

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA EM MUCOSA  
BUCAL HUMANA CLINICAMENTE SAUDAVEL EXPOSTA AO FUMO E AO  
ÁLCOOL POR MEIO DA TÉCNICA DE AgNOR**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

**LUHANA GEDOZ**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

**Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**

Porto Alegre, RS

2005

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial:

Aos meus pais, **Gelson** e **Neusa**, meus grandes mestres e meus maiores incentivadores, por me proporcionarem uma família maravilhosa, pelo apoio a todas as minhas escolhas, e sobretudo pelo amor. Ao **Mano**, por sempre me receber com um sorriso estampado no rosto.

A toda minha **família** que, de longe, torceu para a conclusão desta etapa.

Ao **Jose Pedro**, por ter estado presente nos bons momentos e por ter me ajudado a superar os mais difíceis durante esses dois anos.

À **família da Patologia**, por ter me recebido desde a graduação.

Ao meu querido orientador, professor **Pantelis** Varvaki Rados, pela confiança, pela amizade, pelo incentivo constante e pela paciência nesses muitos anos de orientação. Agradeço por todos os ensinamentos no campo da Patologia e no campo da vida.

Ao professor **Manoel Sant'Ana Filho** por todos os ensinamentos durante esses dois anos, por todos os momentos de ciência e de descontração.

À professora **Ana Cecília** Moraes Chaves pelos ensinamentos especialmente na parte clínica.

Aos professores **Onofre** Francisco de Quadros e João Jorge Diniz **Barbachan** pelo exemplo na área da Patologia e pelo carinho nesses anos.

As minhas queridas colegas de mestrado **Ana Luisa**, **Laura** e **Márcia** pela oportunidade de durante esses 2 anos de convivência formarmos uma família. Essas gurias valem ouro!

À **Isabel** da Silva Lauxen pelos valiosos ensinamentos laboratoriais e pela ajuda na execução deste trabalho.

À **Bianca** Barbieri pelo auxílio durante os procedimentos laboratoriais deste trabalho.

Ao **Leandro** Nunes por estar sempre disposto a ajudar e pelos incontáveis favores prestados.

Ao bolsista de iniciação científica **Guilherme** Sieck pela disponibilidade e pelo auxílio especialmente durante os atendimentos clínicos.

À **Dona Marina**, pelo bom humor e pelo carinho com que nos tratava.

À **Adriana** Aguiar pela colaboração nos assuntos burocráticos.

Ao professor **Lauro** Nunes da Rosa pela oportunidade e confiança durante o período na Unidade de Estomatologia do HCPA, por todas as enriquecedoras discussões de casos clínicos e pela amizade.

A todos os **colegas** do curso de mestrado, em especial à amiga **Ana Elisa** da Silva, não apenas pelo incentivo e ajuda durante a realização deste trabalho, principalmente, na fase de captura das imagens, como também pela amizade.

À colega e amiga **Paula** Luce Bohrer pela amizade, por todas as palavras de incentivo, pelas discussões durante as viagens a Cachoeira do Sul... e pela compreensão nessa fase final.

Aos colegas Ricardo **Paiva**, por ter realizado a fase inicial deste estudo e por todos os momentos de discussão e **Vinícius** Carrard, pelas inúmeras vezes que, com toda sua paciência, esteve disposto a ajudar a resolver as diversas dúvidas que surgiram no caminho.

Aos professores do curso de mestrado, em especial ao professor **Cassiano** Rösing por todos os ensinamentos, especialmente na área de metodologia.

Às funcionárias do DMAE **Loiraci**, pelo valioso esforço durante a fase de chamada dos pacientes e **Ilza**, pelas inúmeras vezes que cedeu a sua sala para o exame dos pacientes.

Ao amigo **Fábio** Maito pelo incentivo e amizade.

Aos **pacientes** que fizeram parte deste estudo.

Aos colegas do Sindisaúde pela compreensão e disponibilidade para troca de horários.

A todos **amigos** de perto e de longe que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

À empresa **Kolplast ci Ltda.** pela doação das escovas “cytobrush”.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** por proporcionar minha formação de graduação e pós-graduação e a **Capes** por ter financiado este estudo.

**OBJETIVO:** Avaliar a velocidade de proliferação celular em mucosa bucal clinicamente normal exposta aos carcinógenos do fumo e do álcool, por meio da citopatologia associada a técnica de AgNOR, em um período de 24 meses.

**METODOLOGIA:** Foram avaliados no exame inicial 60 indivíduos, 17 controles (grupo 1), 25 fumantes (grupo 2) e 18 fumantes e etlistas (grupo 3). Na avaliação longitudinal, realizada 24 meses depois, foram reavaliados 52 indivíduos, 15 no grupo 1, 23 no grupo 2 e 14 no grupo 3. Os esfregaços citopatológicos foram obtidos da mucosa do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal e foram submetidos a coloração pela técnica de AgNOR para avaliação da média do número, da média da área de AgNORs por núcleo e do percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 AgNORs. Os valores obtidos nas avaliações inicial e final foram comparados pelo teste t de Student com um nível de significância de 5%.

**RESULTADOS:** Houve um percentual de retorno de 86,7%. Foi observado um aumento estatisticamente significativo para os valores de média do número de AgNORs por núcleo nos grupos 2 e 3 nos três sítios anatômicos analisados. Esse aumento foi maior no grupo 3. No grupo 1, observou-se uma tendência ao aumento desses valores.

**CONCLUSÕES:** A avaliação longitudinal das variações da velocidade de proliferação celular em indivíduos expostos aos carcinógenos do fumo e do álcool pode representar uma ferramenta para o monitoramento desses indivíduos, uma vez que em período de 24 meses houve aumento dos valores das variáveis analisadas. Para a realização da avaliação longitudinal foi suficiente a análise da média do número de AgNORs por núcleo.

**Palavras-chave:** avaliação longitudinal, AgNOR, mucosa bucal, fumo, álcool

**OBJECTIVE:** To assess cell proliferation activity in oral mucosa clinically normal exposed to smoking and alcohol carcinogens, through cytopathology associated to the AgNor technique over a period of 24 months.

**METHODS:** At the initial examination, 60 individuals were evaluated. Of those, 17 were the control group (group 1), 25 were smokers (group 2) and 18 were smokers as well as alcoholics (group 3). At the longitudinal evaluation carried out 24 months later, 52 individuals were re-examined, 15 from group 1, 23 from group 2 and 14 from group 3. The cytopathological samples were obtained from swabs of lower lip mucosa, edge of the tongue and buccal floor, and were subjected to AgNor staining for evaluation of mean number and mean area of AgNors per nucleus, as well as percentage of nuclei with more than 3 and more than 5 AgNors. The figures obtained at the initial and final examinations were compared through Student's *t* test at a 5% level of significance.

**RESULTS:** There was a return percentual of 86,7%. A statistically significant increase was observed in the figures of mean number of AgNors per nucleus in groups 2 and 3 in the three anatomical sites analyzed. Such increase was higher in group 3. In group 1, a tendency towards the increase in those figures was observed.

**CONCLUSIONS:** The longitudinal evaluation of speed variations in cell proliferation regarding individuals exposed to smoking and alcohol carcinogens may present itself as a tool in the monitoring of these individuals, considering that, in a period of 24 months, there was an increase in the figures of the variables analyzed. To perform the longitudinal evaluation, the analysis of the mean number of AgNors per nucleus sufficed.

**Key-words:** longitudinal evaluation, AgNor, buccal mucosa, smoking, alcohol

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	08
OBJETIVOS.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
ARTIGO CIENTÍFICO*.....	29
Introdução.....	29
Metodologia.....	31
Figuras .....	35
Resultados.....	36
Tabelas.....	39
Discussão.....	42
Agradecimentos.....	48
Referências.....	48
ANEXO.....	51

\*Artigo formatado de acordo com as normas para publicação da Revista Acta Cytologica

## ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

---

### CARCINOGENESE E CÂNCER BUCAL

A carcinogênese é um processo que envolve as etapas de iniciação, promoção e progressão tumoral. A iniciação tumoral está relacionada com um dano do DNA, resultante de mutações causadas por carcinógenos. As células iniciadas podem sofrer ação de agentes promotores, que estimulam sua proliferação, podendo induzir o desenvolvimento do câncer (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2001). O processo que desencadeia o desenvolvimento do câncer é conseqüência de um acúmulo de mutações nos genes que regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular (SCULLY, 1992). Uma maior taxa de proliferação celular aumenta a suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer, uma vez que as células em divisão tornam-se mais suscetíveis a mutações (OIJEN et al., 1998).

O câncer de boca representa um problema de saúde pública no Brasil. Apesar de esforços estarem sendo realizados com intuito de reduzir os índices de mortalidade em conseqüência da doença, o número de casos e de mortes aumenta a cada ano. De acordo com dados do INCA, o número de casos de câncer de boca nos últimos cinco anos aumentou 33,7%. A estimativa de incidência da doença para 2005 no Brasil aponta este tumor como o oitavo mais freqüente entre os homens e o nono entre as mulheres, com 13880 casos estimados ([http:// www.inca.org.br/estimativas/2005/tbregiões/](http://www.inca.org.br/estimativas/2005/tbregiões/)).

Estudos realizados em diferentes países concordam no que diz respeito à epidemiologia do câncer de boca. A doença é mais comum em homens, na faixa etária acima dos 40 anos. Os sítios anatômicos de maior prevalência são o lábio inferior, a borda da língua e o assoalho bucal (KROLLS, HOFFMAN, 1976; SAWYER, WOOD, 1992; LLELWELYN, MITCHELL, 1994; REIS et al. 1997; ZAVRAS et al., 2001). Evidências recentes mostram um aumento do número de casos em indivíduos mais jovens, na faixa etária abaixo dos 40

anos (HINDLE, DOWNER, SPEIGHT, 1996; LLEWELLYN, JOHNSON, WARNAKULASURIYA, 2001). Estudos do mecanismo molecular de desenvolvimento da lesão nesses indivíduos mais jovens demonstraram que eles apresentam alterações genéticas semelhantes às encontradas nos indivíduos mais velhos (JIN et al., 1999).

Embora a etiologia do câncer bucal esteja relacionada a múltiplos fatores, o fumo e o álcool são os carcinógenos mais comumente envolvidos no mecanismo de desenvolvimento da doença (BLOT et al., 1988; REIS et al., 1997; WIGHT, OGDEN, 1998; ZAVRAS et al., 2001; POLEDNAK, 2005), mesmo em indivíduos com idade inferior a 45 anos (LLEWELLYN et al., 2004).

A ação do fumo na mucosa bucal tem sido avaliada (SOARES PINTO et al., 2003; PAIVA et al., 2004; BOHRER et al., 2005), e sua relação com as alterações celulares induzidas durante a carcinogênese são resultantes da queima do tabaco, que é considerado um agente iniciador (FRANKS, 1996). São identificadas no tabaco e na fumaça que dele se desprende cerca de 4700 substâncias tóxicas, entre elas, 60 apresentam ação carcinogênica, destacando-se os hidrocarbonetos policíclicos e as nitrosaminas específicas do tabaco (HOFFMANN, WYNDER, 1986).

O etanol não tem ação carcinogênica e não causa dano direto no DNA (WIGHT, OGDEN, 1998). Entretanto, o seu primeiro produto metabólico, originado a partir da ação da enzima ADH (álcool desidrogenase), o acetaldeído, tem ação mutagênica (MASCRES et al., 1984). O acetaldeído é capaz de induzir alterações celulares, como a quebra da fita de DNA, sendo considerado um agente genotóxico (BIRD, DRAPER, BASRUR, 1982).

Estudos sugerem um sinergismo da ação do fumo e do álcool na etiologia do câncer de boca (BLOT et al., 1988; MASHBERG, 1993). O etanol pode ter um efeito direto sobre a mucosa, alterando a homeostase das células epiteliais, alterando a estrutura da mucosa ou induzindo um aumento da permeabilidade do epitélio (VALENTINE et al., 1985; HOWIE et

al., 2001). Dessa forma, o etanol atua como um agente facilitador para a penetração de carcinógenos e tornando os tecidos suscetíveis a sua ação (HOWIE et al., 2001). A associação entre o fumo e o álcool na etiologia do câncer de boca está relacionada com esse efeito de aumento da permeabilidade causado pelo álcool que pode ocasionar um aumento da penetração dos carcinógenos presentes no tabaco (SQUIER, COX, HALL, 1986; DU et al., 2000).

Estudos em humanos que avaliem o efeito do álcool isoladamente nas células da mucosa bucal são raros devido à dificuldade em se obter informações acuradas referentes ao hábito de ingestão (OGDEN et al., 1999) e, além disso, devido à dificuldade de isolar os efeitos do álcool e do tabaco, uma vez que a maioria dos etilistas é tabagista (RICH, RADDEN, 1984).

## **CITOPATOLOGIA**

A citopatologia foi inicialmente utilizada no diagnóstico de lesões uterinas. Estudos realizados por Papanicolaou e Traut (1943) resultaram no desenvolvimento de um método para observação microscópica das células da mucosa vaginal. Os autores constataram a possibilidade de identificação de células com alterações neoplásicas em esfregaços corados por este método. Esta técnica, após algumas adaptações, pôde ser aplicada ao estudo das células esfoliadas da cavidade bucal (MONTGOMERY, 1951; COHEN, 1966; NOVELLI et al., 1981). A citopatologia, quando aplicada na mucosa bucal, baseia-se na análise das características morfológicas das células descamadas e obtidas por raspagem (BANÓCZI, 1976).

O epitélio bucal mantém sua homeostase pelo processo de renovação celular contínuo, em que as células se dividem por mitose nas camadas mais profundas e migram para a superfície, substituindo as que sofrem descamação (SQUIER, FINKELSTEIN, 2001).

Alterações nesse processo de maturação epitelial podem ser observadas através da citopatologia. Muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o padrão de maturação celular de diferentes regiões da boca, demonstrando que os sítios anatômicos da cavidade bucal apresentam diferentes graus de maturação epitelial (MONTGOMERY, 1951; SILVERMAN, BECKS, FARBER, 1958). Além disso, a citopatologia foi utilizada para avaliação das alterações no padrão de maturação epitelial causadas por diferentes estímulos. Entre esses estímulos, destaca-se o fumo (ZIMMERMAM, ZIMMERMAM, 1965; KAPCZINSKI, 1997; SILVA, RADOS, 1997; ROMANINI, 1999; SOARES PINTO et al., 2003; PAIVA et al., 2004; BOHRER et al., 2005).

Os instrumentos de coleta em citopatologia bucal devem ser de fácil utilização na boca, não devem causar desconforto para o paciente e devem coletar um número significativo de células epiteliais, com boa distribuição pela lâmina (JONES et al., 1994). A espátula de madeira foi utilizada em muitos estudos como instrumento de coleta (COWPE, LONGMORE, GREEN, 1988; OGDEN, COWPE, GREEN, 1990; SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO, SANT'ANA FILHO, YURGEL, 2001). Estudos sugerem a utilização da escova cytobrush®, uma vez que esse instrumento mostrou-se mais conveniente em comparação com a espátula de madeira para utilização em citopatologia bucal (OGDEN, COWPE, GREEN, 1992; JONES et al., 1994). Orellana-bustos et al. (2004) compararam quantitativamente as células de borda de língua coletadas com espátula de madeira e escova cytobrush® e observaram que os esfregaços coletados com escova cytobrush® apresentaram uma quantidade maior de células intermediárias.

Paiva (2003) sugere a utilização de outros métodos de coleta e processamento, como a citologia em meio líquido, que resultem em menor quantidade de muco e restos alimentares nos esfregaços citológicos da cavidade bucal, facilitando sua análise. A citologia em meio líquido vêm sendo utilizada em estudos de mucosa cérvico-vaginal como uma importante

alternativa para o ganho de sensibilidade no diagnóstico citopatológico (CASTLE, et al., 2003; KLINKHAMER et al., 2003). A técnica de citologia em meio líquido consiste em transferir o material coletado para um meio líquido, que tem propriedade de preservar as estruturas morfológicas e moleculares do esfregaço (HUTCHINSON et al., 1999). A sua aplicação, bem como a sua validação na mucosa bucal ainda não foram estabelecidas.

O exame citopatológico foi utilizado inicialmente na boca para o diagnóstico precoce de lesões suspeitas de malignidade. Em consequência dos índices de falso-positivos e falso negativos, quando comparou-se o método citopatológico com o histopatológico (SANDLER et al., 1960, SANDLER, 1964; ROVIN, 1967), a citopatologia, atualmente, tem sido utilizada com intuito de identificar alterações celulares prévias ao aparecimento de lesões clinicamente detectáveis (KAPCZINSKI, 1997; SILVA, RADOS, 1997; ROMANINI, 1999; CANÇADO, SANT'ANA FILHO, YURGEL, 2001; GEDOZ, et al., 2001; SOARES PINTO et al., 2003), para o controle periódico de pacientes com exposição crônica aos carcinógenos do fumo e do álcool (SUGERMAN, SAVAGE, 1996) e como meio de rastreamento de alterações celulares em populações de alto risco para o desenvolvimento do câncer de boca (SUDBO, REITH, 2003; PAIVA et al., 2004; BOHRER et al., 2005).

Apesar da técnica de Papanicolaou ser sensível para identificar alterações morfológicas e de maturação celular, a associação de técnicas quantitativas passou a ser utilizada com o intuito de aprimorar a acurácia e o potencial do diagnóstico citopatológico (OGDEN, 1997; OGDEN, COWPE, WIGHT, 1997). Entre elas, destacam-se a técnica de micronúcleos (STICH, ROSIN, 1983; BOHRER et al, 2005), a quantificação do DNA (COWPE, LONGMORE, 1981; GEDOZ et al., 2004) e a técnica de AgNOR (SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO, SANT'ANA FILHO, YURGEL, 2001; SOARES PINTO et al., 2003; ORELLANA-BUSTOS et al., 2004; PAIVA et al., 2004).

## **AgNORs – REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES CORADAS PELA PRATA**

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são estruturas funcionais presentes no nucléolo, que contém todos os componentes necessários para a síntese de RNAr (Rna ribossômico) (DERENZINI, 2000). O nucléolo forma-se a partir de alças de DNA (ácido desoxirribonucléico) que se estendem partindo da região de cromossomos que contém a NOR. Cada NOR é formada por genes repetidos e organizados em fileiras, constituindo o DNAr (Dna ribossômico), que estão localizados, em humanos, nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15 21 e 22 (PLOTON et al., 1986; SCHLIEPHAKE, 2003).

Associado aos genes responsáveis pela transcrição de RNAr há um conjunto de proteínas não-histônicas que possuem seletividade tintorial pela prata (DERENZINI, PLOTON, 1991), permitindo que sejam visualizadas em preparos histo e citológicos (DERENZINI, 2000).

As NORs, após impregnação pela prata passam a serem denominadas AgNORs. Essa técnica de impregnação pela prata é específica para detecção de NORs ativas, que são aquelas em que o DNAr potencialmente ativo é observado. Em microscopia óptica, as AgNORs podem ser identificadas como pontos pretos que, nas células em interfase, estão exclusivamente localizados no interior dos núcleos (DERENZINI, PLOTON, 1991; TRERÉ, 2000).

A quantidade de impregnação pela prata está diretamente relacionada ao nível de síntese de RNAr e um aumento na expressão de NORs é observado em células com alta velocidade proliferativa (DERENZINI, PESSION, TRERÉ, 1990; DERENZINI, PLOTON, 1991; DERENZINI et al., 2000; DERENZINI et al., 2004), pois quanto mais acelerado está o ciclo celular, menor o tempo e a possibilidade das NORs, que estão individualizadas em cada cromossomo durante a mitose, agruparem-se durante a interfase (DERENZINI, PLOTON,

1991). A quantidade e o tamanho das AgNORs variam, portanto, de acordo com a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular (CROCKER, BOLDY, EGAN, 1989; SIRRI, ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 2000; DERENZINI et al., 2004). Em células com alta atividade proliferativa, as AgNORs apresentam-se em maior número e menores, quando comparadas com células com baixa atividade proliferativa (CROCKER, BOLDY, EGAN, 1989).

As AgNORs podem ser quantificadas por meio de contagem de pontos, mensuração da área dos pontos e percentual do número de pontos por núcleo. O método utilizado inicialmente para avaliação das AgNORs, em preparos histológicos e citológicos, foi a contagem de pontos, considerada imprecisa e pouco reproduzível (CABRINI et al., 1992; CECCARELLI et al., 2000). A mensuração da área das AgNORs passou a ser utilizada por ser um método reproduzível e de maior acurácia (CECCARELLI et al., 2000; TRERÈ, 2000; DERENZINI, 2000; PAIVA et al., 2004). A avaliação do percentual de AgNORs por núcleo foi introduzida por Mourad et al. (1992). Xie et al. (1997) utilizaram esse método com o objetivo de determinar o prognóstico de carcinomas espinocelulares e o consideraram de mais fácil realização quando comparado com a mensuração da área, uma vez que não necessita de equipamentos sofisticados. Os autores observaram que 60% das células dos carcinomas espinocelulares apresentavam núcleos com mais de 4 pontos de AgNORs.

### **AgNORS E CITOPATOLOGIA**

O estudo quantitativo das AgNORs em esfregaços citopatológicos, apesar de estar sendo menos utilizado que em cortes histológicos, é mais preciso, já que todo nucléolo pode ser analisado e não apenas uma parte dele como ocorre em secções de tecidos (SUJATHAN et al., 1996). Além disso, a fixação em álcool resulta em uma visualização mais facilitada das AgNORs (TRERÈ, 2000).

Em citopatologia, a técnica de AgNOR também foi utilizada com intuito de avaliar a proliferação celular em mucosa bucal com presença de lesões (CARDILLO, 1992) e mucosa normal de indivíduos expostos aos carcinógenos do fumo e do álcool (SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO, SANT'ANA FILHO, YURGEL, 2001; SOARES PINTO et al., 2003; ORELLANA-BUSTOS et al., 2004; PAIVA et al., 2004).

Cardillo (1992) utilizou a técnica de contagem de AgNORs, a partir de biópsia por punção em glândulas salivares, com intuito de distinguir lesões benignas de malignas. O autor sugere a utilização dessa técnica para o diagnóstico de lesões malignas de glândulas salivares. Porém, é importante salientar o número pequeno de amostra avaliado neste estudo.

Sampaio et al. (1999) avaliaram as diferenças no grau de proliferação celular na mucosa jugal de fumantes e não-fumantes, procurando estabelecer as alterações celulares que o fumo pode induzir nessas células. A partir da contagem de AgNORs, os autores observaram um aumento do número de AgNORs e da frequência de núcleos com mais de 5 AgNORs em fumantes, o que indica um aumento na atividade proliferativa nas células da mucosa bucal normal desses indivíduos.

Cançado, Sant'Ana Filho e Yurgel (2001) utilizaram uma metodologia semelhante a Sampaio et al. (1999), porém, com uma amostra maior. Foram avaliados a média do número de AgNORs por núcleo, o percentual de núcleos com mais de 5 AgNORs e foi introduzida a quantificação do percentual de núcleos com mais de 3 AgNORs. Os autores observaram um aumento da atividade proliferativa em esfregaços de borda de língua e assoalho de boca em fumantes, e sugerem que o hábito de fumar pode induzir alterações nos parâmetros de regulação do ciclo celular. Além disso, os autores verificaram uma maior taxa de proliferação nas células do assoalho da boca, quando comparadas com as células da borda da língua nos fumantes. Esse achado sugere que a mucosa não-ceratinizada é mais suscetível aos carcinógenos presentes no fumo em comparação com a ceratinizada. Entretanto, mais

evidências são necessárias para avaliar a relação desses achados com o desenvolvimento do câncer bucal. Os autores sugerem, ainda, que a técnica de AgNORs pode ser utilizada para a detecção precoce do câncer bucal em pacientes expostos ao fumo.

Soares Pinto et al. (2003) quantificaram as AgNORs em esfregaços obtidos do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal em fumantes e não fumantes. Os autores observaram um aumento do número de AgNORs apenas em assoalho bucal de fumantes, possivelmente devido ao tamanho da amostra.

Orellana-Bustos et al. (2004) avaliaram a atividade proliferativa em mucosa de borda da língua de indivíduos fumantes e não fumantes por meio da contagem de AgNORs e observaram uma taxa maior de proliferação celular em fumantes. Os autores sugerem que a análise das AgNORs pode ser um método auxiliar para monitorar indivíduos que apresentam risco para o desenvolvimento do câncer de boca, já que se trata de uma técnica não invasiva e de fácil realização.

Paiva et al. (2004), além de avaliarem a atividade proliferativa através da técnica de AgNOR em indivíduos fumantes, avaliaram indivíduos expostos ao fumo e ao álcool concomitantemente. Os autores observaram os mesmos resultados que Sampaio et al. (1999), Cançado, Sant'Ana Filho e Yurgel (2001) e Orellana-Bustos et al. (2004) com relação aos fumantes e, além disso, verificaram uma taxa de proliferação celular ainda maior nos indivíduos expostos ao fumo e ao álcool. Neste estudo, os autores, além da avaliação da média do número de AgNORs por núcleo, introduziram o método de mensuração da área das AgNORs e observaram que a utilização da média da área das AgNORs por núcleo não foi mais sensível para avaliar a atividade de proliferação celular quando comparada ao método de contagem das AgNORs. Esse resultado sugere a viabilidade da utilização da técnica de contagem de AgNORs para monitoramento de indivíduos expostos a esses carcinógenos, por

ser este um método de fácil execução e baixo custo quando comparado com a mensuração da área.

A aplicação da técnica de AgNOR em diferentes sítios anatômicos tem sido realizada devido às diferenças no padrão de maturação epitelial (MONTGOMERY, 1951; SILVERMAN, BECKS, FARBER, 1958; KAPCZINSKI, 1997; SILVA, RADOS, 1997; PAIVA, 2003) e no ritmo de proliferação celular (LIU, KLEIN-SZANTO, 2000).

Os estudos que utilizaram a técnica de AgNOR em esfregaços de mucosa bucal de fumantes, observaram um aumento da taxa de proliferação celular nesses indivíduos (SAMPAIO et al, 1999; CANCADO, SANT'ANA FILHO, YURGUEL, 2001; SOARES PINTO et al., 2003; ORELANA-BUSTOS et al., 2004; PAIVA et al., 2004). No entanto, o significado desse aumento a longo prazo permanece incerto.

Sampaio et al. (1999) e Cançado, Sant'Ana Filho e Yurgel (2001) questionam o significado do aumento da proliferação celular em mucosa bucal normal em fumantes, sendo necessários mais estudos para definir a relação desse aumento com o desenvolvimento de neoplasias malignas. No entanto, estudos já demonstraram que quanto maior a taxa de proliferação celular, maior a suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer, pois as células em divisão estão mais sensíveis a mutações (OIJEN et al., 1998; GIROD et al., 1998).

## **MONITORAMENTO DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINOGENOS**

Muitos estudos buscaram estabelecer metodologias efetivas para o rastreamento e a detecção precoce de lesões cancerizáveis e de câncer bucal (KUJAN et al., 2005). Rodrigues, Moss e Tuomainen (1998) sugerem que a realização de exames visuais sistemáticos na mucosa bucal é barata, de fácil realização e causa um mínimo desconforto para os indivíduos. Nagao e Warnakulasuya (2003) sugerem a realização de um rastreamento anual em pacientes de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, estabelecendo um processo contínuo de

exame clínico nesses pacientes. De acordo com Ramadas et al. (2003), a eficácia desse tipo de rastreamento, com relação à redução da mortalidade por câncer de boca ainda não foi estabelecida. Além disso, esse tipo de rastreamento permite apenas a observação de alterações clinicamente detectáveis. A observação de alterações em nível celular, através de marcadores celulares específicos, previamente ao aparecimento de lesões clinicamente visíveis, ainda não foi estabelecida em âmbito populacional.

Kujan et al. (2005), em uma revisão sistemática sobre avaliação de estratégias de rastreamento populacional com intuito de diagnosticar precocemente o câncer bucal, observou que não há um método estabelecido para esse rastreamento e sugere que um melhor entendimento a respeito das bases genéticas da lesão é essencial para o desenvolvimento de marcadores moleculares que contribuam para um rastreamento efetivo.

Sudbo et al. (2005) avaliaram a ploidia celular em indivíduos que pararam de fumar e que permaneceram com o hábito, com intuito de determinar marcadores genéticos que identifiquem risco para desenvolvimento de câncer bucal. Foi realizado um acompanhamento de 24 meses e 2 dos 4 indivíduos com conteúdo de DNA tetraplóide e 11 dos 19 aneuplóides passaram a apresentar conteúdo de DNA diplóide depois que abandonaram o hábito de fumar. Um dos indivíduos que permaneceram com o hábito desenvolveu câncer de boca. Os autores sugerem que se marcadores de risco forem identificados na mucosa clinicamente saudável de fumantes, uma intervenção precoce pode possibilitar uma reversão das alterações citogenéticas e do risco de desenvolvimento de malignidade.

Os estudos que utilizam a técnica de AgNOR para avaliar alterações no grau de proliferação celular em fumantes sugerem que a técnica seja utilizada para o monitoramento desses indivíduos (SAMPAIO et al., 1999; CANÇADO, SANT'ANA FILHO, YURGEL, 2001; ORELLANA-BUSTOS et al., 2004; PAIVA et al., 2004). Os estudos realizados até o momento são transversais e não existem evidências de estudos de acompanhamento e

avaliações longitudinais desses pacientes. Faltam ainda estudos mais detalhados quanto a outro parâmetro importante, que diz respeito ao ritmo (tempo) transcorrido entre o início das alterações de proliferação celular e sua transformação maligna.

A análise das AgNORs pode contribuir para o monitoramento de indivíduos expostos a fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer e pode ter um significado importante em estudos prospectivos (PICH, CHIUSA, MARGARIA, 2000).

Sabendo-se que o câncer é resultado de um acúmulo de mutações e de alterações no mecanismo de regulação da taxa de proliferação celular, sugere-se a realização de estudos longitudinais em pacientes expostos a ação cumulativa dos fatores de risco para desenvolvimento do câncer de boca. Essa avaliação pode ser realizada por meio da citopatologia associada à técnica de AgNOR, verificando-se as variações nos valores de número, área e percentuais de pontos de AgNOR e sua relação com o aparecimento de alterações clínicas. A verificação dessas variações pode ser importante para o desenvolvimento de marcadores que identifiquem risco para o desenvolvimento do câncer e que possam ser utilizados em âmbito populacional.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GERAL

- Avaliar a taxa de proliferação celular em mucosa bucal humana clinicamente saudável exposta aos carcinógenos do fumo e do álcool, por meio da citopatologia associada à técnica de AgNOR, em um período de 24 meses.

### OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a taxa de proliferação celular na mucosa do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal em indivíduos fumantes e fumantes/etilistas, por meio da quantificação:
  - da média dos pontos de AgNORs por núcleo,
  - da média da área dos pontos de AgNORs por núcleo,
  - do percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs.

## REFERÊNCIAS

- 
- BANÓCZY, J. Exfoliative Cytology Examinations in the Early Diagnosis of Oral Cancer. **Int. Dent. J.**, Bristol, v. 26, no. 4, p. 398-404, Dec. 1976.
- BIRD, R.P.; DRAPER, H.H.; BASRUR, P.K. Effect of Malonaldehyde and Acetadehyde on Cultured Mammalian Cells. Production of Micronuclei and Cromossomal Aberration. **Mutant. Res.**, Amsterdam, v. 101, no. 3, p. 237-246, May 1982.
- BLOT, W.J. et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v. 48, no. 11, p. 3282-3287, June 1988.
- BOHRER, P.L. **Avaliação das Alterações Citopatológicas da Mucosa Clinicamente Normal Exposta a Carcinógenos**. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil: 2005**. Disponível em: <http://inca.org.br/epidemiologia/estimativa2003/> Acesso em 23/07/2005.
- CANÇADO, R.P.; SANT'ANA FILHO, M.; YURGEL, L.S M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 5, p. 446-454, July 2001.
- CARDILLO, M.R. AgNOR Technique in Fine Needle Aspiration Cytology of Salivary Gland Masses. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 36, no. 2, p. 147-151, Mar-Apr. 1992.
- CASTLE, P.E. et al. Stability of Archived Liquid-Based Cervical Cytologic Specimens. **Cancer**, New York, v. 99, no. 2, p. 89-96, Oct. 2003.
- CECCARELLI, C. et al. AgNOR In Breast Tumours. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 143-149, Apr. 2000.
- COHEN, L. Some Observations on the Use of Exfoliative Cytology in Diagnosis of Oral Lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 21, no. 4, p. 458-464, Apr. 1966.
- COWPE, J.G.; LONGMORE, P.B. Nuclear Area and Feulgen DNA Content of Normal Buccal Mucosal smears. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v.10, n.2, p.81-86, Apr. 1981.

COWPE, J.G.; LONGMORE, P.B.; GREEN, M.W. Quantitative Exfoliative Cytology of Abnormal Oral Mucosal Smears. **J. Royal Soc. Med.**, London, v. 81, no. 9, p. 509-513, Sep. 1988.

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

DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÉ, D. Quantity of Nucleolar Silver Stained Proteins is Related to Proliferating Activity in Cancer Cells. **Lab. Invest.**, New York, v. 63, no. 1, p. 137-140, July 1990.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, New York, v. 32, p. 149-192. 1991.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron.**, Oxford, v. 31, no.2, p. 117-120, Apr. 2000.

DERENZINI et al. Nucleolar Size Indicates The Rapidity Of Cell Proliferation In Cancer Tissues. **J. Pathol.**, London, v. 191, no.2, p. 181-186, June 2000.

DERENZINI, M. et al. The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the Prb and P53 Status. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 57, no. 7, p. 755-761, July 2004.

DU, X. et al. Penetration of N-Nitrosornicotine (NNN) Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol and Nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, no. 2, p. 80-85, Feb. 2000.

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

GEDOZ, L. et al. Citopatologia Esfoliativa da Mucosa Bucal - Controle de Pacientes com Leucoplasia. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 11, supl., p. 58, 2001. Resumo.

GEDOZ, L. et al. Quantificação do DNA das células epiteliais em esfregaços da mucosa bucal normal exposta ao álcool e ao fumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESTOMATOLOGIA, 30., 2004, Cabo Frio; JORNADA DE ESTOMATOLOGIA, 12., 2004, Cabo Frio. **Anais...** Rio de Janeiro: SOBE, 2004. P. 47-48.

GIROD, S.C. et al. Proliferative Activity and Loss of Function of Tumor Suppressor Genes as Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Benign and Preneoplastic Oral Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, no. 4, p. 252-260, Aug. 1998.

HINDLE, I.; DOWNER, M.C.; SPEIGHT, P.M. The Epidemiology of Oral Cancer. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 34, no. 5, p. 471-476, Oct. 1996.

HOFFMANN, D.; WYNDER, E.L. Chemical Constituents and Bioactivity of Tobacco Smoke. **Iarc. Sci. Publ.**, Lyon, v.74, p.145-165, 1986.

HOWIE, N..M. et al. Short-Term Exposure to Alcohol Increases the Permeability of Human Oral Mucosa. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 7, no. 6, p. 349-354, Nov. 2001.

HUTCHINSON, M.L. et al. Utility of Liquid-Based Cytology for Cervical Carcinoma Screening. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 87, no. 2, p. 48-54, Apr. 1999.

JIN, Y. T. et al. Genetic Alterations in Oral Squamous Cell Carcinoma of Young Adults. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 3, p. 251-256, Aug. 1999.

JONES, A. C. et al. The Cytobrush Plus Cell Collector in Oral Cytology. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 77, no. 1, p. 101-104, Jan. 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. A Célula Cancerosa. In: **Biologia Celular e Molecular**. 7ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000. Cap.19, p.292-301.

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

KLINKHAMER, P.J. et al. Liquid-Based Cervical Cytology. **Cancer**, New York, v. 99, no. 5, p. 263-71, Oct. 2003.

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

KUJAN O. et al. Evaluation of Screening Strategies for Improving Oral Cancer Mortality: A Cochrane Systematic Review. **J. Dent Educ.**, Washington, v. 69, no, 2, p. 255-265, Feb. 2005.

LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J. P. Markers of Proliferation in Normal and Leucoplakic Oral Epithelia. **Oral Oncol.**, Oxford, v.36, no.2, p.145-151, Mar. 2000.

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

LLEWELLYN, C.D.; JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, K.A.A.A. Risk Factors for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity in Young People – a Comprehensive Literature Review. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no5. p. 401-418, Jul. 2001.

LLEWELLYN, C.D. et al. An Analysis of Risks Factors for Oral Cancer in Young People: a Case-Control Study. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, no. 3, p. 304-313, Mar. 2004.

MASCRES, C. et al. Morphologic Changes of the Esophageal Mucosa in the Rat After Chronic Alcohol Ingestion. **Exp. Pathol.**, Jena, v. 25, no. , p.147-153, 1984.

MASHBERG, A. et al. Tobacco Smoking, Alcohol Drinking and Cancer of the Oral Cavity and Oropharynx Among U.S. Veterans. **Cancer**, New York, v. 72, no.4 ,p. 1369-1375, Aug. 1993.

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

MOURAD, W. A. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Breast Carcinoma. **Cancer.**, New York, v. 69, no.7, p. 1739-1744, Apr. 1992.

NAGAO, T; WARNAKULASURIYA, S. Annual Screening for Oral Cancer Detection. **Cancer Detect. Prev.**, Oxford, v. 27, no. 5, p. 333-337, 2003.

NOVELLI, M.D. et al. Estudo Comparativo entre a Citologia Esfoliativa e os Achados Clínicos de 1498 Pacientes. **Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.**, Sao Paulo, v. 35, n. 5, p. 416-419, 1981.

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

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M. Cytobrush and Wooden Spatula for Oral Exfoliative Cytology. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 36, no. 5, p. 706-710, Sep-Oct. 1992.

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

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; WIGHT, A.J. Oral Exfoliative Cytology: Review of Methods of Assessment. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.26, n.5, p.201-205, May 1997.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A J. Aetiology of Oral Cancer: Alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, no. 4, p. 247-251, Aug. 1998.

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

OIJEN, M.G.C.T. et al. Increased Number of Proliferating Cells in Oral Epithelium from Smokers and Ex-Smokers. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 4, p. 297-303, Jul. 1998.

ORELLANA BUSTOS A. I. et al. Evaluation of Keratinization and AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Oral Mucosa from Smokers and Non-Smokers. **Med Oral**, Santiago, v. 9, no. 3, p. 197-203, May-Jul. 2004.

PAIVA, R.L. **Quantificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNORs) em Células da Mucosa Bucal Normal Exposta ao Fumo e ao Álcool: um Estudo Citopatológico.** 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H. **Diagnosis of Uterine Cancer by Vaginal Smear.** New York: Commonwealth Fund., 1943, 46p.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor Pathology. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 133-141, Apr. 2000.

PLOTON, D. et al. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Region of the Optical Level. **Histochem. J.**, London, v. 18, no. 1, p. 5-14, Jan. 1986.

POLEDNAK, A. P. Recent Trends in Incidence Rates for Selected Alcohol-Related Cancers in the United States. **Alcohol & Alcoholism**, Oxford, v. 40, no. 3, p. 234-238, May-Jun. 2005.

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

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

RAMADAS, K. Interin Results from a Cluster Randomized Controlled Oral Cancer Screening in Kerala, India. **Oral Oncol.**, Oxford, v.39, n.6, p.580-588, Sep. 2003.

RODRIGUES, V.C.; MOSS, S.M.; TUOMAINEN, H. Oral Cancer in the UK: To Screen or Not To Screen? **Oral Oncol.**, Oxford, v.34, n.6, p.454-465, Nov. 1998.

ROMANINI, J. **Utilização da Citopatologia em Campanha de Prevenção do Câncer Bucal.** 1999.77f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

SANDLER, H.C. et al. Exfoliative Cytology for Detection of Early Mouth Cancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 13, no. 8, p. 994-1009, Aug. 1960.

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

SAWYER, D.R.; WOOD, N.K. Oral Cancer. Etiology, Recognition and Managment. **Dent. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 36, no. 4, p. 919-944, Oct. 1992.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic Relevance of Molecular Markers of Oral Cancer-A Review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 32, no. 3, p. 233-245, Jul. 2003.

SCULLY, C. Oncogenes, Onco-supressors, Carcinogenesis and Oral Cancer. **Br. Dent. J.**, London, v. 173, no. 2, p. 53-59, Jul. 1992.

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

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

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR Proteins: Qualitative and Quantitative Changes During the Cell Cycle. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 121-126, Apr. 2000.

SOARES PINTO, T. A. et al. Avaliação Quantitativa de Núcleo/Citoplasma e AgNORs em Células da Mucosa Bucal de Fumantes e Não-Fumantes. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 44, n. 2, p. 17-21, Dez. 2003.

SQUIER, C. A.; COX, P.; HALL, B.K. Enhanced Penetration of Nitrosornicotine Across Oral Mucosa in Presence of Ethanol. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, no. 5, p. 276-279, May 1986.

SQUIER, C. A.; FINKELSTEIN, M.W. Mucosa Bucal. In: TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439p. Cap.16, p.323-339.

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

SUDBO, J.; REITH, A. Which Putatively Pre-Malignant Lesions Become Oral Cancers? Clinical Relevance of Early Targeting of High Risk Individuals. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 32, no.2, p. 63-70, Feb. 2003.

SUDBO, J. et al. Risk Markers of Oral Cancer in Clinically Normal Mucosa As an Aid in Smoking Cessating Counseling. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 23, no. 9, p. 1927-1933, Mar. 2005.

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

SUJATHAN, K. et al. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. **Acta Cytol.**, St Louis, v. 40, no. 4, p. 724-728, Jul-Aug. 1996.

TRERÈ, D. Agnor Staining and Quantification. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 127–131, Apr. 2000.

VALENTINE, J. A. et al. A Histological Analysis of the Early Effects of Alcohol and Tobacco Usage on Human Lingual Epithelium. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 8, p. 654-665, Sep. 1985.

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

XIE, X. et al. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia and Squamous Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer**, New York, v. 79, no. 11, p. 2200-2208, June 1997.

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

ZIMMERMAM, E.R.; ZIMMERMAM, A.Z. Effects of Race, Age, Smoking Habits, Oral and Systemic Disease on Oral Exfoliative Cytology. **J. Dent. Res.**, San Diego, v. 44, no. 4, p. 627-631, Jul-Ago. 1965.

---

**Avaliação Longitudinal da Atividade Proliferativa em Mucosa Bucal Humana  
Clinicamente Saudável Exposta ao Fumo e ao Álcool por meio da Técnica de AgNOR**

Luhana GEDOZ<sup>1</sup>, Isabel da Silva LAUXEN<sup>2</sup>, Manoel Sant`Ana FILHO<sup>3</sup>, Pantelis Varvaki

RADOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Bióloga responsável pelo Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup> Doutor em Odontologia, Professor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço para correspondência: Av. Benjamin Constant 1440/302

Cep 90550-002 Porto Alegre-RS, Brasil

Telefone 33371020

E-mail:pantelis@ufrgs.br

## **INTRODUÇÃO**

Os carcinógenos mais comumente relacionados ao desenvolvimento do câncer de boca são o fumo e o álcool<sup>1-5</sup>, e as alterações celulares que estes agentes induzem na mucosa bucal podem ser observadas através da citopatologia<sup>6-8</sup>. Esse método de exame tem sido utilizado para avaliação de indivíduos expostos a fatores de risco para o câncer de boca buscando identificar alterações celulares por meio da análise morfológica das células ou pelo emprego de técnicas quantitativas que aprimoram a sua acurácia e o seu potencial de diagnóstico. A

técnica de AgNOR permite uma análise quantitativa da atividade proliferativa de células epiteliais de indivíduos expostos ao fumo, isoladamente<sup>6-11</sup> ou em associação com o álcool<sup>7</sup>, uma vez que avalia a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular<sup>25-28</sup>. Os estudos que aplicaram essa técnica em mucosa bucal clinicamente saudável observaram um aumento da atividade proliferativa em indivíduos expostos a esses carcinógenos. No entanto, o significado desse aumento a longo prazo permanece incerto, uma vez que não há na literatura relatos de estudos de acompanhamento desses indivíduos.

As alterações malignas na mucosa bucal ocorrem a partir do acúmulo de mutações em genes reguladores do crescimento e a diferenciação celular, resultando usualmente no aumento da atividade proliferativa, que pode tornar as células epiteliais mais suscetíveis a danos<sup>12,13</sup>. Sendo assim, ressalta-se a importância do acompanhamento de indivíduos expostos à ação cumulativa dos carcinógenos presentes no fumo e no álcool. Contudo, não há um método estabelecido para o rastreamento de alterações celulares nesses indivíduos que possibilite um diagnóstico precoce<sup>14</sup>.

A avaliação longitudinal das variações da atividade proliferativa induzidas pelo fumo e pelo álcool sobre a mucosa bucal pode ser útil para o acompanhamento de indivíduos expostos a esses carcinógenos e para prevenção do câncer de boca. Estudos prospectivos acompanhando as variações nos valores médios e percentuais das AgNORs e sua relação com o desenvolvimento de alterações clínicas perceptíveis na mucosa bucal são necessários para comprovação da efetividade dessa indicação<sup>6,7</sup>. A verificação dessas variações pode ser importante para o estabelecimento de marcadores que identifiquem risco para o desenvolvimento do câncer de boca e que possam ser utilizados em âmbito individual ou populacional.

O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de proliferação celular em mucosa clinicamente normal de indivíduos expostos ao fumo e ao álcool, por meio da citopatologia associada à técnica de AgNOR, em um período de 24 meses.

## **METODOLOGIA**

Este estudo apresenta um delineamento longitudinal, observacional, analítico, clínico, controlado.

A amostra foi constituída por indivíduos selecionados no serviço de saúde do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Porto Alegre (DMAE) e no serviço de Triagem da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período compreendido entre os meses de abril de 2002 e abril de 2003, quando foi realizada a primeira coleta de amostras<sup>7</sup>. A segunda coleta foi realizada decorrido um período mínimo de 24 meses após a primeira.

Para serem incluídos na amostra, os indivíduos deveriam ser do sexo masculino, ter idade acima dos 30 anos, não apresentar lesão bucal clinicamente detectável, apresentar boa saúde geral e ausência de história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas, possuírem o hábito de ingerir bebida alcoólica ou não, possuírem o hábito de fumar ou não.

Os indivíduos foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com os seguintes critérios:

- Grupo I (controle): constituído por pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que ingeriam em média menos de 1 copo de bebida alcoólica por dia;
- Grupo II (fumo): constituído por pacientes que fumavam mais de 10 cigarros com filtro por dia por mais de 10 anos<sup>6</sup>;

- Grupo III (fumo e álcool): constituído por pacientes que fumavam, no mínimo, 20 cigarros com filtro por dia, por, no mínimo, 1 ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos e que ingeriam média menos de 1 copo, e que ingeriam em média 1 copo de bebida alcoólica por dia, por, no mínimo 1 ano, independente do tipo.

No momento da segunda coleta de amostras, os pacientes responderam a um questionário, idêntico ao realizado na primeira análise, para que fossem identificadas modificações com relação aos hábitos relacionados à exposição aos carcinógenos.

O número de indivíduos em cada grupo foi obtido a partir da realização de um cálculo amostral, com base no estudo de Cançado, Sant’Ana Filho e Yurgel (2001). A amostra inicial foi composta por 60 indivíduos, que foram avaliados no estudo inicial<sup>7</sup>. Desses 60, foram reavaliados 52 indivíduos. Os indivíduos foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo I (controle): 17 indivíduos na avaliação inicial e 15 indivíduos na longitudinal;
- Grupo II (fumo): 25 indivíduos, na avaliação inicial e 23 indivíduos na longitudinal;
- Grupo III (fumo e álcool): 18 indivíduos, na avaliação inicial e 14 indivíduos na longitudinal.

As amostras foram coletadas utilizando-se o mesmo método da primeira análise<sup>7</sup>. Previamente à coleta das mesmas, os indivíduos portadores de próteses totais ou removíveis foram instruídos a removê-las.

As amostras foram coletadas dos 3 sítios anatômicos de maior prevalência de câncer de boca: vermelhão do lábio inferior, borda da língua e assoalho bucal. Foi realizado um esfregaço de cada sítio anatômico em cada indivíduo, no lado direito. Para coleta do material e realização do esfregaço foi utilizado uma escova cytobrush®, previamente esterilizada em autoclave. Em seguida, o material coletado foi distendido sobre uma lâmina de vidro, previamente limpa com detergente, álcool absoluto e esterilizada em autoclave. As lâminas foram acondicionadas em frascos plásticos porta-lâminas e fixadas em álcool absoluto, sendo

um pote para cada indivíduo. As lâminas foram coradas pela técnica de AgNOR (figura 1), de acordo com o protocolo descrito por Ploton et al.<sup>16</sup> (1986) e submetidas à avaliação quantitativa, a partir da contagem dos pontos de AgNOR, segundo os critérios estabelecidos por Crocker, Boldy e Egan<sup>17</sup> (1989). Foram calculados a média dos pontos de AgNORs por núcleo, a média da área dos pontos de AgNORs por núcleo e o percentual de núcleos com mais de 3 e com mais de 5 pontos de AgNORs. Foram analisadas as 50 primeiras células bem distendidas e não sobrepostas, no sentido horizontal, da esquerda para a direita de cada lâmina. Foi realizada a captura da imagem dessas 50 células, em um aumento de 1000X sob imersão, a partir da identificação inicial em um microscópio Olympus Optical Co. (modelo CH30RF100), e feita a transmissão desta imagem via vídeo-câmera para um computador da marca UNISYS® (modelo Aquanta DX), com monitor de vídeo TCÊ 17". O software utilizado para captura da imagem foi o Microsoft VidCap 32 (Microsoft Corp. – USA) e a vídeo-câmera utilizada, da marca JVC, modelo TK-C620 (1 CCD, Victor Co., Tokyo, Japão), apresentando as seguintes especificações: tipo- vídeo-câmera colorida; sistema de sinal- NTSc standard; tamanho da imagem- 1/3 polegadas; resolução- 470Tv linhas-horizontais; número de pixels- 380,000 (771(H)x 492 (V)); sensor de imagem- CCD. A imagem foi digitalizada com uma alta qualidade de vídeo, padrão RGB (16,7 milhões de cores), tamanho 440x330 pixels e formato bpm. A partir desta imagem digitalizada, foram realizadas a contagem e a mensuração da área das AgNORs utilizando-se o software IMAGELAB® (Sistema de Processamento e Análise de Imagens, Softium Sistemas de Informática, São Paulo, Brasil), versão 2.3, e a ferramenta RGB. Os valores de área foram convertidos para micrometros (1micrometro=8.7 pixels).

As lâminas foram identificadas numericamente, evitando que o examinador soubesse a que indivíduo ou a que sítio anatômico a mesma pertencia no momento que estava realizando a análise.

Antes da análise das lâminas, foi realizada uma calibragem ( $\kappa$  0,89) com o mesmo examinador que fez a primeira análise<sup>7</sup>, utilizando-se 2 lâminas. Foi efetuada, ainda, uma calibragem intra-examinador durante a análise das lâminas. A cada 20 lâminas, uma foi aleatoriamente selecionada para nova análise ( $\kappa$  0,8-0,91).

Para a avaliação longitudinal das variáveis quantitativas contagem dos pontos de AgNOR por núcleo, mensuração de área dos pontos de AgNOR por núcleo e percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs foi aplicado o teste *t- student* para amostras pareadas, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 06/04), estando de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa.

Todos os pacientes que participaram deste estudo foram informados verbalmente e por escrito a respeito da natureza do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Informado.

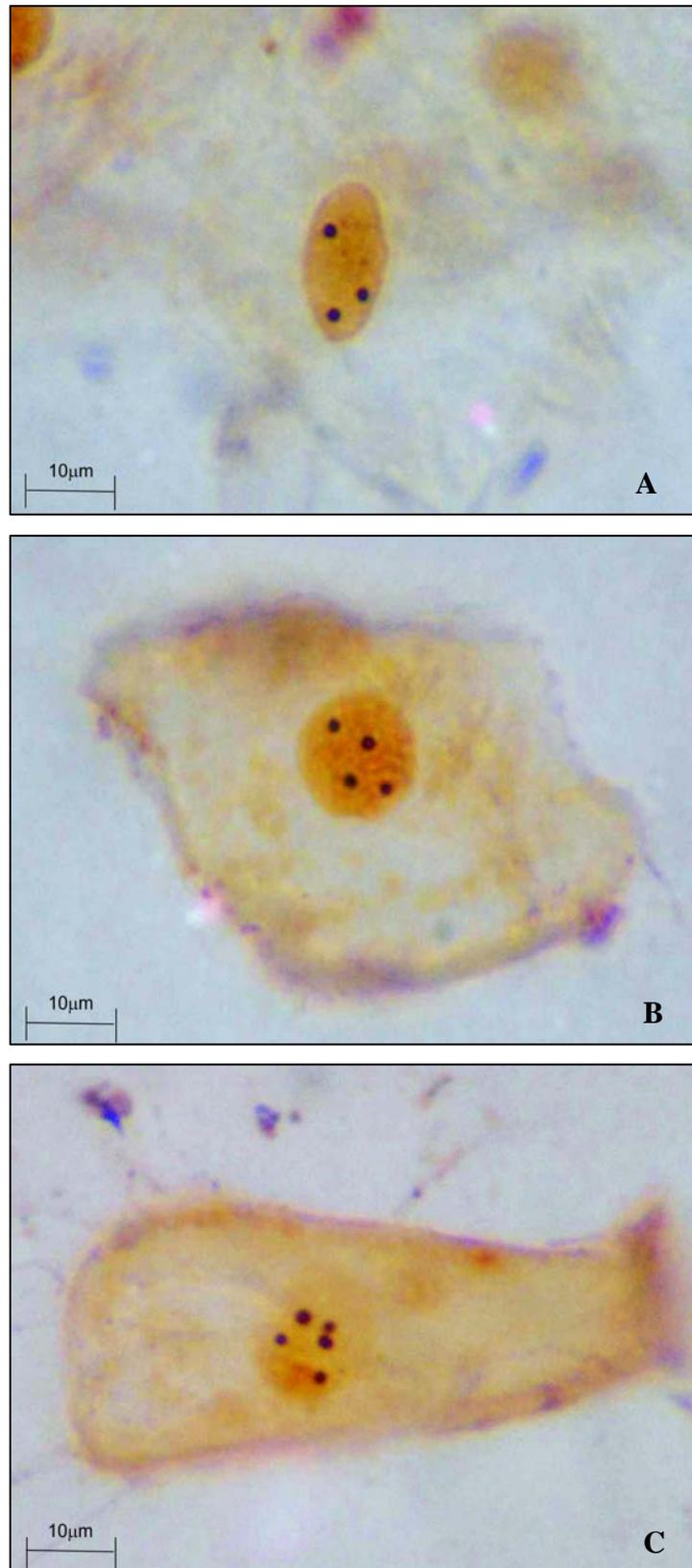


Figura 1: Aspecto dos pontos de AgNOR em células epiteliais da mucosa do assoalho bucal de indivíduo fumante e etilista. Núcleo com 3 pontos de AgNOR (A), núcleo com 4 pontos de AgNOR (B) e núcleo com 5 pontos de AgNOR (C). Aumento original 1000x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS.

## RESULTADOS

Dos 60 indivíduos avaliados inicialmente, 52 foram reavaliados, resultando em um percentual de retorno de 86,7%. Dos 8 indivíduos que não participaram da avaliação longitudinal, 2 faleceram, 2 mudaram de cidade, 2 não foram localizados e 2 passaram a apresentar problemas de saúde e, portanto, foram excluídos do estudo.

Dos pacientes reavaliados, 3 foram excluídos da análise estatística por terem mudado os seus hábitos. No grupo fumo, um indivíduo suspendeu o hábito de fumar e foi observada uma diminuição dos valores de todas as variáveis analisadas. Neste indivíduo, foi avaliada a mucosa do lábio inferior (quadro I). No grupo fumo/álcool, dois indivíduos suspenderam o hábito de ingerir bebida alcoólica e foi observado um aumento dos valores na maioria das variáveis analisadas. Em um dos indivíduos foi avaliada a mucosa do lábio inferior, da borda da língua e do assoalho bucal (quadro II). No outro indivíduo que suspendeu o hábito de ingerir bebida alcoólica, foi avaliada a mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal (quadro II).

Quadro I – Comparação entre os valores inicial e final das variáveis média do número, média da área de AgNORs e percentual de núcleos com mais de 3 mais de 5 pontos de AgNORs no indivíduo que suspendeu o hábito de fumar.

	Sítio anatômico - Inicial/Final
	Lábio inferior
Número de AgNORs	3,91/3,36
Área de AgNORs	3,73/3,54
% mais de 3 AgNORs	70%/40%
% mais de 5 AgNORs	5%/0%

Quadro II – Comparação entre os valores inicial e final das variáveis média do número, média da área de AgNORs e percentual de núcleos com mais de 3 mais de 5 pontos de AgNORs nos indivíduos que suspenderam o hábito de ingerir bebida alcoólica.

<b>Indivíduo I</b>	Sítio anatômico - Inicial/Final		
	Lábio inferior	Borda da língua	Assoalho da boca
Número de AgNORs	3,44/3,75	3,18/3,5	3,1/3,38
Área de AgNORs	2,81/3,32	2,48/3,69	3,04/3,23
% mais de 3 AgNORs	34%/44%	36%/60%	26%/40%
% mais de 5 AgNORs	4%/4%	4%/0%	4%/0%
<b>Indivíduo II</b>			
Número de AgNORs	3,24/3,44		3,14/3,22
Área de AgNORs	3,07/3,22		4,12/3,92
% mais de 3 AgNORs	42%/44%		20%/32%
% mais de 5 AgNORs	12%/4%		8%/0%

A média de idade dos indivíduos no grupo controle foi de  $46,6 \pm 8,9$  anos; no grupo fumo foi de  $45,1 \pm 6,9$  anos e no grupo fumo/álcool foi de  $47,8 \pm 7,9$  anos.

Com relação ao grupo controle (tabela I), no lábio inferior foram reavaliados 10 indivíduos e foi observada uma diminuição estatisticamente significativa para o percentual de núcleos com mais de 5 pontos de AgNORs ( $p=0,01$ ). Na borda da língua, foram reavaliados 13 indivíduos e foi observado um aumento estatisticamente significativo nos valores de média da área dos pontos de AgNORs por núcleo ( $p=0,02$ ). No assoalho bucal foram reavaliados 12 indivíduos e não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das variáveis analisadas.

No grupo fumo (tabela II), no lábio inferior, foram reavaliados 15 indivíduos, na borda da língua, 20 indivíduos e no assoalho bucal, 17. Neste grupo, foi verificado um aumento estatisticamente significativo para as variáveis média do número e média da área dos pontos de AgNORs por núcleo tanto no lábio inferior ( $p=0,01$  e  $p=0,02$ , respectivamente) quanto na borda da língua ( $p=0,01$  para ambas as variáveis). No assoalho bucal, houve aumento para os valores de média do número dos pontos de AgNORs por núcleo ( $p=0,02$ ).

No grupo fumo/álcool (tabela III) foram reavaliados 7 indivíduos no lábio inferior, na borda da língua, 9 indivíduos e no assoalho bucal, 12 indivíduos. Neste grupo, houve um aumento da média do número dos pontos de AgNORs por núcleo nos três sítios anatômicos analisados, lábio inferior ( $p=0,01$ ), borda da língua ( $p=0,01$ ) e assoalho bucal ( $p=0,04$ ). No lábio inferior e na borda da língua houve ainda aumento da média da área dos pontos de AgNORs por núcleo ( $p=0,03$  e  $p=0,02$ , respectivamente).

Os valores percentuais de núcleos com mais de 3 pontos de AgNORs aumentaram em todos os sítios anatômicos nos grupos fumo e fumo/álcool (tabelas II e III). No entanto esse aumento foi estatisticamente significativo na borda da língua do grupo fumo ( $p=0,01$ ) e no lábio inferior no grupo fumo/álcool ( $p=0,02$ ).

Os valores percentuais de núcleos com mais de 5 pontos de AgNORs não mostraram diferenças estatisticamente significativas tanto no grupo fumo quanto no grupo fumo/álcool (tabelas II e III).

A média do número dos pontos de AgNORs por núcleo apresentou um aumento estatisticamente significativo em todos os sítios anatômicos nos grupos fumo e fumo/álcool (tabelas II e III).

Tabela I. Comparação entre os períodos de tempo no grupo controle para as variáveis média do número, média da área dos pontos de AgNORs por núcleo e percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs no lábio inferior, borda da língua e assoalho bucal, Porto Alegre, 2005.

Sítio anatômico	n	Média	Desvio-padrão	Diferença Média*	p
<b>Lábio inferior</b>					
Número de AgNORs inicial	10	3,22	0,66	-0,12	0,56
Número de AgNORs final	10	3,34	0,33		
Área de AgNORs inicial	10	2,65	0,68	-0,12	0,59
Área de AgNORs final	10	2,76	0,48		
Mais de 3 AgNOR inicial	10	40,00	19,04	1,60	0,81
Mais de 3 AgNOR final	10	38,40	9,77		
Mais de 5 AgNOR inicial	10	6,60	5,74	4,40	0,01
Mais de 5 AgNOR final	10	2,20	3,82		
<b>Borda da língua</b>					
Número de AgNORs inicial	13	2,34	0,48	-0,29	0,05
Número de AgNORs final	13	2,62	0,40		
Área de AgNORs inicial	13	1,86	0,53	-0,28	0,02
Área de AgNORs final	13	2,14	0,41		
Mais de 3 AgNOR inicial	13	20,46	20,45	1,85	0,83
Mais de 3 AgNOR final	13	18,62	16,11		
Mais de 5 AgNOR inicial	13	1,50	1,73	1,08	0,11
Mais de 5 AgNOR final	13	0,42	1,00		
<b>Assoalho bucal</b>					
Número de AgNORs inicial	12	2,92	0,60	-0,08	0,63
Número de AgNORs final	12	2,99	0,38		
Área de AgNORs inicial	12	2,25	0,66	-0,21	0,31
Área de AgNORs final	12	2,47	0,48		
Mais de 3 AgNOR inicial	12	34,17	16,19	7,83	0,20
Mais de 3 AgNOR final	12	26,33	21,52		
Mais de 5 AgNOR inicial	12	2,50	2,28	1,83	0,06
Mais de 5 AgNOR final	12	0,67	1,78		

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

Nota: \*Diferença = (inicial – final).

Tabela II. Comparação entre os períodos de tempo no grupo fumo para as variáveis média do número, média da área dos pontos de AgNORs por núcleo e percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs no lábio inferior, borda da língua e assoalho bucal, Porto Alegre, 2005.

Sítio anatômico	n	Média	Desvio-padrão	Diferença Média*	P
<b>Lábio inferior</b>					
Número de AgNORs inicial	15	3,34	0,61	-0,52	0,01
Número de AgNORs final	15	3,86	0,54		
Área de AgNORs inicial	15	3,35	0,69	-0,46	0,02
Área de AgNORs final	15	3,80	0,60		
Mais de 3 AgNOR inicial	15	44,93	19,14	-1,47	0,82
Mais de 3 AgNOR final	15	46,40	16,92		
Mais de 5 AgNOR inicial	15	5,07	5,06	-4,80	0,06
Mais de 5 AgNOR final	15	9,87	7,69		
<b>Borda da língua</b>					
Número de AgNORs inicial	20	2,83	0,51	-0,57	0,01
Número de AgNORs final	20	3,39	0,52		
Área de AgNORs inicial	20	2,53	0,67	-0,60	0,01
Área de AgNORs final	20	3,14	0,65		
Mais de 3 AgNOR inicial	20	26,20	13,76	-12,20	0,01
Mais de 3 AgNOR final	20	38,40	15,16		
Mais de 5 AgNOR inicial	20	2,70	4,60	-2,15	0,07
Mais de 5 AgNOR final	20	4,85	4,72		
<b>Assoalho bucal</b>					
Número de AgNORs inicial	17	3,49	0,60	-0,39	0,02
Número de AgNORs final	17	3,88	0,46		
Área de AgNORs inicial	17	3,49	1,00	-0,27	0,28
Área de AgNORs final	17	3,76	0,78		
Mais de 3 AgNOR inicial	17	43,29	19,43	-6,82	0,21
Mais de 3 AgNOR final	17	50,12	14,34		
Mais de 5 AgNOR inicial	17	7,18	6,41	-2,59	0,25
Mais de 5 AgNOR final	17	9,76	7,09		

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

Nota: \*Diferença = (inicial – final).

Tabela III. Comparação entre os períodos de tempo no grupo fumo/álcool para as variáveis média do número, média da área dos pontos de AgNORs por núcleo e percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs no lábio inferior, borda da língua e assoalho bucal, Porto Alegre, 2005.

Sítio anatômico	n	Média	Desvio-padrão	Diferença Média*	P
<b>Lábio inferior</b>					
Número de AgNORs inicial	7	3,22	0,26	-0,94	0,01
Número de AgNORs final	7	4,16	0,32		
Área de AgNORs inicial	7	3,25	0,57	-1,16	0,03
Área de AgNORs final	7	4,41	0,99		
Mais de 3 AgNOR inicial	7	38,71	8,99	-16,86	0,02
Mais de 3 AgNOR final	7	55,57	11,94		
Mais de 5 AgNOR inicial	7	4,71	2,50	-6,43	0,11
Mais de 5 AgNOR final	7	11,14	10,25		
<b>Borda da língua</b>					
Número de AgNORs inicial	9	2,82	0,51	-0,70	0,01
Número de AgNORs final	9	3,52	0,49		
Área de AgNORs inicial	9	3,05	0,86	-1,10	0,02
Área de AgNORs final	9	4,15	1,04		
Mais de 3 AgNOR inicial	9	26,00	11,40	-11,33	0,07
Mais de 3 AgNOR final	9	37,33	13,11		
Mais de 5 AgNOR inicial	9	3,11	3,33	-3,33	0,40
Mais de 5 AgNOR final	9	6,44	9,99		
<b>Assoalho bucal</b>					
Número de AgNORs inicial	12	3,60	0,67	-0,31	0,04
Número de AgNORs final	12	3,91	0,40		
Área de AgNORs inicial	12	4,05	1,37	-0,89	0,06
Área de AgNORs final	12	4,95	1,01		
Mais de 3 AgNOR inicial	12	49,00	18,40	-3,00	0,59
Mais de 3 AgNOR final	12	52,00	8,12		
Mais de 5 AgNOR inicial	12	9,00	7,84	1,33	0,62
Mais de 5 AgNOR final	12	7,67	4,79		

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

Nota: \*Diferença = (inicial – final).

## DISCUSSÃO

A amostra selecionada para esta avaliação longitudinal foi constituída de indivíduos considerados como grupo de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, devido a sua faixa etária e à exposição aos carcinógenos do tabaco e do álcool<sup>1-5</sup>. Com intuito de verificar a ação sinérgica desses fatores, foram analisados indivíduos expostos unicamente ao tabaco e ao tabaco e ao álcool concomitantemente. A ação dos carcinógenos na mucosa bucal é cumulativa<sup>1,18</sup> e foi avaliada nos sítios anatômicos mais acometidos pelo câncer de boca, o lábio inferior, a borda da língua e o assoalho bucal<sup>2,4,19,20</sup>.

De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer<sup>21</sup> (2005), o número de casos de câncer de boca e a mortalidade em consequência da doença vêm aumentando a cada ano<sup>21</sup>. A implantação de programas preventivos e de diagnóstico precoce desempenha papel importante na busca da redução destes números. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de metodologias que busquem o aprimoramento desta forma de diagnóstico. Alguns estudos sugerem a realização de exames clínicos periódicos em indivíduos expostos aos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, pela sua facilidade de realização e pelo seu baixo custo<sup>22,23</sup>. No entanto, esse tipo de rastreamento não é efetivo, pois permite verificar alterações clínicas. A observação de alterações sub-clínicas, através de marcadores efetivos para o monitoramento desses indivíduos ainda não foi estabelecida<sup>14</sup>, bem como o intervalo de tempo entre os exames.

A detecção de alterações celulares pode representar uma chance de reduzir o risco de desenvolvimento da lesão a partir da intervenção nos hábitos de risco. Com o intuito de viabilizar a detecção dessas alterações em nível celular, são importantes estudos longitudinais em grupos de risco para o desenvolvimento do câncer de boca. Este estudo avaliou as alterações celulares a partir da análise das variações na atividade proliferativa em um intervalo de até 24 meses na mucosa bucal de indivíduos expostos ao fumo e álcool. Os dados

obtidos no estudo de Paiva et al.<sup>7</sup> (2004) foram utilizados como referência inicial para a avaliação longitudinal. Para tal, aplicou-se a mesma metodologia para obtenção e avaliação das alterações celulares, estabelecendo-se uma calibragem adequada entre os examinadores nas duas fases do estudo e garantindo a sua validade interna.

A citopatologia, por ser um método de exame não invasivo, tem sido utilizada em populações expostas a carcinógenos<sup>7,8,24</sup> e sua associação com a técnica de AgNOR aumenta a acurácia dos estudos, uma vez que permite a verificação da velocidade com que as células percorrem o ciclo celular<sup>25-28</sup>. A utilização da técnica de AgNOR em citopatologia pode representar uma metodologia clínica efetiva para a avaliação de alterações celulares em mucosa bucal exposta a carcinógenos. Os estudos com delineamento transversal que utilizaram esta observaram um aumento da atividade proliferativa<sup>6,7,9-11</sup>. No entanto, o significado desse aumento a longo prazo permanecia desconhecido, uma vez que não havia na literatura consultada relatos de estudos longitudinais. Foram utilizados como parâmetros de avaliação das AgNORs a média do número de pontos, por ser o método mais aplicado em citopatologia<sup>6,7,9-11</sup>, a média da área dos pontos, por ser considerado um método mais preciso<sup>29</sup> e o percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos, com intuito de evitar que fosse subestimada a presença de células com alta velocidade de proliferação<sup>30</sup>.

Sudbo et al.<sup>31</sup> (2005) avaliaram as variações na ploidia celular em fumantes e interferiram no hábito de fumar dos indivíduos. Os autores observaram variações na ploidia celular daqueles indivíduos que suspenderam o hábito, 2 dos 4 indivíduos com conteúdo de DNA tetraplóide e 11 dos 19 aneuplóides passaram a apresentar conteúdo de DNA diplóide (normal) depois que suspenderam o hábito de fumar. Os autores sugerem, ainda, a determinação de marcadores de risco na mucosa clinicamente saudável de fumantes, o que permitiria a intervenção precoce, podendo possibilitar uma reversão das alterações citogenéticas e do risco de desenvolvimento de malignidade. Durante a realização

do presente estudo, 3 indivíduos abandonaram os hábitos de risco para o desenvolvimento do câncer de boca. No grupo dos fumantes, 1 indivíduo suspendeu o hábito de fumar e verificou-se uma diminuição nos valores de todas as variáveis analisadas pela técnica de AgNOR (quadro I). No grupo dos fumantes e etilistas, 2 indivíduos suspenderam o hábito de ingerir bebida alcoólica, e foi observado aumento dos valores da maioria das variáveis analisadas (quadro II). Esses dados sugerem que o indivíduo etilista nos meses iniciais de suspensão do consumo de álcool compensaria essa ausência pelo aumento do consumo de cigarro. Estes achados apontam para a possibilidade do uso deste tipo de exame periódico como um modelo de monitoramento individual frente à ação dos fatores de risco. Sendo assim, sugerem-se mais estudos avaliando individualmente as variações da atividade proliferativa frente a essa mudança de hábito de risco.

No presente estudo, utilizou-se a técnica de AgNOR devido a possibilidade de se verificar alterações na velocidade de proliferação celular ao longo do tempo, uma vez que células que proliferam com maior velocidade estão mais susceptíveis a mutações e, conseqüentemente, ao desenvolvimento dos mecanismos que levam ao câncer<sup>13</sup>. O intervalo de até 24 meses estabelecido entre o exame inicial e o segundo exame permitiu a observação de alterações estatisticamente significativas nos valores de média dos pontos de AgNORs por núcleo naqueles indivíduos que permaneceram com os hábitos de risco. Outros estudos que avaliem o comportamento celular em intervalos de tempo diferentes poderão estabelecer uma melhor padronização destas rotinas na busca de modelos de prevenção do câncer de boca. Sudbo et al.<sup>31</sup> (2004) também realizaram um estudo longitudinal que acompanhou indivíduos fumantes no período de 24 meses, avaliando a ploidia celular. A técnica de AgNOR, por meio da quantificação da variação da média do número de pontos de AgNORs por núcleo é mais barata e de mais fácil execução.

No grupo controle não foi observada variação estatisticamente significativa dos valores dos parâmetros analisados. A exceção foi a quantificação da área da AgNORs na borda da língua (tabela I). Essa variação pode ser justificada pela suscetibilidade maior da borda da língua a ação de outros fatores irritantes não controlados neste estudo. Além disso, sabe-se que a mucosa da língua apresenta uma taxa de proliferação celular maior quando comparada com outros sítios anatômicos<sup>32</sup>.

No grupo fumo foi verificado aumento dos valores de todas as variáveis analisadas nos três sítios anatômicos. O maior aumento para as variáveis média do número e média da área dos pontos de AgNORs ocorreu na borda da língua, seguida do lábio inferior e do assoalho bucal (tabela II), respectivamente. Os estudos transversais de citopatologia que avaliaram a atividade proliferativa em diferentes sítios anatômicos observaram resultados contraditórios. Cançado, Sant'Ana Filho e Yurguel<sup>6</sup> (2001) verificaram uma média maior de pontos de AgNORs por núcleo na mucosa não ceratinizada do assoalho bucal quando comparada com a mucosa não ceratinizada da borda da língua. Por outro lado, Paiva et al.<sup>7</sup> (2004), constataram que a atividade de proliferação celular comportou-se de maneira semelhante na mucosa ceratinizada e na mucosa não ceratinizada, tanto em indivíduos expostos quanto naqueles não expostos aos carcinógenos do fumo. A partir dos achados do presente estudo, sugere-se que a mucosa da borda da língua parece estar mais suscetível ao aumento da proliferação celular quando é avaliado o efeito do fumo ao longo do tempo. Esse sítio anatômico é o de preferência para o desenvolvimento do câncer de boca e representa maior risco quando o indivíduo é fumante. Com relação ao percentual de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs, houve uma grande variabilidade entre os indivíduos avaliados, evidenciada pelos valores de desvio padrão, sendo verificada uma tendência ao aumento desses valores (tabela II). Esse aumento foi significativo apenas para o percentual de núcleos com mais de 3 pontos de AgNORs na borda da língua.

O grupo fumo/álcool apresentou aumento para todas as variáveis analisadas, com exceção do percentual de núcleos com mais de 5 pontos de AgNORs. Esse aumento foi maior no lábio inferior, seguido da borda da língua e do assoalho bucal (tabela III), respectivamente. Esse fato pode ser explicado pela ação de outros fatores no lábio inferior que alteram a atividade proliferativa e que não foram analisados neste estudo, como por exemplo a radiação solar ou o contato físico do calor liberado por bebidas quentes como o chimarrão, chá ou café. Neste grupo, houve um aumento ainda maior da taxa de proliferação celular quando comparado com o grupo fumo, comprovando a ação sinérgica do fumo e do álcool na variação da taxa de proliferação celular. Os valores percentuais de núcleos com mais de 3 e mais de 5 pontos de AgNORs aumentaram nos três sítios anatômicos analisados neste grupo, exceto o percentual de núcleos com mais de 5 pontos de AgNORs no assoalho bucal. Entretanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo em consequência do alto desvio padrão entre os indivíduos analisados. Pode-se sugerir que a variabilidade demonstrada pelos resultados obtidos nos desvios padrão representa o reflexo da condição individual, em que cada indivíduo exposto responde de maneira própria com maior ou menor sensibilidade a ocorrência de danos celulares causados pela exposição aos carcinógenos.

Foi observado um aumento nos valores de média do número dos pontos de AgNOR por núcleo nos três sítios anatômicos analisados nos grupos fumo e fumo/álcool (tabelas II e III). Com relação à média da área dos pontos de AgNORs por núcleo foi verificado aumento na borda da língua do grupo controle (tabela I) e no lábio inferior e na borda da língua de fumantes e fumantes/etilistas (tabelas II e III). No assoalho bucal, foi verificado um aumento nesta taxa, porém, sem significância estatística. Esses dados sugerem que para realização de estudos de acompanhamento de indivíduos expostos aos carcinógenos do fumo e do álcool é suficiente a verificação da média do número dos pontos de AgNORs por núcleo. Esse método é de execução mais simples, necessita de menos tempo e não exige a utilização de

equipamento de processamento e análise de imagens quando comparado com a mensuração da área, o que o torna eficaz para a utilização em âmbito populacional. Essa afirmação concorda com Paiva et al.<sup>7</sup> (2004), que observaram que a avaliação da média da área não foi mais sensível que a média do número dos pontos de AgNORs por núcleo em fumantes e fumantes/etilistas em citopatologia.

A partir das médias das variáveis analisadas nos grupo fumo e fumo/álcool, verificou-se um aumento da atividade proliferativa. No entanto, quando são analisados os indivíduos isoladamente, nota-se que, em alguns casos, não foi verificado esse aumento. Esse fato pode estar relacionado com a suscetibilidade individual frente à ação dos carcinógenos. Dessa forma, pode-se sugerir que a técnica de AgNOR tem aplicabilidade para o monitoramento individual para o desenvolvimento do câncer de boca e pode ser utilizada como ferramenta de rotina em indivíduos expostos a carcinógenos. A verificação individual do aumento da atividade proliferativa pode ter papel importante na decisão do indivíduo em abandonar os hábitos de risco e, dessa forma, reduzir o risco de desenvolvimento da lesão, uma vez que a eliminação do carcinógeno pode resultar em uma diminuição da velocidade de proliferação celular. Contudo, são necessários mais estudos para comprovar a efetividade desta indicação.

Não foi verificada alteração clinicamente detectável na mucosa bucal dos indivíduos pesquisados, e, por esse motivo, não foi possível estabelecer relação entre o aumento da velocidade de proliferação celular e o aparecimento de alterações clínicas. Ao contrário, Sudbo et al.<sup>31</sup> (2005), em um mesmo período de acompanhamento constataram que um indivíduo desenvolveu câncer de boca, possivelmente em decorrência do tamanho da amostra de seu estudo.

A partir dos achados do presente estudo, sugere-se que a citopatologia associada à técnica de AgNOR representa um método de monitoramento individual com aplicabilidade

clínica imediata como forma de avaliar o risco de desenvolvimento de câncer bucal. Mais estudos com tempo de acompanhamento maior ou que controlem a exposição aos carcinógenos bucais ou mesmo pela introdução de terapêuticas para corrigir a velocidade de proliferação celular em breve também poderão ser testadas com a metodologia empregada neste estudo.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior). As escovas cytobrush® foram doadas pela empresa Kolplast ci Ltda.

## REFERENCIAS

1. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr: Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. **Cancer Res** 1988;48: 3282-3287
2. Llewellyn J, Mitchell R: Smoking, Alcohol and Oral Cancer in South East Scotland: a 10 Year Experience. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1994;32:146-152
3. Wight AJ, Ogden GR: Possible Mechanisms by which Alcohol May Influence the Development of Oral Cancer – a Review. **Oral Oncol** 1998;34:441-447
4. Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, Dokianakis G, Segas J, Lefantzis D, Nomikos P, Wang YF, Diehl SR: Smoking and Alcohol in the Etiology of Oral Cancer: Gender-Specific Risk Profiles in the South of Greece. **Oral Oncol** 2001;37:28-35
5. Polednak AP: Recent Trends in Incidence Rates for Selected Alcohol-Related Cancers in the United States. **Alcohol & Alcoholism** 2005;40:234-238
6. Cançado RP, Filho MS, Yurguel LS: Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. **Oral Oncol** 2001; 37:446-454
7. Paiva RL, Filho MS, Bohrer PL, da Silva IS, Rados PV: AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol A Cytopathologic Study. **Anal Quant Cytol and Hystol** 2004;26:175-180

8. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV: Assessment of Micronucleus Frequency in Normal Oral Mucosa of Patients Exposed to Carcinogens. *Acta Cytol* 2005; 49:265-272
9. Sampaio HC, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA: AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Acta Cytol* 1999;43:117-120
10. Soares Pinto TA, Filho MS, Rados PV: Avaliação Quantitativa de Núcleo/Citoplasma e AgNORs em Células da Mucosa Bucal de Fumantes e Não-Fumantes. *Rev Fac Odontol* 2003;44:17-21
11. Orellana- Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez ME, Lobos-James-Freyre, N, Ortega-Pinto AV: Evaluation of Keratinization and AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Oral Mucosa from Smokers and Non-Smokers. *Med Oral* 2004;9:197-203
12. Girod SC, Pfeiffer P, RIES J, PAPE HD: Proliferative Activity and Loss of Function of Tumor Suppressor Genes as Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Benign and Preneoplastic Oral Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36:252-260
13. Oijen MGCT, Gilsing MMA, Rijksen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ.: Increased Number of Proliferating Cells in Oral Epithelium from Smokers and Ex-Smokers. *Oral Oncol* 1998;34:297-303
14. Kujan O, Glenny, AM, Duxbury J, Thakker N, Sloan P: Evaluation of Screening Strategies for Improving Oral Cancer Mortality: A Cochrane Systematic Review. *J Dent Educ* 2005;69:255-265
15. Ogden GR, Cowpe JG, Green NW: Quantitative Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa: Effect of Smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-55
16. Ploton D, Menager P, Jeannesson P, Humber G, Pigeon F, Adnett JJ: Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Region of the Optical Level. *Histochem J* 1986;18:5-14
17. Crocker J, Boldy DAR, Egan M: How Should We Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. *J Pathol* 1989;158:185-188
18. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, Garfinkel L: Tobacco Smoking, Alcohol Drinking and Cancer of the Oral Cavity and Oropharynx Among U.S. Veterans. *Cancer* 1993;72:1369-1375
19. Krolls SO, Hoffman S: Squamous Cell Carcinoma of the Oral Soft Tissues: a Statistical Analysis of 14,253 Cases by Age, Sex and Race of Patients. *J Am Dent Assoc* 1976; 92:571-574.
20. Hindle I, Downer MC, Speight PM: The Epidemiology of Oral Cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:471-476

21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil: 2003**. Disponível em: <http://inca.org.br/epidemiologia/estimativa2003/> Acesso em 23/07/2005.
22. Rodrigues, VC, Moss SM, Tuomainen H: Oral Cancer in the UK: To Screen or Not To Screen? **Oral Oncol** 1998;34:454-465
23. Nagao T, Warnakulasuriya S: Annual Screening for Oral Cancer Detection. **Cancer Detect Prev** 2003;27:333-337
24. Sugerman PB, Savage NW: Exfoliative Cytology in Clinical Oral Pathology. **Aust Dent J** 1996;41:71-74
25. Derenzini M, Pession A, Trere D: Quantity of Nucleolar Silver Stained Proteins is Related to Proliferating Activity in Cancer Cells. **Lab Invest** 1990; 63:137-140
26. Derenzini, M, Ploton D: Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. **Int Rev Exp Pathol** 1991;32:149-192
27. Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P: Nucleolar Size Indicates The Rapidity Of Cell Proliferation In Cancer Tissues. **J Pathol** 2000;191:181-186
28. Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, Taffureli M, Trere D: The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the Prb and P53 Status. **J Clin Pathol** 2004;57:755-761
29. Trerè D. Agnor Staining and Quantification: **Micron** 2000;31:127–131
30. Xie X, Clause OP, Sudbo J, Boysen M.: Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia and Squamous Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer** 1997;79:2200-2208
31. Sudbo J, Samuelsson R, Risberg B, Heinstein S, Nyhus C, Samuelsson M, Puntervold R, Sigstad E, Davidson B, Reith A, Berner A: Risk Markers of Oral Cancer in Clinically Normal Mucosa As an Aid in Smoking Cessating Counseling. **J Clin Oncol** 2005;23:1927-1933
32. Liu SC, Klein-Szanto AJ.P: Markers of Proliferation in Normal and Leucoplakic Oral Epithelia. **Oral Oncol** 2000;36:145-151