable of detecting oral cancer as early as possible — since treatment produces the best results before cancer has already spread.

There is some evidence that visual inspection reduce death rates in patients who use tobacco and alcohol [9]. However, for general population, there is no concluding evidence to help decide whether screening by visual inspection reduces the death rate for oral cancer, and no evidence for other screening methods (Cochrane Review) [9]. For this reason, new instruments for early detection are necessary not only to reduce its incidence, but also to improve survival rates.

The micronucleus test (MNT) might be a viable tool for oral cancer biomarker discovery as already suggested in previous studies [10-12]. Analysis of chromosomal alterations in oral cells may be an interesting alternative for evaluating genetic instability and consequently, it could be an important tool for early oral cancer diagnosis — as already demonstrated [13-15]. The conceptual basis for the use of MNT as biomarker relies on the fact that several cytogenetic abnormalities are found in cancer cells, supporting the hypothesis that chromosome damage is directly involved in cancer etiology [16]. Therefore, confirmation of this hypothesis is crucial for the validation of MN as predictive of oral cancer [17].

In previous risk assessment of oral cancer patients, a significant increase was demonstrated in the percentage of micronucleated cells in comparison with control to pre-cancer; and with pre-cancer to cancer patients [10]. Kamboj & Mahajan [11] also obtained similar results when patients with healthy mucosa were compared with leukoplakia and oral cancer patients.

Nevertheless, there is not enough evidence that report the diagnostic accuracy of micronucleus test (sensitivity and specificity) with oral cavity lesions.

Hence, this study aimed at assessing the sensitivity and specificity of (MN) frequency - in exfoliated buccal mucosa cells - for detecting malignant or potentially malignant oral cavity lesions, having biopsy (histopathology) as the reference standard.

## **Methodology**

This study received approval from Hospital de Clínicas de Porto Alegre's (HCPA) Ethics Committee (protocol: 09-426). All participants signed an informed consent form before being enrolled in the study.

## **Participants**

We carried out a cross-sectional study of a population of patients who were receiving care at a Stomatology Clinic (tertiary care) from HCPA (Porto Alegre- Brazil) between January of 2010 and January of 2011. Patients were prospectively enrolled during the period of the study. Participants met the following inclusion criteria: (i) presenting oral cavity lesion which was indicated to undergo surgery biopsy (our reference standard); (ii) no previous history of treatment for malignant or potentially malignant oral cavity lesions, following Scully and Bagan [18] ; (iii) being over 40 years of age. Patients with previous history of viral and/or bacterial infections, head and neck irradiation, and drug abuse were excluded. Based on the histopathologic exams, analysed by experienced pathologist, we categorized the study's participants as follows: untreated patients with malignant or potentially malignant oral cavity lesions (ML group) and untreated patients with benign oral cavity lesions (BL group).

## **Sample size**

In order to determine the sample size, we took Flahault and collaborators' study [19] into consideration. For a sensitivity of 0.90, considering that the lower 95% confidence limit should not fall below 0.7 with 0.95 probability, the exact number of patients is 41 for the group of cases. To determine the number of controls needed, we used the following formula:  $N_{controls} = N_{cases} [(1-Prev)/ Prev]$ . We estimated a prevalence of 30% of malignant and potentially malignant of oral cavity lesions.

## **Cell collection, fixation and staining**

Before surgery biopsy, case history and personal details were recorded. Prior to the collection of smears, patients were instructed to remove prostheses and rinse their mouth twice with filtered water. Exfoliated buccal cells were collected by rubbing two distinct anatomic sites: perilesional area and buccal mucosa (right

cheek). Citobrush Plus (Kolplast Comercial Industrial LTDA, Brazil) was used to collect epithelial cells from each site. A circular expanding motion was used with citobrush to enhance sampling over greater area. The material was spread onto a labeled glass slide for microscopy. For the purpose of analysis, the slides were fixed in 100% ethanol and identified by a code to keep the examiner blinded to the study group's information. Once appropriately identified, the slides underwent Feulgen Fast green reaction according to Nature protocols [20]. The staining process and slide analysis were done in Cytopathology Laboratory at HCPA.

### **Scoring criteria**

The scoring criteria for the micronucleus in the assay are mainly based on those originally described by Tolbert et al. [21]. Cells with micronuclei are characterized by the presence of both a main nucleus and one or more smaller nuclear structures called micronuclei. The suggested criteria for identifying cells with micronuclei are: (a) rounded smooth perimeter suggestive of a membrane; (b) less than a third of the diameter of the associated nucleus, but large enough to discern shape and color; (c) Feulgen positive (i.e. pink in bright field illumination); (d) staining intensity similar to that of the nucleus; (e) texture similar to that of nucleus; (f) same focal plane as nucleus; and (g) absence of overlap with, or bridge to, the nucleus.

A total of 2000 cells/donor — from each anatomic site smeared — were scored on coded slides by one scorer under a LEICA optical microscope at 1,000 x magnification, to get a quantification of the micronucleus presents in the different groups. All the slides were analyzed in Cytopathology Laboratory at HCPA by two experienced cytologists independently and, subsequently, a consensus analysis was performed.

### **Statistical analysis**

To verify the normality of the sample, the Shapiro-Wilk's test was used. The categorical variables were described in terms of their absolute frequency. The Chi-square test was used to compare the categorical variables. Mean and standard deviation were used to describe the quantitative variables with symmetric distribution and the t-Student test was used to compare these variables. When normality was not observed, the data were compared by the Mann Whitney test. The quantitative variables with asymmetric distribution were described by using median (min. to max.). Micronuclei frequency of the assay was expressed as the number of events per 1000 cells [20]. We used standard methods to calculate sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values. The McNemar's test was used to compare the sensitivity and the specificity between perilesional and buccal mucosa sites. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was used to compare the value of the area under the curve between perilesional and buccal mucosa sites. The significance level considered was  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the statistical software SPSS, version 16.0.

## Results

A total of 146 patients were submitted to biopsy of oral cavity lesion in the Stomatology Clinic from HCPA between January of 2010 to January of 2011. The majority of the 146 patients submitted to biopsy had a previous diagnosis of oral cancer and had followed a treatment. These patients were part of a follow up program to make early diagnosis of tumor recidive. Only 50 out of 146 patients met the inclusion criteria (see figure 1).

During the course of the study, buccal cells from two patients in the control group were excluded due to poor quality of the material. Therefore, the final study sample was composed of 48 patients (37 in the BL group and 11 in the ML group). The collection of smears and the surgery biopsy were performed on the same day and no adverse events were reported during our study.

Demographic and clinical characteristics of the 48 patients and results of histopathologic exams (our reference standard) are reported in Table 1 and 2 respectively.

We did not find any statistical significance in terms of mean age, body mass index, male/female ratio, smoking status, and smoking consumption. Nevertheless, there were more male participants and smokers in the ML group. We also had more drinkers in the ML group than in the BL group ( $p=0.003$ ). However, when comparing the estimate of alcohol exposure period and dose consumption per day, we did not find any statistical significance. Participants were also comparable in terms of mate consumption (tea-like beverage habitually consumed in South America).

Regarding the median of micronucleus frequency in the perilesional area and in the buccal mucosa, we did not find a significant difference when comparing the ML group with the BL group (table 3).

The micronucleus frequencies higher than 0.0005 had a sensitivity of 63.6% (49.9 - 77.2) and a specificity of 43.2% (29.1 - 57.9) in samples of perilesional area. On the other hand, a decrease of sensitivity to 45.4% was observed (table 4) in buccal samples, but it did not reach statistical significance ( $p=0.581$ ). The predictive positive (PPV) and negative (PNV) values were also calculated (table 5). Considering the same cutoff, when we analyzed perilesional area, we found a PPV of 25% (12.7 - 37.2) and a PNV of 80% (68.6 - 91.3). The area under the curves (with 95% confidence intervals) was 0.49 (0.31-0.67) for smears coleted in perilesional area and 0.42 (0.24 - 0.60) for buccal mucosa ( $p=0.432$ ). The area (figure 2) under the curves (with 95% confidence intervals) was 0.49 (0.31-0.67) for smears coleted in perilesional area and 0.42 (0.24 - 0.60) for buccal mucosa ( $p=0.432$ ).

## Discussion

As described earlier, elevated frequencies of micronucleated cells reveal genotoxic action of carcinogens and may indicate a high probability for the formation of particular chromosome changes, which could be associated with neoplastic transformation due to the effect of these changes on oncogene expression [16]. However, in our study elevated frequencies of micronucleated cells did not show a great sensitivity and specificity for malignant oral cavity lesions diagnosis.

There is evidence of the micronucleus test as a biomarker of cancer in general population given by *in vitro* studies. For instance, El-Zein and collaborators showed that the micronucleus test in a lymphocyte culture

can be a valuable tool for the screening of lung cancer among smokers, with a positive predictive value of 94.8% and a negative predictive value of 92.6% [22]. Another study showed that individuals who had a frequency of micronucleus equal or higher than 2.5/1.000 cells presented a higher association with the development of cancer (OR=10.7; 95% IC=4.6-24.9;  $p < 0.0001$ ) [23].

However, theoretically, *in vivo* tests are more specific than *in vitro* ones. Saran (2008) [10], Kamboj (2007) [11] and Suhas (2004) [26] observed the relation between an increase in the frequency of micronucleus and malignant lesions in the oral cavity. Ramirez and collaborators [12] observed a higher frequency of micronucleus in the exfoliated buccal cells from mucosa adjacent to the carcinomas than the frequency obtained from the cells in the contralateral side. Bloching et al. [24] and Casartelli et al. [25] also had similar findings. They noticed higher frequency of micronucleus cells in exfoliated cells from carcinomas than in pre-malignant lesions and normal mucosa. Exfoliated buccal cells are a rich source of tissue for monitoring genetic damage and studies, showing that the micronucleus test is a useful tool for predicting oral cancer [24-25].

Despite these results, evidence for diagnostic accuracy of micronucleus test is needed. An attempt to this was clearly described in cross-sectional study carried out in Brazil by Skeff [27]. In this study, researchers compared the frequency of micronucleus in exfoliated buccal cells from patients with oral cancer with the ones from healthy people. The micronucleus test presented a sensitivity of 27,2%, a specificity of 97% and predictive positive and negative values of 32,8% and 96,2% respectively, when a cutoff higher than two micronucleus was used.

In the present study, all patients were submitted to biopsy as we aimed at verifying the sensitivity and specificity of the micronucleus test for detection of malign or potentially malign oral cavity lesions. In order to avoid methodological bias, we followed the Buccal micronucleus cytome assay protocol [20] in terms of collection of buccal cells, slide preparation and staining as well as scoring criteria, which is recommended by the HUMNXL project [28].

In relation to clinical characteristics, we noticed a statistically significant prevalence of alcohol drinkers in the ML group (80% vs. 21.6%;  $p = 0.003$ ), but this difference might have not influenced the analysis since the alcohol exposure period and the estimated dose consumption per day did not reach significance. Despite the lack of statistical significance, the ML group presented a higher prevalence in the variables considered risk factor for oral cancer (male sex, smoker and hot beverage drinker).

The mean occurrence percentage of micronucleated cells (table 3) was lower than that observed in previous studies [10-12; 23-27], which must be the result of differences in terms of methodological analysis. Due to a lack of standardization in the micronucleus tests, the comparison of our results with previous studies is complex.

Regarding micronucleus assay diagnostic accuracy, when adopting a micronucleus frequency cut-off higher than 0.0005, we noticed a sensitivity of 63.6% and a specificity of 43.2% in the peri-lesional smear site. However, the sensitivity of the buccal mucosa decrease 45.4% and its specificity is kept at 45.9%.

The main difference between our study and Skeff's study is the high specificity and the negative predictive value obtained by the latter. Nevertheless, due to methodological differences (such as cell collection and scoring criteria), the comparison between the results is limited.

As with all studies, the current study has a number of limitations. First, our sample size was too small. We did not reach the expected amount of participants, according to the sample size estimation. Second,

the external validity of the findings is limited because the study was conducted at a single institution. Third, other useful indices of chemical exposure such as binucleates, karyolysis, and karyorrhexis were not studied.

In conclusion, the results of the study should be treated with caution due to the previously mentioned limitations. Notwithstanding these limitations, we believe that the methodological issues raised in this study point to some relevant directions or recommendations for future research.

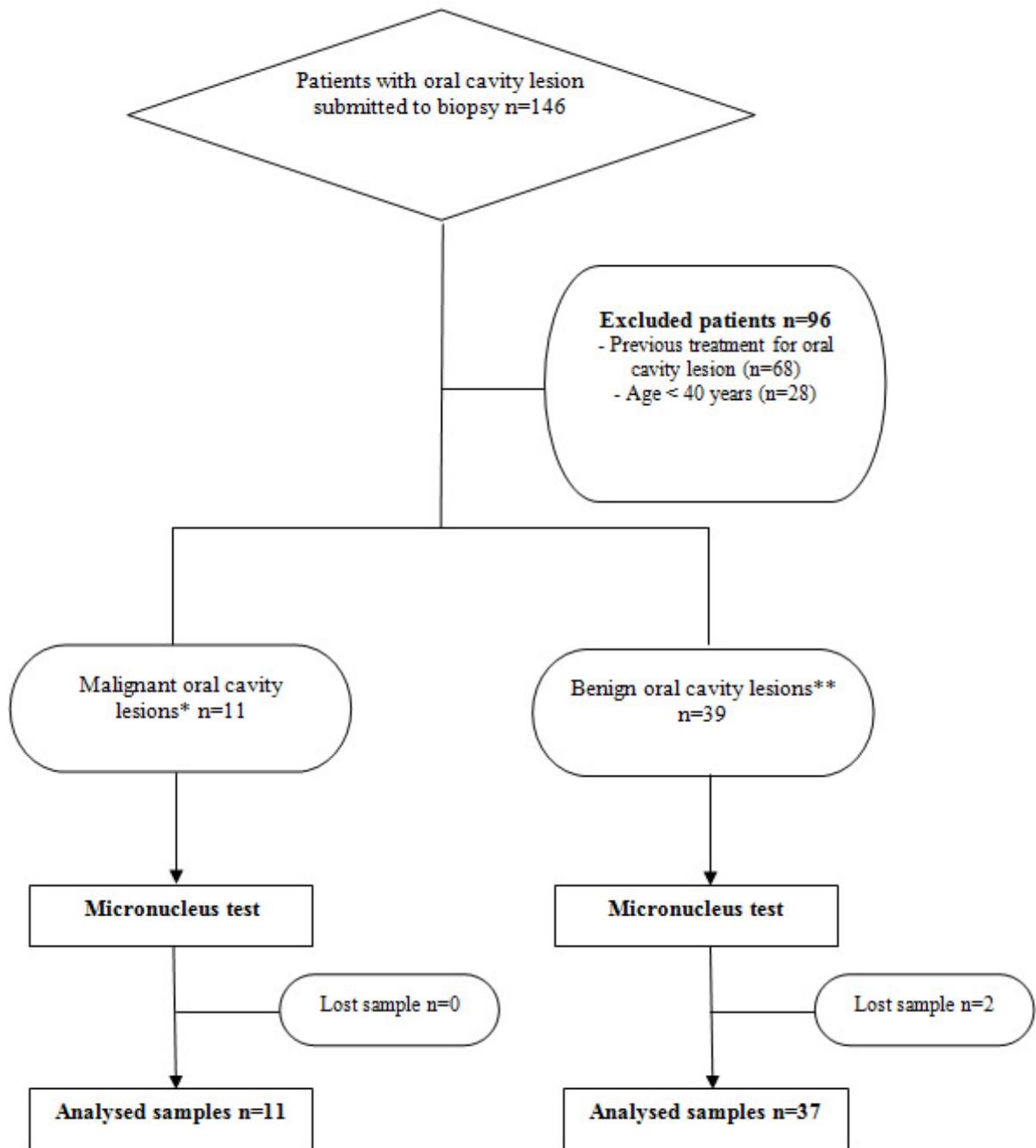


Figure 1: Enrollment and Outcomes

Table 1.  
Demographic and Clinical Characteristics.

	ML group (n=11)	BL group (n=37)	p
Age, years	61.2 ± 8.6	57.5 ± 11.2	0.315†
Male sex, n(%)	7(63.6)	17 (45.9)	0.247Ω
Current or Previous Smoker (less than five years), n(%)	9(81.8)	24(64.8)	0.249Ω
Packs per year	50.6 (4.5 to 157.8)	31.8 (2.86 to 246.6)	0.453‡
Alcohol use, n(%)	8(80)	8 (21.6)	0.003Ω
Alcohol exposure period, years	10.0 (3.0 to 20.0)	18.0 (0.25 to 48)	0.597‡
Alcohol dose consumption per day(g)	34.4 (20.6 to 344.0)	40.0 (0.34 to 137.6)	0.429‡
Mate consumption, n(%)	9(81.8)	29 (78.4)	0.587Ω
Mate consumption per day, liters	0.5 (0.25 to 2)	1.0 (0.2 to 20)	0.454‡
BMI, Kg/m <sup>2</sup>	25.8 ± 5.5	26.6 ± 3.9	0.588†

†=mean ± sd (t-test); Ω=Chi-square; ‡= median (min to max) - Mann-Whitney U.

Table 2.  
The distribution of oral cavity lesions

Malignant or potentially malignant oral cavity lesions (ML group) n=11	
	n
Squamous cell carcinoma	8
Carcinoma <i>in situ</i>	1
Actinic cheilitis	1
Focal displasia	1
Benign oral cavity lesions (BL group) n=37	
Epithelial hyperplasia	6
Acanthosis	9
Keratosi	3
Irritation fibroma	2
Fibroepithelial hyperplasia	4
Fibrous hyperplasia	4
Squamous papilloma	4
Papilloma virus	1
Chronic inflammation	4

Table 3.  
The micronucleus frequency among groups.

	ML group (n=11)	BL group (n=37)	p
Perilesional area	0.001 (0 to 0.004)	0.001 (0 to 0.02)	0.949
Buccal mucosa	0 (0 to 0.003)	0.001 (0 to 0.01)	0.403

\*Median (min to max)- Mann-Whitney U  
The micronucleus frequency=micronucleus scored/1000

Table 4.

Sensitivity and Specificity for Malignant or potentially malignant oral cavity lesion, by cutpoints of Micronucleus frequency and by smear site.

Micronucleus frequency	Peri-lesional				Buccal mucosa			
	Sensitivity	IC 95%	Specificity	IC 95%	Sensitivity	IC 95%	Specificity	IC 95%
<b>0.0005</b>	63.6%	(49.9 - 77.2)	43.2%	(29.1 - 57.9)	45.4%	(31.3 - 54.4)	45.9%	(31.8 - 59.9)
<b>0.0015</b>	45.4%	(31.3 - 54.4)	62.1%	(28.3 - 55.1)	18.1%	(7.2 - 28.9)	64.8%	(51.2 - 78.3)
<b>0.0025</b>	18.1%	(7.2 - 28.9)	67.5%	(54.2 - 80.7)	18.1%	(7.2 - 28.9)	75.6%	(63.4 - 87.7)
<b>0.0035</b>	0.09%	(0 - 3.5)	81.0%	(69.9 - 82.0)	0%	NS	83.7%	(73.2 - 94.1)
<b>0.0045</b>	0%	NS	83.7%	(73.2 - 94.1)	0%	NS	86.4%	(76.7 - 96.0)

NS= Not significant

Table 5.

Predictive positive value (PPV) and negative predictive value (PNV) for Malignant or potentially malignant oral cavity, by cutpoints of micronucleus frequency and by smear site.

Micronucleus frequency	Peri-lesional				Buccal mucosa			
	PPV	IC 95%	PNV	IC 95%	PPV	IC 95%	PNV	IC 95%
0.0005	25	12.7 - 37.2	80	68.6 - 91.3	20	8.6 - 31.3	73.9	61.4 - 86.3
0.0015	26.3	13.8- 38.7	79.3	67.8 - 90.7	13.3	3.7 - 22.9	72.7	60.1 - 85.3
0.0025	14.2	4.3 - 24.1	73.5	61.0 - 86.0	18.1	7.2 - 29.0	75.6	63.5 - 87.8
0.0035	12.5	3.1 - 21.8	75	62.7 - 87.2	0	0	73.8	61.3 - 86.2
0.0045	0	0	73.8	61.3 - 86.2	0	0	74.4	62.0 - 86.7

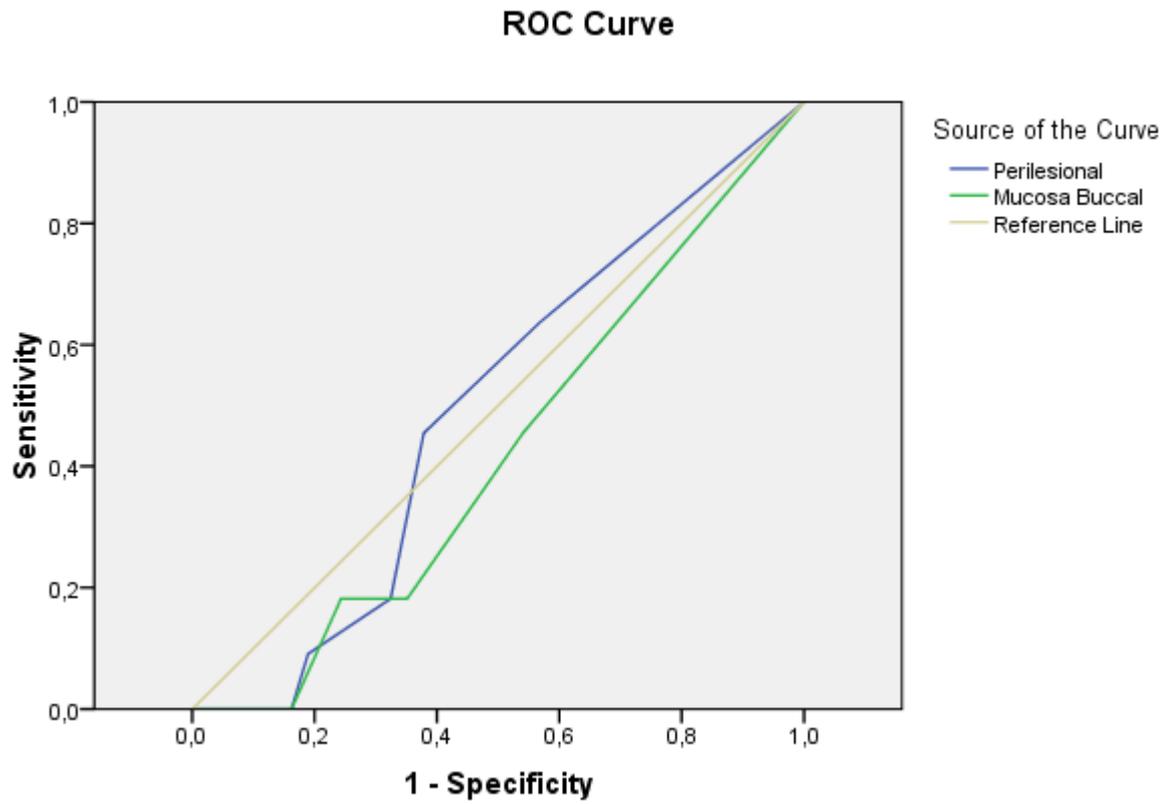


Figure 2: ROC curve

## REFERENCES

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 20/02/2012.
2. World Health Organization. The World Oral Health Report 2003. Geneva: World Health Organization; 2003. p.6-7
3. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2012. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>, accessed on 20/02/2012
4. LaVecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33:302-12
5. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72:1369-1375.
6. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:459-462.
7. Andre K, Schraub S, Mercier M, et al. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995;31B:301-309.
8. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/), based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.
9. Kujan O, Glennly AM, Oliver RJ, Thakker N, Sloan P. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
10. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol*. 2008 Apr;44(4):354-60.
11. Mala Kamboj and Sumita Mahajan. Micronucleus—an upcoming marker of genotoxic damage. *Clin Oral Investig*. 2007 Jun;11(2):121-6.
12. Ramirez A, Saldanha PH (2002) Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1(3): 246–260
13. Joseph Califano, Peter van der Riet, William Westra, Homaira Nawroz, Gary Clayman, Steven Piantadosi, Russell Corio, Daniel Lee, Benjamin Greenberg, Wayne Koch, and David Sidransky. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2488-92
14. Rossin Mp, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, et al.: Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000, 6:357-62.

15. Sudbø J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. DNA content as prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2001; 344:1270-8.
16. Mitelman, F. Mertona and B. Johansson, A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia, *Nat. Genet.* (1997), pp. 417–474.
17. M. Fenech, N. Holland, W.P. Chang, E. Zeiger and S. Bonassi, The HUman MicroNucleus Project: an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* (1999), pp. 271–283
18. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):301-8. Epub 2009 Feb 26
19. Antoine Flahault, Michel Cadilhac, Guy Thomas. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *Journal of Clinical Epidemiology* 58 (2005) 859–862.
20. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2009; 4(6).
21. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 1991 Oct 15;134(8):840-50.
22. El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 May;17(5):1111-9
23. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res.* 2008 Mar 1;639(1-2):27- Epub 2007 Nov 13
24. Bloching, M. et al. Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa to Predict the Relative Risk of Cancer in the Upper Aerodigestive Tract Using the MN-assay. *Oral Oncol., Oxford*, v. 36, no. 6, p. 550-555, Nov. 2000.
25. Casaeteli I, G. et al. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol., St. Louis*, v. 22, no. 6, p. 486-492, Dec. 2000.
26. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. : *Mutat Res.* 2004 Jul 11;561(1-2):15-21
27. Skeff, M. A. Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal. [dissertação] [internet]. Fortaleza – CE. Universidade Federal do Ceará; 2006. [acesso em 2012 Fev 21]. Disponível em: [http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1882/1/2006\\_dis\\_masp Miranda.pdf](http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1882/1/2006_dis_masp Miranda.pdf)
28. Nina Holland, Claudia Bolognesi, Micheline Kirsch-Volders, Stefano Bonassi, Errol Zeiger, Siegfried Knasmueller, Michael Fenech. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* (2008), doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *performance* diagnóstica do teste de micronúcleos foi abaixo das nossas expectativas. O teste mostrou uma sensibilidade e especificidade que não poderiam ser aceitas em um cenário de rastreamento populacional de doenças da cavidade oral.

Entretanto, o nosso estudo apresentou algumas limitações que podem ter influenciado nos resultados finais. O tamanho amostral abaixo do planejado pode ter influenciado nos resultados encontrados. Contudo, acreditamos a metodologia do estudo e o protocolo de análise do teste de micronúcleos foram adequados e que poderiam servir como modelo para os próximos estudos que tenham o objetivo de avaliar as propriedades diagnósticas do teste de micronúcleos.

## **ANEXOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**RAFAEL JOSÉ VARGAS ALVES**

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLOEOS PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL**

Orientadora: Profa. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

Porto Alegre, 24 de novembro de 2009

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
1.1 Generalidades do câncer de cavidade oral.....	43
1.2 O teste de micronúcleos e suas relações com o diagnóstico do câncer .....	45
1.3 O teste de micronúcleos e suas relações com o diagnóstico do câncer de cavidade oral ...	45
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>47</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 Objetivo geral .....	48
3.2 Objetivos específicos .....	48
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>49</b>
4.1 População .....	49
4.2 Descrição da amostra.....	49
4.3 Critérios de inclusão .....	49
4.4 Critérios de exclusão .....	49
<b>5 PROCEDIMENTOS .....</b>	<b>50</b>
5.1 Coleta de dados.....	50
5.2 Análise de Micronúcleos .....	50
5.3 Análise da presença de HPV (genótipos 6,11,16 e 18) .....	51
5.4 Variáveis .....	52
5.5 Análise dos dados .....	52
5.6 Aspectos éticos .....	53
<b>6 CRONOGRAMA.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Generalidades do câncer de cavidade oral

O câncer da cavidade oral (CCO) tem em seu tratamento um dos maiores desafios para oncologistas, otorrinolaringologistas e cirurgiões de cabeça e pescoço. Na maioria das vezes, o seu diagnóstico é feito tardiamente devido à escassez de métodos de rastreamento e diagnóstico precoce dessa neoplasia.

O carcinoma de células escamosas é o grande representante das neoplasias de cavidade oral. Este tipo de câncer comumente ocorre em indivíduos de meia idade ou velhos. Entretanto, nos últimos anos tem se observado o aumento da incidência dessa neoplasia em indivíduos jovens.<sup>1-3</sup> A disparidade entre as diferenças de prevalências entre homens e mulheres (2:1) tem se alterado muito ultimamente, seguindo uma tendência para a igualdade. Provavelmente, essa tendência se deve ao aumento da exposição de carcinógenos (tabaco e álcool) entre as mulheres.<sup>3,4</sup>

Apesar do pouco progresso no rastreamento e diagnóstico precoce dessas neoplasias, inúmeros estudos epidemiológicos têm observado os principais fatores de risco para o câncer de cavidade oral. O conhecimento dos fatores de risco é o primeiro passo para se desenvolver protocolos com o intuito do diagnóstico precoce. O tabaco e o álcool são os principais fatores de riscos.

O risco de um tabagista ativo desenvolver um câncer oral é de cinco a nove vezes maior do que o de um não fumante. Além disso, esse risco pode chegar a ser 17 vezes maior em tabagistas pesados (mais de 80 cigarros por dia).<sup>5,6</sup> A maconha também tem sido apontada como risco potencial no desenvolvimento de CCO, e esse dado também explicaria o aumento da incidência de CCO na população mais jovem.<sup>7</sup>

Concernente ao uso de bebida alcoólica, este tem sido apontado como o maior fator de risco para o desenvolvimento de cânceres do trato aéreo-digestivo. Um estudo francês, por exemplo, mostrou que etilistas pesados (>100g de álcool/dia)<sup>9</sup> têm 30 vezes mais chances de desenvolver CCO, e que quando associado ao tabagismo esse risco absoluto aumenta para 100 vezes. Esse sinergismo entre o tabaco e o álcool tem sido muito estudado em diversas neoplasias, pois se acredita que o álcool possa potencializar o efeito carcinogênico do tabaco pela solubilização de compostos carcinogênicos presentes no mesmo.<sup>8-10</sup>

Ademais, evidências recentes têm mostrado também uma associação entre o Papilomavírus humano (HPV 16 e 18) e o CCO.<sup>11</sup> Fatores dietéticos como, por exemplo, baixo consumo de frutas e vegetais também tem sido relatado como fator de risco para CCO.<sup>12</sup>

As neoplasias de cavidade oral, na maioria das vezes, são assintomáticas. Tendo isto em vista, é de extrema importância ter o conhecimento das lesões pré-neoplásicas da cavidade bucal, pois estas provavelmente serão o primeiro sinal de alerta para o desenvolvimento de CCO. A Leucoplasia é uma lesão pré-cancerosa, devido à irritação crônica da mucosa, e representa um indicativo essencial para se fazer o diagnóstico precoce de neoplasias de língua. Banoez J<sup>13</sup> acompanhou 670 pacientes com Leucoplasia durante trinta anos e trinta desses pacientes vieram a desenvolver carcinoma de língua.

Em relação à patogenia desse tipo de neoplasia, numerosos estudos do genoma dessas lesões demonstraram altas taxas de aneuploidias (50-70%) mostrando associação com mau prognóstico.<sup>14</sup> A transição de epitélio normal para hiperplasia e posteriormente displasia está associado à proliferação anormal das células, além da membrana basal, mostrando correlação com a expressão do gene Ki 67.<sup>15</sup> Mutações no gene p53 estão presentes em áreas pré-malignas, *Carcinomas in situ* e Displasia severa<sup>16</sup>. Além disso, o tabaco e o álcool estão associados à alta frequência de mutações no gene p53.<sup>17</sup>

Muitos estudos têm demonstrado uma associação entre a instabilidade genômica da mucosa oral (frequência de aneuploidias) e a transformação maligna.<sup>18</sup> A Cicloxigenase-2 e o fator de crescimento epidérmico são dois genes já relatados na literatura que tem um papel importante no desenvolvimento da instabilidade genômica.<sup>19</sup> Essa instabilidade genômica seria causada por mutações em genes que controlam a segregação cromossômica durante a mitose. Portanto, se esses genes não estão funcionando corretamente pode ocorrer um processo de instabilidade genômica com o aparecimento de aberrações cromossômicas.

Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico. O teste de micronúcleo permite identificar um aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste de micronúcleo como indicador de danos citogenéticos em células do epitélio de revestimento oral, brônquico e esofágico.<sup>20-22</sup> Um aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral é indicativo de elevação das taxas de mutação e está relacionada ao desenvolvimento de carcinomas de mucosa oral.<sup>22-24</sup>

## 1.2 O teste de micronúcleos e suas relações com o diagnóstico do câncer

O Teste de Micronúcleo baseia-se na identificação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula - formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MN). A análise de MN é usada como padrão de aberrações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes que interferem no processo de ligação do cromossomo às microfibras do fuso ou aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas. Desta forma, uma frequência elevada de micronúcleos é um dado essencial na identificação de grupos de populações - expostas a agentes aneugênicos e/ou clastogênicos - e, portanto com risco elevado de desenvolver câncer.<sup>25</sup> Há muitos relatos na literatura sobre o potencial do teste de micronúcleos no diagnóstico de neoplasias em geral. Entretanto, são poucos os estudos que relatam as propriedades do teste de micronúcleo como, por exemplo, sensibilidade, especificidade, acurácia e seus valores preditivos positivos e negativos. Além disso, a maior parte dos estudos, com um delineamento aceitável para avaliação de um teste diagnóstico, foi realizada com o teste de micronúcleos *in vitro*. Um exemplo deste tipo de estudo foi o estudo de caso e controle realizado na Itália que avaliou o teste de micronúcleos em cultura de linfócitos como biomarcador para câncer. O estudo italiano mostrou que os indivíduos que apresentaram uma frequência de micronúcleos maior ou igual a 2,5/1000 células apresentaram uma maior associação com o desenvolvimento de câncer (OR=10.7; 95% IC=4.6-24.9;  $p < 0.0001$ )<sup>26</sup>. El-Zein RA *et. al.*<sup>27</sup>, mostraram que o teste de micronúcleos em cultura de linfócitos pode ser uma boa ferramenta para rastreamento de câncer de pulmão entre fumantes com um valor preditivo positivo de 94,8% e preditivo negativo de 92,6%. Entretanto, como foi mencionado anteriormente, os estudos que relatam acurácia do teste de micronúcleos utilizam a metodologia com cultura de linfócitos (*in vitro*). Este fato prejudica uma maior generalização dos resultados para tipos específicos de neoplasias.

## 1.3 O teste de micronúcleos e suas relações com o diagnóstico do câncer de cavidade oral

O epitélio bucal está em constante contato com agentes ambientais (genotóxicos), portanto é um sítio alvo importante para substâncias tóxicas inaladas ou ingeridas. Alguns autores buscaram relacionar a ocorrência de micronúcleos com o risco para desenvolvimento ou recorrência de carcinomas da cavidade oral. Ramirez et al.<sup>29</sup> observaram um aumento na

freqüência de micronúcleos nas células bucais esfoliadas da mucosa adjacente a carcinomas de pacientes alcoolistas quando comparados aos da mucosa clinicamente normal do sítio contralateral. Bloching et al.<sup>29</sup> e Casartelli et al.<sup>30</sup> tiveram achados similares em raspados de carcinomas quando comparados a lesões pré-malignas e nessas quando comparadas à mucosa normal. Outros autores como, por exemplo, Saran (2008)<sup>31</sup>, Kamboj (2007)<sup>32</sup> e Suhas (2004)<sup>33</sup> também observaram uma relação entre o aumento da freqüência de micronúcleos e lesões malignas da cavidade oral. Contudo, nenhum dos estudos mencionados reportou a acurácia do teste de micronúcleos, quando pesquisado em células bucais.

A acurácia do teste foi bem descrita em um estudo transversal, realizado no Brasil, no qual os pesquisadores compararam a freqüência de micronúcleos, em células esfoliadas da cavidade bucal, entre pacientes com câncer de cavidade oral e pessoas saudias. O teste de micronúcleo apresentou uma sensibilidade de 27,2%, especificidade de 97% e valores preditivo positivo e negativo de 32,8% e 96,2% respectivamente. Entretanto, nem todos os indivíduos foram submetidos ao padrão ouro (biópsia). Além disso, não houve pareamento correto entre algumas variáveis que podem resultar em viés de confusão como, por exemplo, a variável sexo masculino que se encontrava distribuída desigualmente entre o grupo câncer e o controle (63% vs. 35%)<sup>34</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

A sobrevida dos pacientes com câncer de cavidade oral pouco progrediu nas últimas quatro décadas, mesmo com a grande evolução que tivemos nos tratamentos oncológicos. A curta sobrevida dessas neoplasias está estritamente ligado ao seu diagnóstico tardio.<sup>35</sup> O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, de baixo custo, não-invasivo, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, como o consumo de álcool e tabaco.<sup>36,37</sup> Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que o hábito de consumo crônico de álcool e tabaco não está só relacionado com o aumento das taxas de desenvolvimento de carcinomas orais, mas também com o aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral.<sup>38</sup>

Provavelmente, devido à falta de estudos que oferecessem um melhor embasamento do potencial do teste de micronúcleos em diferenciar lesões benignas e malignas da cavidade oral, Holland arquitetou o Projeto HUMN<sub>XL</sub>, que tem como principal objetivo buscar a padronização da metodologia da realização do teste de micronúcleos em células humanas da cavidade oral. Além disso, o projeto também tem como objetivo avaliar se a elevada taxa de micronúcleos, em células da cavidade oral, é um fator preditivo para o desenvolvimento de câncer<sup>39</sup>.

O Projeto HUMN<sub>XL</sub> pode ser uma evidência de que o teste de micronúcleos é uma tecnologia que ainda precisa ser mais bem desenvolvida.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a acurácia do teste de micronúcleos para o diagnóstico de lesões da cavidade oral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar a acurácia do teste de micronúcleos para o diagnóstico de câncer de cavidade oral e lesões pré-cancerosas (leucoplasia e eritroplasia);
- Avaliar a acurácia do teste de micronúcleos para diferenciar lesões malignas e benignas da cavidade oral;
- Verificar o ponto de corte para frequência de micronúcleos que apresente a melhor sensibilidade e especificidade para diagnóstico de lesões da cavidade oral utilizando a análise da curva ROC;
- Identificar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, taxa de falsos positivos e seus respectivos intervalos de confiança do teste de micronúcleos com base nos dados obtidos no presente estudo;
- Determinar a prevalência da infecção por Papiloma Vírus Humano (HPV), genótipos 6,11,16 e 18, nas lesões de cavidade oral.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 População

O presente estudo pretende investigar todos os pacientes que realizarão biópsia cirúrgica de lesão da cavidade oral no Serviço de Estomatologia de Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de novembro de 2009 a setembro de 2010.

### 4.2 Descrição da amostra

A amostra foi calculada tendo como base o estudo de Flahault *et. al*<sup>40</sup> para cálculos amostrais em estudos de teste diagnóstico. A amostra será composta de 41 casos (pacientes com câncer ou lesões precursoras) e 96 controles (biopsias negativas para câncer e lesões precursoras). O número de indivíduos no grupo casos foi calculada supondo uma sensibilidade de 90% e considerando que o limite inferior de um intervalo de confiança de 95% para a sensibilidade seja 70%. O número de indivíduos do grupo controle foi calculado pela fórmula:

$N \text{ controles} = N \text{ casos} [(1 - \text{prev}) / \text{prev}]$  considerando uma prevalência de 30%.

### 4.3 Critérios de inclusão

- Pacientes acima de 40 anos de idade;
- Pacientes que serão submetidos à biópsia cirúrgica da cavidade oral;
- Pacientes sem diagnóstico prévio de câncer ou lesão precursora da cavidade oral.

### 4.4 Critérios de exclusão

- Pacientes com história prévia de infecção viral e/ou bacteriana da cavidade oral;
- Pacientes com história prévia de irradiação na região de cabeça e pescoço;
- Pacientes com história prévia (menor que 30 dias) de uso de antibióticos.

## **5 PROCEDIMENTOS**

### **5.1 Coleta de dados**

Primeiramente, o paciente fará a sua consulta ambulatorial no Serviço de Estomatologia. Se o paciente apresentar alguma lesão da cavidade oral que tenha indicação de biópsia e, além disso, preencher os demais critérios de inclusão, o mesmo será convidado para participar do presente estudo.

Uma vez preenchidos todos os requisitos de entrada no estudo e com a concordância do paciente e do seu médico, o pesquisador realizará a abordagem inicial do paciente, de preferência com a participação de familiares ou representantes legais; nesta abordagem serão expostos detalhadamente o objetivo do estudo, informando ao paciente as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Será apresentado para leitura e eventuais esclarecimento o formulário do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A recusa da assinatura deste documento implicará na inelegibilidade para entrar no estudo.

Após a assinatura do TCLE os pesquisadores aplicarão um formulário (anexo 1) com perguntas objetivas e subjetivas sobre dados gerais, estilo de vida, história médica pregressa e história familiar. Em seguida se passará para a segunda parte da coleta de dados: a parte objetiva, será realizado o exame físico padronizado da cavidade oral (anexo 2) e será feita a raspagem da mucosa oral para pesquisa de micronúcleos conforme o protocolo do estudo (anexo 3). As coletas de células esfoliadas da mucosa bucal serão obtidas segundo os procedimentos específicos de manipulação, de acordo com as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsinki.

O resultado do histopatológico será observado posteriormente no prontuário do paciente ou na consulta de retorno. As lesões biopsiadas no Serviço de Estomatologia serão processadas e analisadas no Serviço de Patologia do HCPA.

### **5.2 Análise de Micronúcleos**

O Teste de Micronúcleo baseia-se na identificação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula - formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MN). A análise de MN é usada como padrão de aberrações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo,

portanto, utilizada na detecção de agentes que interferem no processo de ligação do cromossomo às microfibras do fuso ou aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas. Desta forma, uma frequência elevada de micronúcleos é um dado essencial na identificação de grupos de populações - expostas a agentes aneugênicos e/ou clastogênicos - e, portanto com risco elevado de desenvolver câncer.<sup>25</sup>

A coleta de células de descamação será realizada em dois sítios diferentes: (A) mucosa jugal de sítio anatômico oposto ao sítio da lesão primária a ser submetida à biopsia e (B) mucosa da área peri-lesional. As coletas serão realizadas com auxílio de uma escova Citobrush Plus (Kolplast Comercial Industrial LTDA, Brasil), previamente esterilizada em autoclave. Após a coleta a escova será agitada em 20 ml de solução tampão, colocada em tubos Falcon de 50 ml e centrifugada, duas vezes, a 1500 rpm, por 10 minutos - para obtenção de um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Tal procedimento tem também como intuito eliminar bactérias e células danificadas que dificultam a análise posterior das lâminas. A fixação e a colaração das lâminas serão realizadas de acordo com o protocolo de Thomas et al<sup>41</sup>.

Cada lâmina será identificada e devidamente registrada no livro de registros do laboratório. Serão analisadas 2000 células por lâmina, em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, visando a quantificação dos micronúcleos presentes nas células dos diferentes grupos que serão estudados. A avaliação das lâminas ocorrerá em teste cego, em que o observador não terá conhecimento dos grupos e dos sítios estudados. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleo serão: (i) presença de material nuclear; (ii) ter intensidade de luz maior ou igual a do núcleo; (iii) ter forma circular ou oval; (iv) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; (v) estar completamente separado do núcleo.

Tanto a confecção das lamínas quanto a análise serão realizadas na Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **5.3 Análise da presença de HPV (genótipos 6,11,16 e 18)**

Um tubo falcon contendo células da cavidade oral será colocado 0,5 ml de solução salina. O DNA total destas amostras será extraído a partir de 0,2 ml da ressuspensão pelo método de fenol-cloroformio<sup>42</sup>. O DNA do HPV será amplificado pela técnica de *nested PCR* (dupla amplificação aninhada) e posteriormente tipificado pela técnica de RFLP conforme descrito previamente<sup>43</sup>. A análise da presença de HPV será realizada pelo laboratório de

diagnóstico genético e molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) sem nenhum custo adicional para o presente projeto.

#### 5.4 Variáveis

Serão analisadas as variáveis: idade, raça, renda mensal, grau de instrução, doenças sistêmicas, medicações em uso, história familiar de câncer de cavidade oral, fumo, álcool, chimarrão, dieta, achados do exame físico de cabeça e pescoço, conduta médica, frequência de micronúcleos, diagnóstico clínico e histológico e estadiamento.

#### 5.5 Análise dos dados

Para registro e análise dos dados será utilizado o sistema SPSS versão 16.0. Os resultados serão expressos em estatística descritiva, e serão utilizados o teste exato de Fischer e o qui-quadrado. O teste de Kolmogorov-Smirnov será utilizado com a finalidade de verificação de normalidade. Os dados quantitativos que forem considerados normalmente distribuídos serão comparados através do teste t de Student, enquanto que para a comparação dos não normalmente distribuídos foi utilizado o teste U Mann-Whitney. Será construída uma tabela 2x2 para o cálculo das propriedades do teste de micronúcleos conforme o exemplo abaixo. Serão testados os seguintes pontos de corte para frequência de micronúcleos para posteriormente ser usados na montagem da curva ROC: 1%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% e 5%

	Biópsia positiva	Biópsia negativa	Total
FMN positiva	a	B	a+b
FMN negativa	c	D	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

FMN=frequência de micronúcleos

## **5.6 Aspectos éticos**

Todos os pacientes que preencham os critérios de inclusão serão convidados a participar e se aceitarem entrar no estudo, deverão assinar o termo de Consentimento Livre e Esclarecido preparado e aprovado para tais fins.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 1990;66:1288-1296.
2. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-418.
3. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268-274.
4. Silverman S Jr. Epidemiology. In: Silverman S Jr ed. *Oral Cancer*. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc;1998;1-6.
5. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72:1369-1375.
6. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:459-462.
7. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, et al. Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1071-1078.
8. Andre K, Schraub S, Mercier M, et al. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995;31B:301-309.
9. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282-3287.
10. Lewin F, Norell SE, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998;82:1367-1375.
11. Sugarman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: Evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997;3:130-147.
12. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 1995;61:437S-445S.
13. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Am Dent Assoc*. 1978, Apr;96(4):615-20.

14. Ensley JF, Maciorowski Z, Pietraszkiewicz H, et al. Clinical applications of cellular DNA content parameters determined by flow cytometry in squamous cell cancers of the head and neck. In *Adjuvant Therapy of Cancer VI*. Edited by SE Jones and SE Salmon. Orlando, FL: Grune and Stratton, 1990, pp 101-108.
15. Coltrera MD, Zarbo RJ, Gown AM, et al. Comparison of two putative markers of premalignant change in the oral cavity: suprabasal expression of CK-19 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). In *Proceedings of the Third International Head and Neck Oncology Research Conference*, Las Vegas, 1990
16. J.O. Boyle, J. Hakin, and W. Koch, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993. 53: 4477.
17. J.A. Brennan, J.O. Boyle, and W.M. Koch, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995. 332
18. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:82-88.
19. Jon Sudbø. Novel Management of Oral Cancer: A Paradigm of Predictive Oncology. *Clinical Medicine & Research*. Volume 2, Number 4: 233-242
20. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer* 1982; 30:553-9.
21. Ramirez A, Gattás GJF, Carvalho MB, Saldanha PH. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 6:199-204.
22. Lippman SM, Peters E J, Wargovich M J. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int J Cancer* 1990; 45:811-5.
23. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983; 31:305-8.
24. Stich HF, Rosin MP, Vallejera MO. Reduction with vitamin A and betacarotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet* 1984; 1:1204-6.
25. Roth, D.M., Zechlinski, G., Martino-Roth, M. Avaliação da genotoxicidade em cirurgiões-dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, v 10, p. 209-214, 2002.
26. Murgia E, Ballardín M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res*. 2008 Mar 1;639(1-2):27- Epub 2007 Nov 13

27. El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 May;17(5):1111-9
28. Ramirez, A.; Saldanha, P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. *Genet. Mol. Res., Ribeirão Preto*, v. 1, no. 3, p. 246-260, Sept. 2002
29. Bloching, M. et al. Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa to Predict the Relative Risk of Cancer in the Upper Aerodigestive Tract Using the MN-assay. *Oral Oncol., Oxford*, v. 36, no. 6, p. 550-555, Nov. 2000.
30. CasaeteliI, G. et al. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. *Anal. Quant.Cytol. Histol., St. Louis*, v. 22, no. 6, p. 486-492, Dec. 2000.
31. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):354-60. Epub 2007 Oct 23
32. Kamboj M, Mahajan S. Micronucleus--an upcoming marker of genotoxic damage. *Clin Oral Investig.* 2007 Jun;11(2):121-6. Epub 2006 Oct 10
33. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. : *Mutat Res.* 2004 Jul 11;561(1-2):15-21
34. Skeff, M. A. Danos genéticos em células esfoliadas de mucosa bucal de pacientes fumantes portadores de carcinoma: micronúcleos e outras anomalias nucleares.. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2005, Natal. *Genetics and Molecular Biology. São Paulo*, 2005. v. 28. p. 188-188.
35. Swango PA. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. *J Public Health Dent* 1996;56:309-18.
36. Charabi B, Topping H, Kirkegaard J, Hansen HS. Oral cancer- results of treatment in the Copenhagen University Hospital. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000; 543:246-7.
37. Luce D, Guenel P, Leclerc A, Brugere J, Roent D, Rodriguez J. et al. Alcohol and tobacco consumption in câncer of the mouth, pharynx, and larynx: a study of 316 females patients. *Laryngoscope* 1998; 98:313-6.
38. Pickwell SM, Schimelpfening S, Palinkas LA. Betel quid chewing by Cambodian women in the United States and its potential health effects. *West J Med* 1994; 160:326-30.
39. Nina Holland, Claudia Bolognesi, Micheline Kirsch-Volders, Stefano Bonassi, Errol Zeiger, Siegfried Knasmueller, Michael Fenech. The micronucleus assay in human

- buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* (2008), doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007
40. Antoine Flahault, Michel Cadilhac, Guy Thomas. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *Journal of Clinical Epidemiology* 58 (2005) 859–862.
  41. Philip Thomas, Nina Holland, Claudia Bolognesi, Micheline Kirsch- Volders, Stefano Bonassi, Errol Zeiger, Siegfried Knasmueller e Michael Fenech. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol 4 No 6, 2009.
  42. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 2.ed. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory, 1999.
  43. Bernard, H.U., Chan, S.Y., Manos, M.M., Ong, C.K., Villa, L.L., Delius, H., Peyton, C.L., Bauer, H.M., Wheeler, C.M. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J. Infect. Dis.*, vol. 170, p. 1077-1085, 1994



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 09-426

**Versão do Projeto:** 24/11/2009

**Versão do TCLE:** 07/12/2009

**Pesquisadores:**

MARY CLARISSA BOZZETTI

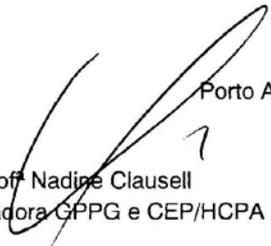
RAFAEL JOSE VARGAS ALVES

MARIA CRISTINA MUNERATO

**Título:** DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE MICRONÚCLEOS PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA CAVIDADE ORAL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 07 de dezembro de 2009.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA