

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TAINARA RIEGER MILNIKEL

ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA DE CÉLULAS EPITELIAIS EXFOLIADAS DA  
MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM  
LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL

Porto Alegre

2017

TAINARA RIEGER MILNIKEL

ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA DE CÉLULAS EPITELIAIS EXFOLIADAS DA  
MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM  
LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Odontologia da Faculdade de  
Odontologia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito parcial para  
obtenção do título de Cirurgiã-  
Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Milnikel, Tainara Rieger

Análise citomorfométrica de células epiteliais exfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasias e com câncer bucal. / Tainara Rieger Milnikel. -- 2017.  
32 f.

Orientador: Fernanda Visioli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Câncer bucal. 2. Citologia exfoliativa. 3. Citomorfometria. 4. Leucoplasia. 5. Neoplasia maligna. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

## RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais prevalente no mundo. Dos diagnósticos de câncer bucal, 95% são carcinoma espinocelular, que é uma neoplasia com taxa de sobrevida de 50% em 5 anos, sendo considerada um problema de saúde pública. O álcool e o fumo são considerados fatores etiológicos para o carcinoma espinocelular e, quando associados, aumentam em cerca de cinquenta vezes o risco de desenvolvimento da doença em comparação a indivíduos não expostos a eles. Muitas vezes, previamente ao desenvolvimento do câncer bucal, pode surgir uma lesão potencialmente maligna como a leucoplasia. Durante a carcinogênese, uma das principais alterações celulares que ocorrem é o aumento da relação núcleo/citoplasma. Essas alterações podem ser observadas através da citologia exfoliativa, que é um método não-invasivo e de baixo custo utilizado para análise das células da mucosa. O objetivo desse trabalho foi avaliar a relação núcleo/citoplasma de células exfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos aos fatores de risco do câncer bucal, indivíduos portadores de leucoplasia e indivíduos portadores de câncer bucal, comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco para verificar a possibilidade de uso da citologia exfoliativa como um método de rastreamento de indivíduos com maior risco de desenvolvimento ao câncer bucal e, assim, adoção de medidas preventivas ou utilização de recursos quimiopreventivos, aumentando a taxa de sobrevida desses pacientes. A amostra foi composta de 89 indivíduos divididos em quatro grupos: controle, exposto aos fatores de risco - fumo e álcool -, leucoplasia e carcinoma espinocelular. Foram identificadas cinquenta células distendidas e não sobrepostas em cada lâmina histológica. Foi calculada a razão entre as áreas do núcleo e do citoplasma de cada célula. A relação núcleo/citoplasma foi comparada entre os grupos, além de ser correlacionada com os valores de packyears e comparada com a presença ou ausência de displasia epitelial nas lesões de leucoplasias. A relação núcleo/citoplasma do grupo carcinoma apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Foi observada correlação positiva, porém não estatisticamente significativa entre a relação núcleo/citoplasma e a exposição dos indivíduos ao fumo ao longo da vida. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as leucoplasias displásicas e leucoplasias não displásicas. Concluímos que a relação núcleo/citoplasma dos pacientes expostos aos fatores de risco e com leucoplasias não é diferente da relação núcleo/citoplasma dos pacientes controle e, portanto, a análise citomorfométrica das células exfoliadas da mucosa bucal não é indicada como um mecanismo de prevenção e rastreamento de indivíduos com maior risco de desenvolvimento do câncer bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal. Leucoplasia. Citologia exfoliativa. Citomorfometria.

## ABSTRACT

The head and neck cancer is the sixth neoplasm more prevalent in the world. 95% of oral cancer are diagnosed as squamous cell carcinoma, which is a neoplasm with survival rate of 50% in five years. The alcohol and the tobacco are considered etiological factors for squamous cell carcinoma and, together, increase the risk of development of oral cancer. Many times, a potentially malignant lesion can arise before the development of oral cancer. The increased of nucleus/cytoplasm ratio is one of the main changes that occur during carcinogenesis. These changes can be observed through exfoliative cytology. The exfoliative cytology is a non-invasive and low-cost method used for analysis of mucosal cells. The objective of this study was to evaluate the nucleus/cytoplasm ratio of exfoliated cells of the oral mucosa of individuals without lesion and not exposed to risk factors, individuals exposed to oral cancer risk factors, individuals with leukoplakia and individuals with oral cancer to verify the possibility of using exfoliative cytology as a method of screening individuals at higher risk of developing oral cancer, and, therefore, adopting preventive measures or using chemopreventive resources to increase the survival rate of patients. The sample consisted of 89 individuals divided into four groups: control, exposed to risk factors - tobacco and alcohol -, leukoplakia and squamous cell carcinoma. Fifty distended and non-overlapping cells were identified on each histological slide. The ratio between the areas of the nucleus and the cytoplasm was calculated. The nucleus/cytoplasm ratio was compared among groups and correlated with packyears values. The nucleus/cytoplasm was compared with the presence or absence of epithelial dysplasia in leukoplakia lesions. The nucleus/cytoplasm ratio of the carcinoma group showed a statistically significant increase in relation to the other groups. The nucleus/cytoplasm ratio and packyears showed a positive correlation, but not statistically significant. No statistically significant difference was observed between dysplastic leukoplakia and non-dysplastic leukoplakia. We conclude that the nucleus/cytoplasm ratio of the patients exposed to the risk factors and with leukoplakia is not different from the nucleus/cytoplasm ratio of the control patients. Therefore, the cytomorphometric analysis of exfoliated cells of the oral mucosa is not indicated to be used as a mechanism of prevention and screening of individuals at higher risk of developing oral cancer.

Keywords: Oral cancer. Leukoplakia. Exfoliative cytology. Cytomorphometry.

## SUMÁRIO

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>5</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>11</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO A – TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....</b>	<b>31</b>

## 1 NTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Os tumores da cavidade bucal e de faringe, quando analisados em conjunto, ocupam a sexta posição entre as neoplasias malignas mais prevalentes na população mundial (DIONE et al., 2014; PARKIN et al., 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (2016), estimam-se 11.140 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.350 em mulheres, para o Brasil, no ano de 2016, sendo o quinto tipo de câncer mais comum em homens brasileiros. Esses valores correspondem a um risco estimado de 11 casos novos a cada 100 mil homens e 4 casos novos a cada 100 mil mulheres.

O carcinoma espinocelular representa 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal e, por isso, é usado muitas vezes como sinônimo para o termo câncer bucal. Apesar dos inúmeros esforços realizados no sentido de prevenir, diagnosticar precocemente e buscar novos protocolos de tratamento, o prognóstico desta doença pouco tem se modificado nas últimas décadas (NEVILLE; DAY, 2002), sendo mantidas taxas de sobrevida em torno de 50% em 5 anos (ANTUNES et al., 2001; BIAZEVIC et al., 2006). Em função disso, o câncer de boca pode ser considerado um problema de saúde pública, requerendo a implementação de estratégias de combate mais eficazes.

A etiologia do câncer bucal é multifatorial. Os fatores etiológicos associados a essa patogenia podem ser intrínsecos - condições sistêmicas e hereditariedade - ou extrínsecos - exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta (no caso específico do câncer de lábio inferior) (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011). Diversos estudos mostram que o câncer bucal surge como resultado do acúmulo de eventos mutagênicos, decorrentes principalmente do efeito do tabaco e do álcool (LA VECCHIA et al., 1997).

Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que atuaria como um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular. Ainda que a exposição ao fumo associada ao álcool tenha mostrado efeito multiplicador, o papel do álcool como agente isolado não é tão claro

(OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999). O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Além disso, o álcool é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (CARRARD et al., 2008).

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

O dano genético pode causar o comprometimento de diversos processos regulatórios celulares, resultando em aumento da proliferação, inibição de processos apoptóticos e potencial para a invasão de tecidos adjacentes (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna. Uma lesão potencialmente maligna consiste em um tecido alterado onde o câncer ocorre mais frequentemente em comparação a sua contraparte normal (MAO, 1997; REIBEL, 2003).

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5% (BANÓCZY; RIGÓ, 1991; SCHEPMAN et al., 1996; DELILBASI et al., 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003; JAHANBANI, 2003). Segundo Carrard e colaboradores (2010), a prevalência de leucoplasias na população da região metropolitana de Porto Alegre é de 1,01%. A leucoplasia se apresenta como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como



qualquer outra patologia (BIAZEVIC et al., 2005). Para o diagnóstico da leucoplasias, é indicada a realização de biópsia e exame histopatológico, onde é possível observar as alterações epiteliais que esse tipo de lesão pode apresentar. (KRAMER et al., 1978; MUTALIK, 2014).

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

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

A hiperplasia epitelial caracteriza-se pelo aumento do número de células do tecido com manutenção do seu padrão morfofuncional. A hiperkeratose é o espessamento anormal da camada de ceratina que pode ser constituída de paraceratina ou ortoceratina. Na paraceratina as células superficiais achatadas retêm os núcleos e boa parte das organelas, enquanto que na ortoceratina essas células perdem suas organelas e seu citoplasma é ocupado por grande quantidade de filamentos de citoqueratina. A acantose é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, apresentando como principais características o alongamento das papilas epiteliais e a união entre o tecido conjuntivo e epitelial em linha reta (IARC, 2005).

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

- Aumento do número de figuras de mitoses (algumas atípicas);
- Presença de mitoses na metade superficial do epitélio;

- Aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- Nucléolos volumosos;
- Duplicação da camada basal;
- Estratificação epitelial irregular;
- Ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa;
- Papilas epiteliais em forma de gota;
- Perda da polaridade das células da camada basal;
- Perda de aderência intercelular;
- Hiperchromatismo nuclear;
- Pleomorfismo celular.

Estima-se que a taxa anual de transformação maligna de leucoplasias seja de 1% (VAN DER WAAL, 2009). Apesar do enorme progresso no campo da biologia celular e molecular, não há um marcador ou um conjunto de marcadores que permitam de forma confiável prever a transformação maligna de um leucoplasia. A identificação de indivíduos e lesões com maior risco de desenvolvimento para o câncer bucal tem fundamental importância para a adoção de medidas eficazes que favoreçam o diagnóstico precoce dessa neoplasia, aumentando as taxas de sobrevivência destes pacientes (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011). Além de possibilitar a utilização de medidas preventivas, como o abandono do uso de substâncias carcinogênicas e outros recursos quimiopreventivos.

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

Para o estudo da mucosa clinicamente normal a citopatologia é indicada por ser não-invasiva. A citopatologia é um método de análise de células exfoliadas que tem seu emprego mais conhecido no controle do câncer ginecológico. Para o diagnóstico

do câncer bucal, a citopatologia mostrou um baixo índice de acurácia em função dos altos índices de exames falso-positivos e falso-negativos, sendo então abandonada como método de diagnóstico (BANOCZY, 1976). Recentemente, surgiram estudos utilizando a citopatologia em boca como um recurso de rastreamento de indivíduos em maior risco para câncer bucal (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007).

A fim de aumentar a acurácia deste exame na detecção de alterações celulares precoces, são utilizadas técnicas quantitativas, como por exemplo, a análise citomorfométrica das células (OGDEN; COWPE; GREEN, 1990). Nesse tipo de análise é realizada a quantificação da relação núcleo/citoplasma das células encontradas no raspado citológico. Uma das principais alterações celulares durante a carcinogênese é o aumento da relação núcleo/citoplasma. No entanto, essas alterações celulares ocorrem muito antes dos primeiros sinais clínicos. Através da análise citomorfométrica é possível realizar medições de parâmetros como área e diâmetro de núcleo e citoplasma e relação núcleo/citoplasma (KHOT et al., 2015).

Nivia e colaboradores (2015) compararam a relação núcleo/citoplasma de indivíduos não fumantes, fumantes sem lesões orais, fumantes com leucoplasia e fumantes com carcinoma espinocelular e observaram um aumento significativo no valor desse parâmetro nos grupos dos fumantes, sem lesão e com lesão. Khot e colaboradores (2015) também observaram um aumento na relação núcleo/citoplasma em fumantes quando comparados a indivíduos não fumantes. Os diâmetros de núcleo e citoplasma também variaram entre fumantes e não fumantes: fumantes apresentaram um aumento significativo no diâmetro nuclear e uma diminuição significativa no diâmetro citoplasmático (NADAF et al., 2014)

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

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Análise citomorfométrica de células epiteliais exfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasias e com câncer bucal**

#### **RESUMO**

**Introdução:** O câncer bucal é um problema de saúde pública. A busca por mecanismos que favoreçam o diagnóstico precoce da doença ou detectem alterações iniciais ou prévias ao surgimento de lesões é indispensável para uma melhora nas taxas de morbidade e mortalidade do câncer bucal. A citologia exfoliativa é um método de análise de alterações celulares. O objetivo do trabalho foi analisar a relação núcleo/citoplasma de indivíduos expostos aos fatores de risco e com leucoplasias em comparação a indivíduos controle e com câncer de boca.

**Metodologia:** Um total de 89 pacientes foi incluído no estudo. A amostra foi dividida em quatro grupos: controle, expostos aos fatores de risco, com leucoplasias e com carcinoma espinocelular. Foi realizada a coleta citopatológica da mucosa bucal dos pacientes. Foram identificadas 50 células em cada lâmina, das quais foi calculada a relação núcleo/citoplasma. Foi comparada a relação núcleo/citoplasma entre os grupos. A relação núcleo/citoplasma foi correlacionada com o grau de exposição ao fumo. Foi também comparada a relação núcleo/citoplasma entre as lesões de leucoplasias displásicas e não displásicas.

**Resultados:** Há um aumento significativo da relação núcleo/citoplasma dos pacientes com câncer bucal quando comparados aos demais grupos. Há correlação positiva, porém não significativa, entre a relação núcleo/citoplasma e o packyear. Não há diferença significativa entre lesões de leucoplasias displásicas e não displásicas.

**Conclusões:** Há um aumento da relação núcleo/citoplasma nos esfregaços citológicos dos pacientes com carcinoma espinocelular em relação aos demais pacientes e, portanto, a citomorfometria não poderia ser indicada para rastreamento de pacientes e lesões com maior risco de desenvolvimento do câncer bucal.

**Palavras-chaves:** Câncer bucal. Carcinoma espinocelular. Leucoplasia. Citologia exfoliativa. Citomorfometria.

## INTRODUÇÃO

Os tumores de cabeça e pescoço são a sexta neoplasia maligna mais prevalente na população mundial (DIONE et al., 2014; PARKIN et al., 2005). O carcinoma espinocelular representa 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal e apresenta uma taxa de sobrevida de 50% em 5 anos, o que o torna um problema de saúde pública (ANTUNES et al., 2001; BIAZEVIC et al., 2006; NEVILLE; DAY, 2002). No Brasil, no ano de 2016, 15.490 casos novos de câncer bucal foram diagnosticados, sendo 71,9% desses casos pacientes do gênero masculino (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Para a ocorrência do câncer bucal é necessário um acúmulo de eventos mutagênicos e estes possuem etiologia multifatorial. Os fatores etiológicos podem ser intrínsecos, como condições sistêmicas e hereditariedade, ou extrínsecos, como exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta (LA VECCHIA et al., 1997; TANAKA, ISHIGAMORI, 2011). O fumo é capaz de provocar mutações nos genes reguladores da proliferação e morte celular. Já o álcool, na carcinogênese, é responsável por um aumento na proliferação epitelial bem como pela modificação do seu processo de maturação, redução da capacidade de reparo de DNA e distúrbios do sistema imune e do estado nutricional. Além disso, em determinadas concentrações, aumenta a permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Portanto, fumo e álcool, quando associados, aumentam em cerca de 50 vezes o risco de desenvolvimento de câncer bucal em comparação a indivíduos que nunca fumaram ou beberam (CARRARD et al., 2008; CASTELLSAGUE et al., 2004; OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular. Muitas vezes, previamente ao desenvolvimento do câncer bucal, pode surgir uma lesão potencialmente maligna, que consiste em um tecido alterado onde o câncer ocorre mais frequentemente em comparação a sua contraparte normal (MAO, 1997; REIBEL, 2003). A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais frequente e possui prevalência estimada entre 0,42 e 5%

(BANÓCZY; RIGÓ, 1991; SCHEPMAN et al., 1996; DELILBASI et al., 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003; JAHANBANI, 2003). Apresenta-se como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra patologia (BIAZEVIC et al., 2005). Para o diagnóstico dessa lesão, é necessária a realização de uma biópsia e exame histopatológico, onde é possível observar as diversas alterações epiteliais que a leucoplasias pode apresentar. (KRAMER et al., 1978; MUTALIK, 2014). A taxa de transformação maligna da leucoplasia é estimada em 1% (VAN DER WAAL, 2009).

A citopatologia é um método não-invasivo que permite analisar as células exfoliadas da mucosa. Embora mostre um baixo índice de acurácia para o diagnóstico do câncer bucal, pode ser utilizada para o estudo da mucosa clinicamente normal para rastreamento de indivíduos e lesões com maior risco ao desenvolvimento do câncer bucal. O aumento da relação núcleo/citoplasma é uma das principais alterações celulares durante a carcinogênese, ocorrendo em um estágio onde ainda não há sinais clínicos (KHOT et al., 2015). Sendo assim, a fim de aumentar a acurácia da citopatologia na detecção de alterações celulares precoces, pode ser utilizada a análise citomorfométrica das células, que consiste em uma análise quantitativa da relação núcleo/citoplasma das células encontradas no raspado citológico (OGDEN; COWPE; GREEN, 1990). A análise da alteração de proporção celular fornece dados mais consistentes sobre a maturação celular do que tamanho de núcleo e citoplasma isolados (NADAF et al., 2014). Portanto, esse método pode ser utilizado como um recurso de monitoramento para a observação de alterações iniciais ou prévias ao aparecimento de lesões potencialmente malignas ou câncer bucal em indivíduos expostos aos fatores de risco. Ao observar modificações celulares iniciais, torna-se possível a adoção de medidas eficazes que favoreçam o diagnóstico precoce das neoplasias e a utilização de medidas preventivas como cessação do uso de carcinógenos e recursos quimiopreventivos, aumentando as taxas de sobrevivência dos pacientes (BANOCZY, 1976; PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007; TANAKA, ISHIGAMORI, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação núcleo/citoplasma da mucosa bucal de indivíduos expostos aos fatores de risco - fumo e álcool -, indivíduos portadores de leucoplasias e indivíduos portadores de câncer bucal comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco.

## **METODOLOGIA**

### **Amostra**

Nesse estudo transversal observacional, a amostra foi composta por indivíduos com idade superior a 30 anos, ausência de lesão bucal clinicamente visível, com exceção do carcinoma espinocelular e da leucoplasias. Os indivíduos foram selecionados no ambulatório clínico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra foi dividida em quatro grupos:

Grupo Controle (1) foi constituído por pacientes que não apresentavam lesões potencialmente malignas nem câncer bucal, e que não eram expostos aos fatores de risco para o câncer bucal.

Grupo Álcool e Fumo (2) foi constituído por pacientes que não apresentavam lesões potencialmente malignas nem câncer bucal, mas eram expostos aos fatores de risco para essas lesões. Pacientes que fumavam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos associado ou não ao consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica foi caracterizado pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia, por no mínimo um ano. Foi considerada uma dose de álcool 340ml de cerveja, 113ml de vinho ou 28ml de destilados, que possuem aproximadamente a mesma quantidade de álcool (TEZAL et al., 2001).

Grupo Leucoplasia (3) foi constituído por pacientes que apresentavam clinicamente lesões de leucoplasias confirmadas após biópsia e diagnóstico histopatológico.

Grupo Carcinoma Espinocelular (4) foi constituído por pacientes que apresentavam clinicamente carcinoma espinocelular bucal confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico.

O grau de exposição do indivíduo ao tabaco ao longo da vida foi calculado através do cálculo de packyear, onde é levado em consideração a quantidade de tabaco e o tempo de exposição a este. O consumo de 20 cigarros ao dia durante um ano caracteriza um packyear (SMOKING PACK YEAR, 2017).

### **Coleta Citopatológica**

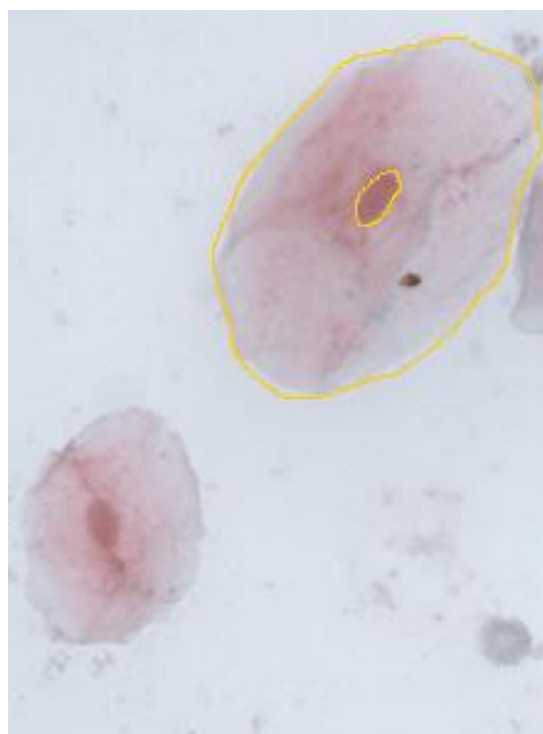
Os pacientes do Grupo Controle e do Grupo Álcool-Fumo foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal para realização de exame citológico no sítio borda de língua, que é um dos sítios mais comumente afetados pelo câncer de boca. Os pacientes dos Grupos Leucoplasia e Carcinoma espinocelular foram submetidos à realização de exame citológico da região onde está localizada a leucoplasia ou o carcinoma espinocelular. Previamente à realização dos raspados, todos os pacientes foram orientados a retirar suas próteses removíveis (se existentes) e a bochechar água filtrada durante 1 minuto. As células coletadas são transferidas para lâmina de vidro e é realizado o processamento conforme Anexo I.

### **Análise Citomorfométrica**

A análise citomorfométrica dos esfregaços foi realizada pela captura de imagem das primeiras 50 células epiteliais distendidas e não sobrepostas das lâminas histológicas com o auxílio do microscópio binocular em aumento de 400x acoplado a um software de captura de imagens (CellSens, Olympus). Foi traçado o contorno do núcleo e da célula usando o software ImageJ (National Institutes of Health), que fornece a área dessas medidas em unidade de  $\mu\text{m}$ . O contorno está ilustrado na Figura 1. A partir dos dados coletados, foi obtida a relação núcleo/citoplasma das células capturadas. Para cada indivíduo, foi calculada a média da relação núcleo/citoplasma das 50 células avaliadas



**Figura 1.** Contorno de núcleo e citoplasma no software ImageJ.



### **Análise Estatística**

Os dados do presente estudo foram computados no Programa de Computador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para a realização análise estatística. Foi testada a normalidade da distribuição dos dados obtidos nos diferentes desfechos e foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste post-hoc Tukey. A significância estatística foi definida em 0.05.

### **Considerações Éticas**

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia e Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e cadastrado na Plataforma Brasil. Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## RESULTADOS

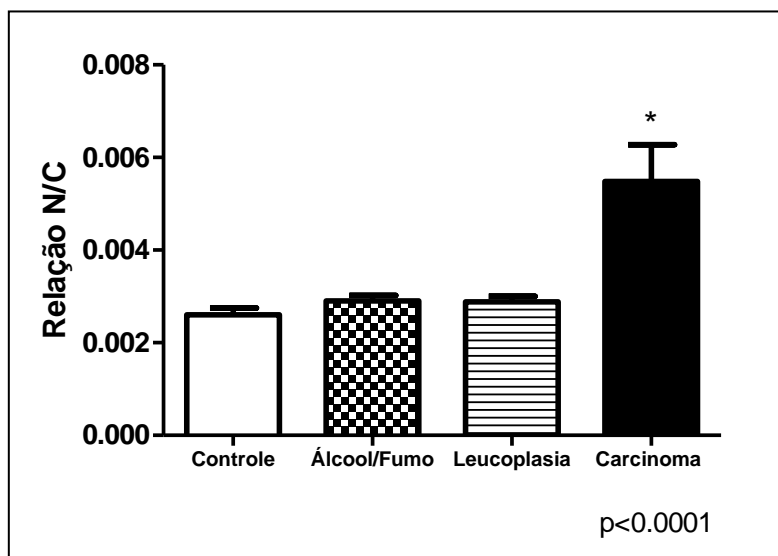
Um total de 89 pacientes foi incluído nesse estudo. Os dados demográficos e de hábitos dos pacientes estão descritos na Tabela 1. Os Grupos Controle e Álcool-Fumo foram compostos exclusivamente por indivíduos do gênero masculino e o Grupo Carcinoma apresentou predominância do mesmo (83%). A média de idade dos grupos variou entre 47 e 62 anos de idade. O número de fumantes foi maior no Grupo Álcool-Fumo (70,8%), enquanto o número de ex-fumantes foi maior no Grupo Carcinoma (52%). Esse padrão se repetiu no que se refere ao consumo de bebidas alcoólicas: o Grupo Álcool-Fumo apresentou o maior número de consumidores (79,2%) e o Grupo Carcinoma apresentou o maior número de ex-consumidores (32%). Todos os grupos apresentaram consumo de chimarrão positivo em 50% ou mais da amostra. Foi observado maior valor de packyear no Grupo Carcinoma (49,80). Língua e rebordo alveolar foram os sítios mais acometidos no Grupo Leucoplasia, enquanto assoalho bucal foi o sítio mais acometido no Grupo Carcinoma.

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

	<b>Grupo controle (n=15)</b>	<b>Grupo Álcool- Fumo (n=24)</b>	<b>Grupo Leucoplasia (n=27)</b>	<b>Grupo Carcinoma (n=23)</b>
<b>IDADE (média + DP)</b>	54,06 (±17,29)	47,83 (±11,95)	59,76 (±11,79)	62,39 (±9,72)
<b>GÊNERO</b>	100% Masculino	100% Masculino	43% Masculino	83% Masculino
<b>FREQUÊNCIA DE FUMANTES</b>		70,8% 16,6% Ex-fumantes	61,5% 15,4 % Ex-fumantes	34,8% 52% Ex-fumantes
<b>PACKYEARS (média + DP)</b>		25,43 (±13,8)	30,52 (±19,81)	49,48 (±52,59)
<b>CONSUMO DE CHIMARRÃO</b>	73,3%	54,1%	61,5%	50%
<b>CONSUMO DE BEBIDAS ALCÓOLICAS</b>		79,2% 12,5% Ex-consumidor	52% 4% Ex-consumidor	40,9% 32% Ex-consumidor
<b>LOCALIZAÇÃO DA LESÃO</b>			Língua -----26,9% Palato-----23,0% Lábio-----7,7% Assoalho-----11,5% Rebordo-----26,9% M. Jugal-----3,8%	Língua ----- 16,6% Assoalho -58,3% Rebordo----16,6% M. Labial-----8,3%

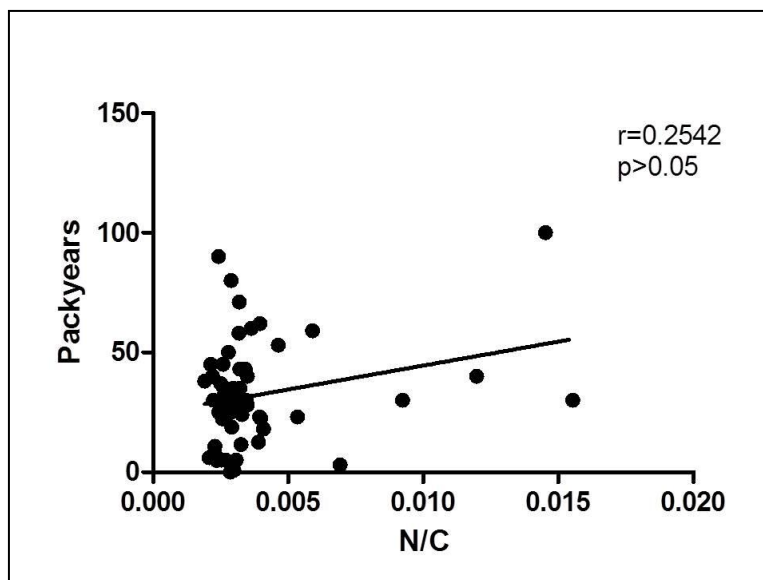
Os dados de comparação da relação núcleo/citoplasma entre os Grupos Controle, Álcool-Fumo, Leucoplasia e Carcinoma estão ilustrados no gráfico da Figura 2. A relação núcleo/citoplasma foi maior no Grupo Carcinoma ( $p < 0.0001$ ). Os Grupos Controle, Álcool-Fumo e Leucoplasias apresentaram diferença entre si, porém a diferença observada não foi estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

**Figura 2.** Comparação da relação núcleo/citoplasma entre os Grupos Controle, Álcool-Fumo, Leucoplasia e Carcinoma.



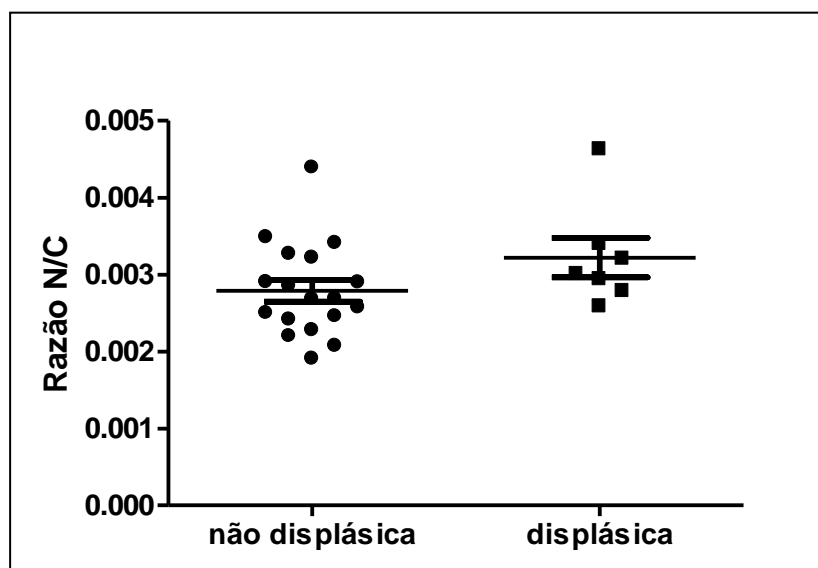
As variáveis relação núcleo/citoplasma e packyears foram correlacionadas entre si através do teste Pearson. A correlação está ilustrada no gráfico da Figura 3. Foi observada uma correlação positiva ( $r=0.2542$ ), porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ).

**Figura 3.** Correlação entre packyears e relação núcleo/citoplasma.



As variáveis relação núcleo/citoplasma e presença de displasia epitelial nas lesões de leucoplasia foram analisadas entre si através do teste *t*. A análise está ilustrada no gráfico da Figura 4. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos ( $p > 0.05$ ).

**Figura 4.** Análise entre presença de displasia em leucoplasia e relação núcleo/citoplasma.



## DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais prevalente na população mundial (DIONE et al., 2014; PARKIN et al., 2005). Devido à alta morbidade e mortalidade que essa neoplasia causa, o diagnóstico e o tratamento precoce são essenciais para reduzir esses índices e melhorar o prognóstico do paciente (SHARMA et al., 2015). A citologia esfoliativa, que é um exame simples, de baixo custo e não invasivo, pode ser uma alternativa para o rastreamento de indivíduos e lesões com maior risco ao desenvolvimento do câncer bucal (BANOCZY, 1976; PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007). No entanto, observou-se que alterações morfológicas como o aumento da relação núcleo/citoplasma só são visíveis através da citologia depois de estabelecido o câncer.

É importante entender que a relação núcleo/citoplasma é uma característica de maturidade celular. Conforme a célula amadurece, o tamanho do núcleo diminui e o tamanho do citoplasma aumenta. Na carcinogênese, ocorre um aumento da relação núcleo/citoplasma devido a maior taxa de crescimento e, conseqüentemente, menor diferenciação celular. Sendo assim, essa alteração de proporção fornece dados mais consistentes sobre a maturação celular do que tamanho de núcleo e citoplasma isolados (NADAF et al., 2014).

Cowpe, Longmore e Green (1985) observaram que alterações celulares de malignidade poderiam ser identificadas através da citologia exfoliativa. De fato, no nosso estudo, assim como nos estudos de Khot et al. (2015), Sharma et al. (2015) e Nivia et al. (2015), foi observado um aumento na relação núcleo/citoplasma do Grupo Carcinoma em relação ao Grupo Controle e Grupo Álcool-Fumo.

No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e os Grupos Álcool-Fumo e Leucoplasia. Esses resultados vão de encontro aos resultados observados nos estudos de Nivia et al. (2015), onde foi observada diferença estatisticamente significativa entre os Grupos Controle, Álcool-Fumo, e Leucoplasia. Porém, é importante salientar que, no presente estudo, foi analisada a relação núcleo/citoplasma, onde foi calculada a razão entre a área total do núcleo e a área total da célula. No estudo de Nivia et al. (2015), a área do citoplasma foi calculada subtraindo a área do núcleo da área total da célula. A partir desse valor obtido, foi calculada a razão entre a área do núcleo e área do citoplasma. Essa diferença no cálculo da relação núcleo/citoplasma poderia influenciar nos resultados, explicando a diferença nos achados.

Há diversos estudos com desenhos semelhantes na literatura, porém muitos apresentam achados controversos. Nivia et al. (2015) e Khot et al. (2015) observaram resultados contraditórios aos do presente estudo: observaram diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Álcool-Fumo. Ambos coletaram amostras da mucosa jugal dos pacientes. Sharma et al. (2015), por sua vez, não especificou o sítio de coleta dos grupos. No entanto, apresentou achados semelhantes aos do nosso estudo: observou diferença estatisticamente significativa apenas entre o Grupo Carcinoma e os Grupos Controle e Álcool-Fumo. O sítio de

coleta parece ser uma variável importante, visto que Cowpe, Longmore e Green (1985) observaram diferença significativa na relação núcleo/citoplasma entre células exfoliadas da mucosa jugal e células exfoliadas do assoalho bucal, lábio inferior e palato.

Ao correlacionar os dados de relação núcleo/citoplasma e packyears foi observada uma correlação positiva entre as variáveis. Ou seja, quanto maior o packyear do indivíduo, maior a relação núcleo/citoplasma. Entretanto, esta correlação não foi estatisticamente significativa. O packyear corresponde a um valor numérico que fornece a exposição do indivíduo ao tabaco ao longo da vida. Não foram encontrados estudos com análises semelhantes na literatura. Os estudos encontrados não realizam o cálculo de packyear. Nadaf et al. (2015) e Khot et al. (2015) incluíram no estudo pacientes que fumavam há pelo menos 5 anos, enquanto Nivia et al. (2015) e Sharma et al. (2015) incluíram no estudo pacientes que fumavam há pelo menos 10 anos. No nosso estudo, foram incluídos no Grupo Álcool-Fumo pacientes que fumavam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos. Portanto, além de não haver um padrão no que se refere ao grau de exposição ao fumo nos demais estudos, não foram calculados os valores de packyear dos pacientes, não fornecendo dados sobre o quanto cada indivíduo foi exposto ao carcinógeno.

O Grupo Leucoplasia foi subdividido em dois grupos: lesões displásicas e lesões não displásicas. A relação núcleo/citoplasma das amostras foi analisada entre si e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre elas. Não foram encontrados estudos semelhantes na literatura para comparação dos resultados. Para resultados mais consistentes, são necessários mais estudos sobre o assunto, uma vez que, no presente estudo, ao dividir o Grupo Leucoplasia, foram obtidas amostras muito pequenas.

Possivelmente observamos aumento significativo apenas no grupo carcinoma, porque as alterações morfológicas observadas surgem de forma mais tardia em relação às alterações moleculares. Sendo assim, com base nos nossos achados, a análise da relação núcleo/citoplasma de células exfoliadas não pode ser utilizada como um mecanismo de prevenção e rastreamento de indivíduos com maior risco de

desenvolvimento do câncer bucal. Para usar a citologia como um exame com essa finalidade, provavelmente seria necessária a associação com outras análises como uma análise qualitativa, análise quantitativa, análise de alterações moleculares ou a realização de um estudo longitudinal. A associação com outras análises poderia aumentar a eficácia da citologia, que apresenta vantagens por ser de baixo custo e não invasiva.

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que há um aumento da relação núcleo/citoplasma nos esfregaços citológicos dos pacientes com carcinoma espinocelular em relação aos pacientes controle, expostos aos fatores de risco (fumo e álcool) e com leucoplasias.



## REFERÊNCIAS

- ANTUNES J. L. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 4, p. 345-350, 2001.
- BANOCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **Int. Dent. J.**, London, v. 26. no. 4. p. 398-404, 1976.
- BANOCZY, J.; RIGO, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, no. 5, p. 265-267, 2001.
- BIAZEVIC, M. G. et al. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n.10, p.2105-2114, 2006.
- CARRARD, V.C. et al. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.
- CASTELLSAGUE, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 108, p. 741–749, 2004.
- COWPE, J. G.; LONGMORE, R. B.; GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related sruev. **J. R. Soc. Med.**, London, v. 78, p- 995-1004, 1985.
- DELILBASI, C. et al. Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. **Turk. J. Med. Sci.**, Ankara, v. 33, p. 39-42, 2003.
- DIONE, K. R. et al Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions int the clinic and laboratory. **Int. J. Cancer**, New York, v. 136, p. 503-515, 2014.
- GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 29, no. 4, p. 231-238, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em: 01 novembro 2016.
- JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 iranian textile workers. **Oral Dis.**, Houdnmills, v. 9, no. 6, p. 302–304, 2003.

KHOT, K. et al. A citomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **J. Nat. Sci. Biol. Med.**, Mumbai, v. 6, p. 22-24, 2015.

KRAMER, R.H. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 46, no. 4, p. 518-39, 1978.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol**, Oxford, v. 33, p. 302-12, 1997.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol. Med. Today.**, Cambridge, v. 3, p. 442-448, 1997.

MUTALIK, S. et al. Oral leukoplasia – is biopsy at the initial appointment a must? **J. Clin. Diagn. Res.**, India, v 8, no. 8, p. 4-7, 2014.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leucoplasia: Original study. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Chennai, v. 18, p. 32-38, 2014.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral Cancer and precancerous lesion. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v.52, p.195-215, 2002.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **J. Cytol.**, Calcutta, v. 32, p. 253-260, 2015.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W; Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: Effect of smoking. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, p. 53-55, 1990.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. A etiology of oral cancer: alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, no. 4, p. 247-251, 1998.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no. 5, p. 216-220, 1999.

PAIVA, R.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol: A Cytopathologic Study. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St Louis, v. 26, no. 3, p. 175-180, 2004.

PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2000. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 55, no. 2, p. 74-108, 2005.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 14, p. 47-62, 2003.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 6, p. 619–625, 2003.

SCHEPMAN, K.P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. **Eur. J. Cancer, B, Oral Oncol.**, Oxford, v. 32B, no. 6, p. 416-9, 1996.

SHARMA, D. et al. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. **Int. J. Health Sci.**, Qassim, v. 9, no. 3, p. 283–291, 2015.

SMOKING PACK YEAR **Calculator**. Disponível em:  
<http://www.smokingpackyears.com/> Acesso em: 20/07/2017.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **J. Oncol.**, Cairo, v. 2011, p.1-10, 2011.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa, terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, Oxford, v. 45, p. 317–323, 2009.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia maligna mais prevalente no mundo. Embora muito tenha se avançado no diagnóstico e na terapêutica do câncer bucal, na grande maioria das vezes, o diagnóstico ainda é realizado de forma tardia, levando a um prognóstico desfavorável. Por esse motivo, o câncer bucal vem sendo considerado um problema de saúde pública. Frente a esse fato, a identificação precoce do câncer bucal, bem como a identificação de pacientes com maior suscetibilidade ao desenvolvimento da doença e o monitoramento de alterações iniciais ou prévias ao aparecimento de lesões é uma conduta importante para a redução das taxas de mortalidade e morbidade. A análise da relação núcleo/citoplasma, que é uma das principais alterações que ocorre durante a carcinogênese, através da citologia exfoliativa, poderia auxiliar o cirurgião-dentista na detecção precoce de lesões, identificação de indivíduos com maior risco para desenvolvimento de lesões malignas e adoção de medidas preventivas nesses pacientes.

Esse trabalho analisou a relação núcleo/citoplasma de raspados citológicos de pacientes expostos aos fatores de risco, com leucoplasias e com câncer bucal. Na amostra analisada, os resultados obtidos demonstram que a relação núcleo/citoplasma apresenta diferença significativa somente nos raspados citológicos do carcinoma espinocelular em relação aos demais raspados. Ou seja, a citomorfometria não é suficiente para a detecção de maior probabilidade de desenvolvimento de lesões malignas nos pacientes expostos aos fatores de risco ou com lesão potencialmente maligna como a leucoplasia.

Para que a citologia exfoliativa possa de fato ser utilizada como um exame de prevenção e rastreamento de indivíduos com maior risco de desenvolvimento do câncer bucal, são necessários estudos que associem a análise citomorfométrica com outras análises como análises quantitativas, análises qualitativas e análises moleculares. Além disso, um estudo longitudinal poderia obter resultados mais conclusivos das alterações na relação núcleo/citoplasma que ocorrem nos indivíduos expostos aos fatores de risco ao longo do tempo.

## REFERÊNCIAS

- ANTUNES J. L. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 4, p. 345-350, 2001.
- BANOCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **Int. Dent. J.**, London, v. 26. no. 4. p. 398-404, 1976.
- BANOCZY, J.; RIGO, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, no. 5, p. 265-267, 2001.
- BIAZEVIC, M. G. et al. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n.10, p.2105-2114, 2006.
- CARRARD, V.C. et al. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.
- CARRARD, V.C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 17, p. 171–179, 2010.
- CASTELLSAGUE, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 108, p. 741–749, 2004.
- COWPE, J. G.; LONGMORE, R. B.; GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related sruev. **J. R. Soc. Med.**, London, v. 78, p- 995-1004, 1985.
- DELILBASI, C. et al. Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. **Turk. J. Med. Sci.**, Ankara, v. 33, p. 39-42, 2003.
- DIONE, K. R. et al Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions int the clinic and laboratory. **Int. J. Cancer**, New York, v. 136, p. 503-515, 2014.
- GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 29, no. 4, p. 231-238, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell.**, Cambridge, v. 144, no. 4, p. 646-74, 2011.
- IARC **Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx**: Epithelial precursor lesions. p. 177-179, 2005 Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php> >. Acesso em: 12 ago. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em: 01 nov. 2016.

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

KHOT, K. et al. A citomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **J. Nat. Sci. Biol. Med.**, Mumbai, v. 6, p. 22-24, 2015.

KRAMER, R.H. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 46, no. 4, p. 518-39, 1978.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol**, Oxford, v. 33, p. 302-12, 1997.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol. Med. Today.**, Cambridge, v. 3, p. 442-448, 1997.

MUTALIK, S. et al. Oral leukoplasia – is biopsy at the initial appointment a must? **J. Clin. Diagn. Res.**, India, v 8, no. 8, p. 4-7, 2014.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leucoplasia: Original study. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Chennai, v. 18, p. 32-38, 2014.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral Cancer and precancerous lesion. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v.52, p.195-215, 2002.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **J. Cytol.**, Calcutta, v. 32, p. 253-260, 2015.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W; Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: Effect os smoking. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, p. 53-55, 1990.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. A etiology of oral cancer: alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, no. 4, p. 247-251, 1998.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no. 5, p. 216-220, 1999.

PAIVA, R.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol: A Cytopathologic Study. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St Louis, v. 26, no. 3, p. 175-180, 2004.

PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2000. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 55, no. 2, p. 74-108, 2005.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 14, p. 47-62, 2003.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 6, p. 619–625, 2003.

SCHEPMAN, K.P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. **Eur. J. Cancer, B, Oral Oncol.**, Oxford, v. 32B, no. 6, p. 416-9, 1996.

SHARMA, D. et al. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. **Int. J. Health Sci.**, Qassim, v. 9, no. 3, p. 283-291, 2015.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **J. Oncol.**, Cairo, v. 2011, p.1-10, 2011.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa, terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, Oxford, v. 45, p. 317–323, 2009.

WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, New York, v. 36, no. 4, p.1386-92, 1975.

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

## ANEXO A - TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO\*

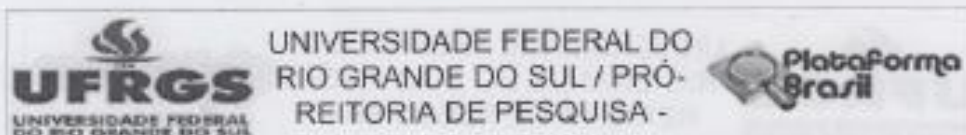
- Álcool absoluto por 15 segundos (quatro vezes)
- Água destilada por 15 segundos
- Hematoxilina de Harris com 0,5g de Ácido Acético Glacial durante 1 minuto
- Descansar em papel absorvente
- Levar em água corrente e remover somente quando esta tiver aspecto límpido
- Carbonato de Lítio\*\* durante 15 segundos
- Álcool por 15 segundos (aplicar quatro vezes)
- Orange G6 durante 1 minuto com Ácido Fosfotúngstico (0,15g/l)
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por duas vezes)
- Policromo\*\*\* durante 3 minutos
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por três vezes)
- Descansar em papel absorvente
- Xilol por 5 minutos (2x) seguido por Montagem com Bálsamo do Canadá

\*Técnica preconizada por Papanicolaou, 1941 e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizada pelo Laboratório de Patologia da UFRGS. \*\* O carbonato de lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada.

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



## ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL

**Pesquisador:** Fernanda Visioli

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 06949612.7.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Patrocinador Principal:** Faculdade de Odontologia

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 261.037

**Data da Relatoria:** 04/04/2013

#### **Apresentação do Projeto:**

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

#### **Objetivo da Pesquisa:**

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

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Retórica - Campus Centro  
 Bairro: Farroupilha CEP: 91.040-000  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-1708 Fax: (51)3308-4095 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



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



Continuação do Parecer: 261.037

**Recomendações:**

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

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 02 de Maio de 2013

Assinador por:  
José Artur Bogo Chies  
(Coordenador)

Bruno Cassel Neto  
Vice-Pró-Reitor de Pesquisa  
PROFESQUIFRG

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Famosinha CEP: 91.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br