

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

FRANCINE TROMMER MARTELLI

**ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE
NO LÓCUS 9p21 DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A
CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL**

PORTO ALEGRE,

2015

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

FRANCINE TROMMER MARTELLI

**ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE
NO LÓCUS 9p21 DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A
CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL**

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

PORTO ALEGRE, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Martelli, Francine Trommer
Análise da atividade proliferativa e da perda de heterozigossidade no locus 9p21 da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos com leucoplasias e com câncer bucal. / Francine Trommer Martelli. -- 2015.
59 f.

Orientadora: Fernanda Visioli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Câncer bucal. 2. Leucoplasia. 3. AgNOR. 4. Perda de heterozigossidade. 5. CDKN2A. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Há momentos em que as palavras tornam-se pequenas, traduzir o que estamos sentindo, foram dois anos de muita dedicação, aprendizado e adaptação. Nesse caminho nunca estive sozinha, levei comigo pessoas especiais e também conheci umas outras tantas.

Meu primeiro agradecimento é a Deus por ter me dado saúde, força e ter me acompanhado tornando essa jornada iluminada e colocado cada vez mais pessoas especiais no meu caminho.

Agradeço também:

Aos meus familiares, em especial minha mãe Rosi, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos da minha vida dando amor e um apoio insubstituível, a minha avó Vera que me proporciona além de muito carinho o apoio logístico do dia a dia, ao meu irmão Marcelo pela amizade e carinho e boas conversas, ao meu pai Jorge com suas palavras de incentivo e orgulho. Tia Dadi, Tia Maria Emília, Tio Honório. A minha companheira das tardes de estudo, minha cachorrinha Nina. Sem vocês nada seria possível, muito obrigada!

A uma pessoa muito especial o Rodrigo que entrou na minha vida no meio dessa jornada e me apoiou muito, sempre com seu companheirismo, carinho e compreensão. Obrigada por tudo, te amo.

A minha orientadora, Prof. Dra. Fernanda Visioli, por ser essa pessoa tão especial, pelos ensinamentos, experiências compartilhadas, pela amizade e compreensão.

Ao prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, por ter me recebido de portas abertas nessa Universidade e nesse serviço.

Às colegas, Vivi Palmeira, Bruna Jalfim e à aluna IC Stéphanie que trabalharam diretamente no meu projeto me auxiliando nas coletas e elaboração de algumas fases, formamos uma bela e coesa equipe. A ajuda de vocês foi essencial, meninas, sem palavras para agradecer a dedicação e o empenho com que executaram as tarefas.

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

Aos meus colegas do HMAPA, e em especial à minha chefe direta, Maj Kalaoun, pela confiança e incentivo.

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

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

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

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, q busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	08
1.1 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DO CÂNCER BUCAL.....	08
1.2 ETIOLOGIA.....	09
1.3 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS.....	10
1.4 CITOPATOLOGIA.....	13
1.5 PERDA DA HETEROZIGOSIDADE.....	15
1.5.1 LÓCUS 9p21.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
6. ANEXOS	56

MARTELLI, Francine Trommer. Análise da atividade proliferativa e da perda de heterozigosidade no locus 9p21 da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasias e com câncer bucal. 2015.59f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2015.

RESUMO

A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, apresentando alterações progressivas sobre o genoma celular. Portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna. Os principais fatores de risco para o câncer bucal são o consumo de álcool e tabaco. O desafio atual é a busca de biomarcadores que demonstrem essas alterações precocemente, para que possam ser identificados os indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Uma das primeiras alterações no processo de carcinogênese é o aumento da atividade proliferativa celular, geralmente causado por mutações nos genes que controlam o ciclo celular. O gene *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, é um gene comumente mutado nos cânceres humanos e codifica a proteína p16, que desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular na carcinogênese bucal, assim como avaliar a possibilidade de utilização da citopatologia bucal como ferramenta para coleta e análise de DNA. Para tal finalidade foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos que foram divididos nos seguintes grupos: controle (n=24), álcool-fumo (n=26), leucoplasia (n=13) e grupo carcinoma (n=14). A partir do raspado citológico foi confeccionada uma lâmina para impregnação por prata e análise de AgNOR. O restante das células foi utilizado para extração do DNA para amplificação por PCR e sequenciamento. Observamos que os parâmetros de AgNOR e a frequência de mutações no locus 9p21 foram maiores nos grupos expostos aos carcinógenos e com lesões em relação ao controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas. O DNA obtido mostrou-se satisfatório em relação à concentração e à pureza. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também maior velocidade de proliferação em relação aos pacientes sem mutações, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Concluímos que a citopatologia é um método útil para avaliação da atividade proliferativa e de mutações genéticas em pacientes com risco para transformação maligna em relação ao câncer bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal; Leucoplasia; AgNOR; Fumo; Álcool; Perda de Heterozigosidade; *CDKN2A*.

MARTELLI, Francine Trommer. Análise da atividade proliferativa e da perda de heterozigosidade no locus 9p21 da mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos, com leucoplasias e com câncer bucal.2015.59f. Dissertação (Mestrado).Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.Porto Alegre.2015.

ABSTRACT

The carcinogenesis in the oral cavity is a multistep process, with progressive changes on the cellular genome. Therefore, the development of cancer in the oral mucosa is often preceded by a potentially malignant lesion. The main risk factors for oral cancer are alcohol and tobacco intake. The current challenge is the search for biomarkers that demonstrate these early changes, so higher risk individuals to the development of oral cancer can be identified. One of the earliest changes in the carcinogenesis process is the enhancement of cell proliferative activity, usually caused by mutations in cell cycle control genes. The *CDKN2A* gene, located in the 9p21 locus, is a commonly mutated gene in human cancers and encodes the p16 protein, which plays a critical role in cell cycle regulation. The objective of this study was to evaluate the frequency of loss of heterozygosity in the 9p21 locus and the cell proliferative activity in oral carcinogenesis. Moreover, to assess the possibility of using oral cytology as a tool for collecting and analyzing DNA. For this purpose was held cytopathologic collection of patients who were divided into the following groups: control (n=24), alcohol-smoking (n=26), leukoplakia (n=13) and carcinoma group (n= 4). From the cytology brush was made a slide for silver impregnation and AgNOR analysis. The remaining cells were used for DNA extraction, followed by PCR amplification and sequencing. We observed that the AgNOR parameters and the frequency of 9p21 locus mutations were higher in the groups exposed to carcinogens and injuries in the control, however without statistically significant differences. The DNA obtained was satisfactory in respect of concentration and purity. The patients with mutation in 9p21 also showed increased speed proliferation compared to patients without mutations, although this difference was not statistically significant. We conclude that the cytopathology is a useful method to evaluate the proliferative activity and gene mutations in patients with risk for malignant transformation to oral cancer.

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

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 Incidência e prevalência do câncer bucal

Os tumores da cavidade bucal e de faringe, quando analisados em conjunto, ocupam a sexta posição entre as neoplasias malignas mais prevalentes na população mundial (PARKIN et al., 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11.54 casos novos a cada 100 mil homens e 3.92 a cada 100 mil mulheres.

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

1.2 Etiologia

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

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

1.3 Lesões potencialmente malignas

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0.42 e 5% (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 (BARNES et al., 2005). Ao se deparar com uma leucoplasia há a necessidade de realizar-se uma biópsia para que seja possível o diagnóstico

histopatológico, uma vez que estas lesões podem apresentar inúmeras alterações epiteliais (KRAMER et al., 1978).

Os distúrbios epiteliais presentes em leucoplasias são classificados de acordo com suas características morfológicas em hiperplasia epitelial, hiperkeratose (hiperortokeratose ou hiperparakeratose), 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, hiperortokeratose, hiperparakeratose 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 queratina que pode ser constituída de parakeratina ou ortokeratina. Na parakeratina as células superficiais achatadas retêm os núcleos e boa parte das organelas, enquanto que na ortokeratina essas células perdem suas organelas e seu citoplasma é ocupado por grande quantidade de filamentos de citoqueratina. A acantose é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, apresentando como principais características o alongamento das papilas epiteliais e a união entre o tecido conjuntivo e epitelial em linha reta (BARNES et al., 2005).

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

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

Estima-se que a taxa anual de transformação maligna de leucoplasias seja de 1% (VAN DER WAAL, 2009). Apesar do enorme progresso científico, não há um marcador ou um conjunto de marcadores que permitam de forma confiável prever a transformação maligna de um leucoplasia. A identificação de indivíduos e lesões com maior risco de desenvolvimento para o câncer bucal tem fundamental importância para a adoção de medidas eficazes que favoreçam o diagnóstico precoce dessa neoplasia, aumentando as taxas de sobrevivência destes pacientes. Além disso, permitiria a utilização

de medidas preventivas, como o abandono do uso de substâncias carcinogênicas e outros recursos quimiopreventivos.

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

1.4 Citopatologia

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

Para esse fim, técnicas quantitativas estão sendo associadas à citopatologia para que possamos mensurar modificações na mucosa bucal. Uma técnica quantitativa associada à citopatologia é a análise de AgNORs. Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são sequências de DNA que codificam o RNA ribossômico, contribuindo, portanto, para a síntese ribossomal. Durante a interfase, essas regiões se aproximam e, juntamente com o RNAr (RNA ribossômico) e proteínas, formam o nucléolo. Quando

essas regiões estão sendo ativamente transcritas, elas se associam a proteínas que têm afinidade pela prata, assim, as NORs ativas aparecem como pontos pretos dentro do núcleo amarelo-acastanhado, sendo então chamadas de AgNORs (HERNANDEZ-VERDUN, 1983; TRERÉ, 2000).

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

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

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

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

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

1.5 Perda da heterozigosidade

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

usando abordagens tradicionais como a cirurgia ou técnicas mais recentes, como regimes quimiopreventivos (ROSIN et al., 2000).

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

Em 1996, Califano e colaboradores sugeriram um modelo de progressão tumoral para tumores de cabeça e pescoço a partir da análise de microssatélites para determinar a presença de perda de heteroziguidade em 10 loci alélicos frequentemente perdidos no câncer de cabeça e pescoço. 87 lesões cancerizáveis com diferentes achados histopatológicos pareadas com amostras normais foram analisadas. A maior frequência de LOH em leucoplasias com hiperplasia ou hiperqueratose ocorreu em 9p21 (20%), seguido por 3p14 (16%) e 17p13 (11%). Este achado indica que LOH nestas regiões é um evento precoce na progressão tumoral. Displasias epiteliais, consideradas um passo intermediário na evolução histopatológica para o câncer, mostraram LOH adicionais em 11q13 (29%), 13q21 (32%) e 14q31 (23%). Como esperado, houve também um aumento na frequência de perdas em 9p21 e 3p14 da etapa de leucoplasia sem displasia para leucoplasia com displasia.

O estudo realizado por Rosin et al. (2000) teve por objetivo avaliar a perda de heteroziguidade (LOH) comparando leucoplasias que progrediram ou não para o carcinoma espinocelular. Todas as leucoplasias, que progrediram para carcinoma espinocelular apresentavam perda do 3p14 e 9p21, com risco relativo de malignização

24 vezes maior do que as lesões que não apresentavam tal alteração. No entanto, a perda destes alelos específicos, ocorria com significativa frequência também em lesões que não progrediram para carcinoma espinocelular. Logo, outros marcadores foram necessários para a avaliação do potencial de malignização. Lesões cancerizáveis com perda do 3p e/ou 9p e alguma outra perda adicional nos cromossomos 4q, 8p, 11q, 13q e 17p, possuíam risco de transformação em carcinoma espinocelular 33 vezes maior quando comparadas com lesões que não apresentaram perdas em tais alelos.

1.5.1 Lócus 9p21

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

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

O gene *CDKN2A* codifica a proteína p16. A proteína p16 desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB

(Retinoblastoma), também considerado um gene supressor tumoral. Durante a fase G1, p16 inibe CDK4 (quinase dependente de ciclina 4) e CDK6 (quinase dependente de ciclina 6), impedindo que os mesmos fosforilem Rb, que se mantém ligado ao fator de transcrição E2F (Figura 1), dessa forma impedindo a passagem do ciclo celular para a fase S (GUERRA ENS et al,2005).

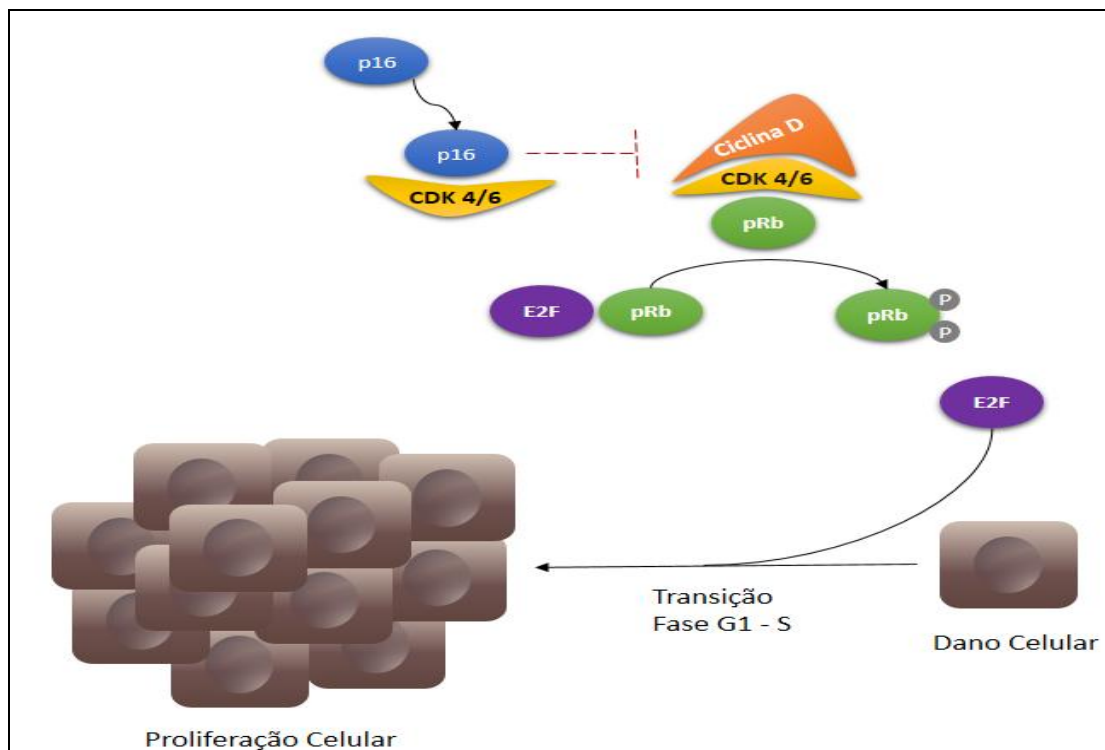


Figura1: Cascata de sinalização da proteína p16. Adaptado de Chudnovsky, Khavari e Adams, 2005.

Além disso, as alterações genéticas não são o único mecanismo para silenciar *CDKN2A* em carcinomas espinocelulares, mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos (LOYO, 2013). A inativação de p16 envolve quatro tipos de alterações genéticas, tais como: hipermetilação, perda de heterozigidade (LOH) e mutação

pontual (LI, 2011). Acredita-se que a inativação de p16 é um evento precoce e importante na progressão tumoral (JAMES, 2001).

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

A manipulação da expressão de p16 já está sendo considerada como uma abordagem terapêutica no câncer. Enquanto que a inativação de p16 leva à desregulação do ciclo celular, o aumento da expressão da proteína p16 leva à senescência, com a inibição da proliferação celular. A senescência celular o que também pode ser chamado de envelhecimento celular é desencadeada por uma série de fatores, tais como: danos no DNA e estress oxidativo. A senescência ocorre com a inativação de elementos supressores levando ao um reforço da expressão de p16. Enquanto senescência é refletida nas mudanças fenotípicas de diferentes organelas, o mecanismo molecular da senescência celular envolve o encurtamento dos telômeros. Rayess e colaboradores em uma revisão de literatura concluem que a indução de senescência com maior expressão de p16 em células de câncer seria uma estratégia terapêutica valiosa tratamento do câncer (RAYESS et al. 2011).

Diante do que foi exposto, observamos que apesar de esses estudos mostrarem que existe uma forte associação entre perda de heterozigosidade e progressão de leucoplasias para carcinomas espinocelulares, não existem estudos que avaliem esse

tipo de alteração em mucosa ainda clinicamente normal, mas expostas aos carcinógenos do fumo e álcool. A análise da perda de heterozigosidade pode ser realizada com o emprego de pouca quantidade de DNA, logo a citologia esfoliativa pode ser uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação da mucosa bucal clinicamente normal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular da mucosa bucal de indivíduos expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, assim como de indivíduos com câncer bucal e de indivíduos portadores de leucoplasia, comparando-os com indivíduos sem lesão e que não são expostos aos fatores de risco.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a possibilidade de utilização da citopatologia bucal como ferramenta para coleta e análise de DNA para mutações no locus 9p21;
- Comparar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Comparar a velocidade de proliferação nos diferentes grupos estudados dos pacientes (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Correlacionar a perda de heterozigosidade no locus 9p21 com a velocidade de proliferação celular avaliada por AgNOR nos diferentes grupos estudados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, J. L., BIAZEVIC M.G., DE ARAUJO M.E., et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. *Oral Oncol*, v. 37, n. 4, p.345-350, 2001.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative Cytology Examinations in the Early Diagnosis of Oral Cancer. *Int Dent J*, v. 26, n. 4, p. 398-404, 1976.

BANÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. *Commun Dent Oral Epidemiol*, v. 19, n. 5, p. 265-267, 1991.

BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P., et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. IARC Press, 2005, p. 177-179. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php> >. Acesso em 28 agosto.2014.

BIAZEVIC, M.G., CASTELLANOS, R.A., ANTUNES, J.L. et al. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. *Cad Saude Publica*, v. 22, n.10, p.2105-2114, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro:INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em 15/05/2015.

CALIFANO, J., VAN DER RIET, P., WESTRA, W., et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res*, v. 56, p. 2488-2492, 1996.

CANÇADO, R.P., YURGEL, L.S., SANT'ANA FILHO, M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Oral Oncol*, v. 37, n. 5, p. 446-454, 2001.

CARRARD, V.C., PIRES, A.S., PAIVA, R.L., et al. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. *Rev Bras Cancerologia*, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.

CARRARD, V.C., HAAS, A.N., RADOS, P.V., et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. *Oral Dis*, v. 17, p. 171–179, 2010.

CASTELLSAGUE, X., QUINTANA, M.J., MARTÍNEZ, M.C., et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*, v. 108, p. 741–749, 2004.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P.A.; ADAMS, A.E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*, v. 115, n. 4, p. 813-824, 2005.

DELILBASI, C., AKMAN, H., REDZEP, E. et al. Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. *Turk J Med Sci*, v. 33, p. 39-42, 2003.

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

DERENZINI, M., TRERÈ, D., PESSION, A. et al. Nucleolar Function and Size in Cancer Cells. *Am J Pathol*, v. 152, n. 5, p. 1291-1297, 1998.

DERENZINI, M., TRERÈ, D., PESSION, A. et al. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissue. *J Pathol*, v.191, n. 2, p. 181-186, 2000.

GEDOZ, L., LAUXEN, I.S., SANT'ANA, M.F. 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*, v. 29, n. 4, p. 231-238, 2007.

GUERRA, E.N.S., PAULA, E.C., OLIVEIRA, J.C. et al. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v 51, n. 1, p. 31-37, 2005.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v.144, n. 4, p. 646-74, 2011.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The Nucleolar Organizer Regions. *Biol Cell*, v. 49, n. 3, p. 191-202, 1983.

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

JAMES, W.R, DAVID, S. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer. *Progression-Experimental Cell Res*, v. 264, p. 42–55, 2001.

KRAMER, R.H., LUCAS, R.B., PINDBORG, J.J. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. WHO. *Oral Surg*, v. 46, n. 4, p. 518-39, 1978.

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

LI, J.M.J, POI ,M.J., TSAI, M.D.T. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer , v. 50, n. 25, p. 5566–5582, 2011.

LOYO, M., LI, R.J., BETTEGOWDA, C. et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck*, v. 35, n. 3, p. 454–463, 2013.

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

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

OGDEN, G.R., WIGHT, A.J. A etiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 36, n. 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*, v. 28, n. 5, p. 216-220, 1999.

PAIVA, R.L., SANT'ANA FILHO, M., BOHRER, P.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analyt Quant Cytol Histol*, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.

PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J. et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

QUINN, C. M.; WIGHT, N. A. The Clinical Assessment of Proliferation and Growth in Human Tumours: Evaluation of Methods and Applications as Prognostic Variables. *J Pathol*, v. 160, n. 2, p. 93-102, 1990.

RAYESS, H., WANG, M.B., SRIVATSAN, E.S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer*, v. 130, p. 1715 - 1725, 2012.

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

ROSIN, M.P., CHENG, X., POH, C. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*, v. 6, n. 2, p. 357-62, 2000.

ROSIN, M.P., LAM, W.L., POH, C. et al. 3p14 and 9p21 Loss Is a Simple Tool for Predicting Second Oral Malignancy at Previously Treated Oral Cancer Sites. *Cancer Res*, v. 62, p. 6447-6450, 2002.

ROSIN, M.P., POH, C.F., ELWOOD, J.M. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. *J Can Dent Assoc*, v. 74, n. 3, p. 261–266, 2008.

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

SCHEPMAN E.M., SMEELE, L.E., VAN DER WAAL, I. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 32B, n. 6, p. 416-9, 1996.

TRERÈ, D. AgNOR Staining and Quantification. *Micron*, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2000.

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

VAN DER WAAL I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.1, n 18, p 33-37,2013.

WALDRON, C.A., SHAFER, W.G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, v. 36, n. 4, p.1386-92, 1975.

XIE, X., CLAUSEN, O.P., SUDBÖ, J. et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, v. 79, n. 11, p. 2200-2208. 1997.

WARNAKULASURIYA, S., REIBEL, J., BOUQUOT, J. et al. Oral epithelial dysplasia classification system: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*, v. 37, n. 3, p.127-133, 2008.

ZHANG, L., POH, C.F., WILLIAMS, M. et al. Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles – Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. v 5, n 9, p 1081–1089, 2012.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Análise da atividade proliferativa e sua associação com a perda de heterozigosidade no locus 9p21 na carcinogênese bucal

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

Abstract

A carcinogênese na cavidade bucal apresenta alterações progressivas sobre o genoma celular. O desafio atual é a busca de biomarcadores que demonstrem essas alterações precocemente, para que possam ser identificados os indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer. Uma das primeiras alterações nesse processo é o aumento da atividade proliferativa, geralmente causado por mutações nos genes que controlam o ciclo celular. O gene *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular na carcinogênese bucal, assim como avaliar a possibilidade de utilização da citopatologia bucal como ferramenta para coleta e análise de DNA. Foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos nos grupos: controle (n=24), álcool-fumo (n=26), leucoplasia (n=13) e grupo carcinoma (n=14). A partir do raspado citológico foi confeccionada uma lâmina para análise de AgNOR e o restante das células foi utilizado para extração do DNA. Observamos que os parâmetros de AgNOR e a frequência de mutações no locus 9p21 foram maiores nos grupos expostos aos carcinógenos e com leucoplasia e carcinoma espinocelular em relação ao controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também maior velocidade de proliferação em relação aos sem mutações, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Concluímos que a citopatologia é um método útil para avaliação da atividade proliferativa e de mutações genéticas em pacientes com risco para transformação maligna para o câncer bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal; Leucoplasia; AgNOR; Fumo; Álcool; Perda de

Heterozigosidade; *CDKN2A*.

Introdução

O carcinoma espinocelular representa a maioria de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, assim é usado muitas vezes como sinônimo para o termo câncer bucal. É considerado o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo.¹ De acordo com o Instituto Nacional do Câncer² estimam-se para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.010 em mulheres. Suas taxas de mortalidade são altas e têm se mantido inalteradas nas últimas décadas.^{1,3} Dessa forma, a implementação de estratégias mais eficazes de combate ao câncer são necessárias.³

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.^{4,5} A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5% .⁶⁻¹⁰ Evidências científicas têm demonstrado que é possível detectar alterações precoces em pacientes expostos aos fatores de risco e com lesões potencialmente malignas, fato que tem motivado a busca de biomarcadores com possibilidade de utilização em nível populacional que venham a contribuir na identificação de indivíduos com maior risco ao desenvolvimento de câncer bucal .¹¹

Existe uma forte associação entre perda de heterozigosidade e transformação maligna de lesões potencialmente malignas. A perda de heterozigosidade representa a perda de um alelo em um locus específico, causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo a partir de um par cromossômico, resultando em uma

homozigossidade anormal.¹² A perda de heterozigossidade no lócus 9p21 parece ser a mais importante para predição de transformação maligna de leucoplasias bucais.¹³ O gene supressor tumoral *CDKN2A*, localizado no lócus 9p21, é um gene supressor tumoral, e codifica a proteína p16 que desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB (Retinoblastoma).¹⁴

Nos indivíduos que apresentam a mucosa bucal clinicamente normal, mas são expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, a citologia esfoliativa é uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação de alterações celulares¹⁵. Associada à citopatologia, a análise de AgNORs, Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) é uma técnica quantitativa que demonstra a velocidade de proliferação celular. Estudos prévios identificaram um aumento da velocidade de proliferação celular na mucosa bucal morfolologicamente normal de pacientes expostos a carcinógenos, fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle através dessa técnica.^{11,16}

Objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de perda de heterozigossidade no lócus 9p21 e a atividade proliferativa celular da mucosa bucal de indivíduos expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, assim como de indivíduos com câncer bucal e de indivíduos portadores de leucoplasia, comparando-os com indivíduos sem lesão e não expostos aos fatores de risco. Além disso, avaliar a citopatologia como forma de coleta para análise de DNA.

Metodologia

Amostra

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no ambulatório de atendimento clínico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 2013 a 2015. Todos os indivíduos assinaram um TCLE (Aprovação Comitê de Ética da UFRGS – número 261.037- Anexo 1. A amostra foi dividida em 4 grupos:

(1) Grupo Controle: constituído por pacientes que não apresentam lesões bucais, e que não são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal. Pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que bebem, em média, menos de uma dose de bebida alcoólica por dia. Segundo Tezal et al. (2001)¹⁷, 340 ml de cerveja, 113 ml de vinho e 28 ml de destilados contêm a mesma quantidade aproximadamente de etanol.

(2) Grupo Álcool e Fumo: constituídos por pacientes que não apresentam lesões bucais, mas são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal (fumo\álcool). Pacientes que fumam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos associado ou não consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica é caracterizado pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia segundo o indicado por Tezal et al. 2001¹⁷, por no mínimo um ano.

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

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

Os critérios de exclusão deste estudo foram: idade inferior a 30 anos, presença de lesão bucal clinicamente visível, com exceção do carcinoma espinocelular e da leucoplasia. O cálculo amostral foi baseado num nível de significância de 5%, para poder de 80% e com uma diferença esperada em relação à frequência de perda de heterozigosidade entre os grupos de 60%,¹⁸ dessa forma a amostra deveria ser constituída de 27 pacientes por grupo.

Após a concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE (Anexo 2), foi realizado um questionário com informações pertinentes ao estudo. Foram coletados dados comportamentais e demográficos (Anexo3)(consumo de fumo, álcool e chimarrão). No exame clínico foi realizada a análise de CPOD (Dentes cariados, perdidos e obturados). Para análise da exposição ao fumo foi calculado o índice de packyears. O packyear é definido com 20 cigarros fumados todos os dias por ano (<http://smokingpackyears.com/>).

Coleta Citopatológica

Com auxílio de um cytobrush pacientes do grupo 1 e grupo 2 foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal no sítio borda de língua (um dos sítios de maior

incidência do câncer bucal), e os pacientes do grupo 3 e grupo 4 foram submetidos à realização de exame citológico na região onde está localizada a leucoplasia ou carcinoma espinocelular. O esfregaço citopatológico foi transferido para uma lâmina de vidro. Após, o cytobrush foi então imerso em tubo contendo solução PBS (Phosphate buffer saline) para obtenção de células para extração de DNA. A solução foi centrifugada a 10.000 RPM (rotações por minuto) durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet celular foi ressuspensão em 25 μ L de PBS e transferido para cartão FTA (Whatman International Ltd, Abingdon, Cambridge, UK).

Coleta de Sangue Periférico

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

Extração DNA

O isolamento de DNA foi realizado a partir de discos de 3mm de papel obtido do cartão FTA. Os discos eram colocados em tubo do tipo eppendorf, lavados com 500 μ L de água ultrapura (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Em seguida era adicionado 30 μ L de água ultrapura e aquecido a 95°C durante 30 minutos. A

concentração e pureza do DNA foram avaliadas com espectrofotômetro. A pureza foi determinada pela razão da Absorbância 260/ Absorbância 280.

Amplificação por PCR e análise dos fragmentos

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

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

A perda de heterozigosidade (LOH) foi determinada pelo cálculo da proporção entre a altura de pico de alelos normais e tumorais, utilizando a fórmula: (altura do pico do alelo 1 da amostra de interesse/ altura do pico do alelo 2 da amostra de interesse) / (altura do pico do alelo 1 da amostra controle / altura do pico do alelo 2 na amostra controle). A proporção de mais de 0.5 indica LOH. A instabilidade de microssatélite (MSI) foi definida como a presença de novos tamanhos de fragmentos na amostra de interesse, que estavam ausentes no DNA controle (Figura 1). A eletroforese capilar foi

realizada na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

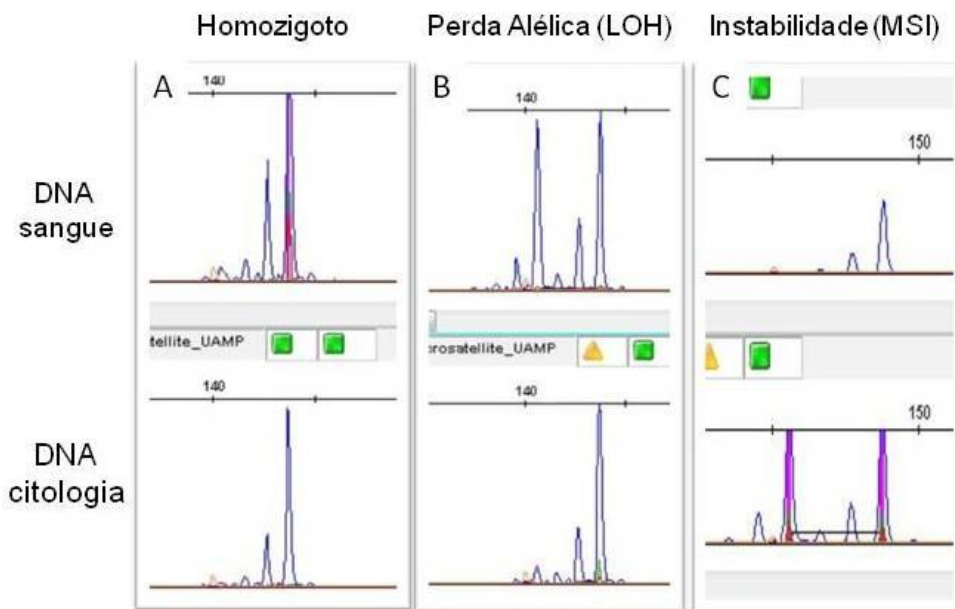


Figura 1. Aspecto representativo da análise de fragmentos. A, amostra homozigota. B, amostra com perda alélica. C, amostra com instabilidade de microssatélites.

Técnica para quantificação das AgNORs

No esfregaço citológico submetido à impregnação pela prata, foram capturadas imagens de 50 células, bem distendidas e não sobrepostas, em um microscópio binocular, em aumento 1000x, com óleo de imersão. Foi realizada a contagem das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989)¹⁹ e então foi calculada a média de AgNORs/núcleo (mAgNOR). Um segundo parâmetro de avaliação utilizado foi o percentual de células com mais do que 1, 2, 3 e 4 AgNORs/núcleo (pAgNOR), de acordo com metodologia proposta por Xie et al. (1997).²⁰ A quantificação de AgNORs foi realizada por dois pesquisadores cegos e

calibrados. A calibragem intra e inter-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ($\geq 0,75$).

Análise Estatística

Foi realizada a análise de distribuição dos dados para escolha dos testes estatísticos. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-wallis seguido do teste post-hoc de Dunns. Para avaliar a correlação entre variáveis utilizamos o teste de correlação de Spearman. Foi considerada significância estatística quando $p < 0.05$.

Resultados

Um total de 77 pacientes foi incluído no estudo, as características demográficas da amostra estão descritas na tabela 1. Observamos que os pacientes dos grupos com lesões (Leucoplasia e Carcinoma) apresentaram média de idade mais elevada do que os demais, assim como o índice CPOD. Observamos também um índice alto de ex-fumantes e ex-alcoolistas no grupo dos pacientes com carcinoma espinocelular. A maior parte das lesões estava localizada em língua, gengiva e assoalho bucal.

A tabela 2 apresenta os resultados referentes à análise de AgNOR nos diferentes grupos. Foram observadas medianas maiores nos pacientes dos grupos de risco e com lesões em relação ao grupo controle, no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Quando as leucoplasias foram estratificadas em relação ao diagnóstico histopatológico, observamos maiores medianas dos parâmetros de AgNOR nas leucoplasias displásicas ($n=6$) em relação às leucoplasias não displásicas ($n=7$). Os diagnósticos histopatológicos das leucoplasias não displásicas

foram de hiperkeratose (n=6) e de hiperplasia epitelial (n=1). A correlação entre a exposição ao fumo (packyears) e mAgNOR foi avaliada pela correlação de Spearman, não foi observada correlação significativa (R=0,076, p=0,732).

As amostras de DNA obtidas no laboratório antes de serem submetidas à reação de PCR foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da densidade óptica em espectrofotômetro, os dados estão apresentados na tabela 3. Não foram observadas diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos.

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

	Grupo controle (n=24)	Grupo álcool/fumo (n=26)	Grupo leucoplasia (n=13)	Grupo carcinoma (n=14)
IDADE (média + DP)	52,16 (±14,05)	46,7 (±8,2)	60,0 (±14,4)	65,46 (±9,3)
GÊNERO	100% Masculino	100% Masculino	50,0% Masculino	93,3% Masculino
FREQUÊNCIA DE FUMANTES	-----	73,0% 15,3% Ex-fumantes	64,28% 28,5 % Ex-fumantes	46,6% 46,6% Ex-fumantes
PACKYEARS (média + DP)	-----	23,46 (±22,8)	20,5 (±26,1)	37,4 (±38,9)
CONSUMO DE CHIMARRÃO	72%	69,23%	72,2%	60,0%
BEBIDAS ALCÓOLICAS	-----	76,9% 15,3% Ex-consumidor	88,8% 5,5% Ex-consumidor	45% 40% Ex-consumidor
CPOD (média + DP)	7,25 (± 6,8)	10,8 (± 8,2)	13,33 (± 10,0)	19,17(± 9,3)
LOCALIZAÇÃO DA LESÃO	-----	-----	ASSOALHO BUCAL ----- 6,2% LÍNGUA ----- 18,7% GENGIVA ----- 15% PALATO ----- 18,7% MUCOSA JUGAL----- 12%	ASSOALHO BUCAL-- 42,8% LÍNGUA-----28,5% GENGIVA-----28,5%

Tabela 2. Distribuição das variáveis de AgNOR de acordo com os grupos. Q1-Q3, intervalo interquartil. p , Teste de Kruskal-wallis.

	mAgNOR		pAgNOR>1		pAgNOR>2		pAgNOR>3		pAgNOR>4	
	mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Controle	2.37	(2.03-3.27)	74	(63.5-87.5)	40	(28-67)	15	(8.5-33.5)	2	(2-14.5)
Álcool-Fumo	2.87	(2.52-3.12)	85	(76-90)	57	(48-66)	29	(16.5-40)	14	(6-16)
Leucoplasia	2.72	(2.34-3.06)	80	(74-88)	54	(44-62)	22	(14-40)	8	(6-20)
L. Não-displásica	2.34	(2.16-2.82)	74	(69-83)	44	(30-57)	14	(10-26)	6	(2-13)
L. Displásica	2.96	(2.65-4.05)	85	(77-89)	58	(51-77)	35	(20-59.5)	18	(7.5-36.5)
Carcinoma	2.74	(2.28-3.26)	86	(68-90)	54	(40-70)	30	(14-38)	8	(2-14)
p	0.4985		0.1782		0.3022		0.1818		0.1169	

Tabela 3. Concentração e pureza das amostras de DNA obtidas.

		Concentração (ng/ μ L)			Pureza		
		Média (\pm DP)	Mínimo	Máximo	Média (\pm DP)	Mínimo	Máximo
Grupo controle	sangue	20,3 (\pm 6,81)	10,4	34,1	1,96 (\pm 0,53)	1,08	3,41
	citologia	22,94 (\pm 20,31)	6,4	82,6	2,07 (\pm 0,68)	0,56	3,63
Grupo álcool-fumo	sangue	20,15 (\pm 12,34)	9,8	60,4	2,05 (\pm 0,56)	1,18	3,58
	citologia	26,18 (\pm 24,77)	6,5	109,4	2,03 (\pm 0,40)	1,31	2,89
Grupo leucoplasia	sangue	28,85 (\pm 25,97)	8,9	91,8	1,96 (\pm 0,47)	1,29	3,05
	citologia	10,69 (\pm 4,72)	5,3	19,1	2,29 (\pm 0,64)	1,31	3,37
Grupo carcinoma	sangue	10,21 (\pm 10,66)	11,1	53,3	1,94 (\pm 0,48)	1,43	3,19
	citologia	20,3 (\pm 11,87)	3,7	41,3	2,14 (\pm 0,62)	1,27	3,06

Após a quantificação, utilizamos o DNA para avaliar se há alteração cromossômica no locus 9p21 (tabela 4). Observamos um aumento na frequência de mutações por perda de heterozigidade e instabilidade nos grupos expostos aos carcinógenos e nos grupos com lesão. A correlação entre mutações no gene *CDNK2A* com a velocidade de proliferação celular avaliada por mAgNOR (gráfico 1), mostra que a velocidade de proliferação celular é maior nos pacientes que apresentam mutação. Além disso, observamos que o percentual de células com mais do que 3 AgNORs por núcleo (gráfico 2) é maior nos pacientes que apresentaram mutação no locus 9p21, no entanto estas associações não foram estatisticamente significativas.

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

	Homozigoto N (%)	Sem mutação N (%)	Perda alélica (LOH) N (%)	Instabilidade (MSI) N (%)	Total Mutações em 9p21 N (%)
Controle	5 (20,83%)	11 (45,83%)	3 (12,5%)	5 (20,83%)	8 (33,33%)
Álcool-fumo	4 (15,38%)	5 (19,23%)	12 (46,15%)	5 (19,23%)	17 (65,38%)
Leucoplasia	3 (23,07%)	1 (7,69%)	6 (46,15%)	3 (23,07%)	9 (69,22%)
Carcinoma	1 (7,14%)	6 (42,85%)	4 (28,57%)	3 (21,42%)	7 (49,99%)

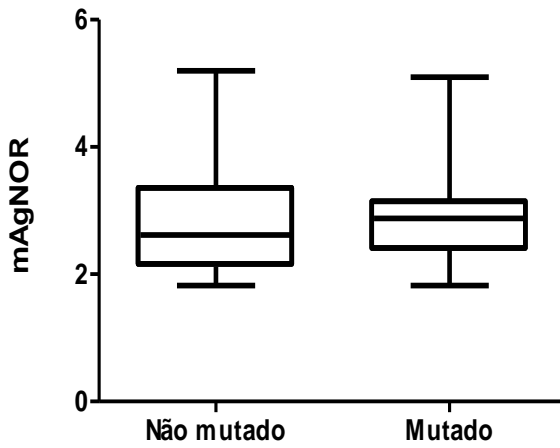


Gráfico 1. Associação do mAgNOR com a perda da heteroziguidade no locus 9p21.

Teste de Mann-Whitney, $p=0,608$.

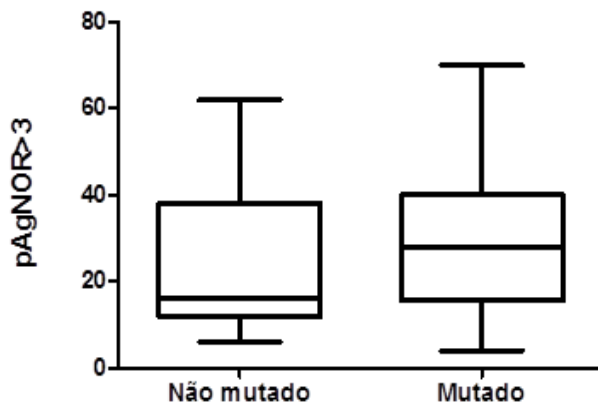


Gráfico 2. Associação do pAgNOR>3 com a perda da heteroziguidade no locus 9p21.

Teste de Mann-Whitney, $p=0,357$.

Discussão

Na busca de biomarcadores que sinalizem maior risco de transformação maligna, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular da mucosa bucal de indivíduos em grupos de risco para o câncer de boca (grupos fumo-álcool e leucoplasia) comparando-os com indivíduos controle, não expostos a carcinógenos, ou então já com a presença de carcinoma espinocelular. Observamos que os parâmetros de AgNOR e a frequência de mutações no locus 9p21 foram maiores nos grupos expostos aos carcinógenos e com lesões em relação ao controle. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também uma tendência a maior velocidade de proliferação em relação aos pacientes sem mutações.

A citopatologia é uma metodologia com aplicação muito importante para realizar o rastreamento dos indivíduos com maior risco de desenvolver câncer, pois é uma forma de coleta não invasiva. Dessa forma, permite a análise da mucosa clinicamente normal, onde uma biópsia não seria indicada, além de permitir a coleta sistemática de amostras biológicas.^{11,16} Técnicas quantitativas são associadas à citopatologia para aumentar a quantidade de informações. A técnica de AgNOR é bastante utilizada por ser uma técnica de fácil execução e nos informar a velocidade de proliferação celular, uma das alterações iniciais no processo de carcinogênese.^{11,16} No trabalho de Xie et al. (1999)²¹, foi estudada a correlação da técnica de AgNORs com um marcador de proliferação celular bastante usado na literatura que é o Ki-67, os resultados

demonstraram que há validade nessa correlação, sendo o AgNOR uma técnica mais simples e fácil de fazer se comparado com o Ki-67.

Observamos que o valor das medianas de mAgNOR e pAgNORs aumentaram quando analisamos pacientes dos grupos álcool-fumo, nas leucoplasias displásicas e nos pacientes do grupo carcinoma em relação ao grupo controle, porém não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Nossos resultados são semelhantes aos observados na literatura prévia. Cançado et al. (2001)²², Paiva et al. (2004)¹¹ e Ahmed et al. (2009)²³ utilizaram o método da citologia para estudar pacientes controle e expostos aos fatores de risco álcool fumo e também observaram um aumento de mAgNOR nos pacientes expostos em relação aos controles. Apesar de estes estudos mostrarem tendências semelhantes, ou seja, o aumento de AgNORs associado à exposição a carcinógenos, as médias variaram entre os trabalhos, o que pode ser explicado por diferenças entre tamanhos amostrais e dose de exposição.

Não encontramos na literatura estudos que utilizaram a citopatologia para análise de AgNORs de pacientes com lesão. A maioria dos artigos encontrados na literatura utiliza a técnica da histologia para avaliação de AgNOR em casos de leucoplasias e carcinomas espinocelulares. Spolidorio et al. (2002)²⁴, também observaram o aumento da mediana de mAgNOR nos grupos displasia epitelial e carcinoma microinvasivo em relação ao controle. Comparando os estudos, constatamos que os nossos valores observados são em torno de 10% superiores. Essa diferença pode ser devido a diversos fatores: tipo de metodologia utilizada (pois o estudo de Spolidorio et al.²⁴ foi realizado em cortes histológicos e não em esfregaços

citológicos), tamanho da amostra, sítios anatômicos diferentes, ou uma combinação destes fatores.

Quando subdividimos as leucoplasias em displásicas e não-displásicas, observamos que as displásicas apresentaram os maiores valores nos parâmetros de AgNOR, enquanto que as leucoplasias não-displásicas apresentam valores semelhantes aos indivíduos controles. Resultado semelhante foi observado por Hildebrand et al. (2010)²⁵, que comparou a mucosa normal com lesões leucoplásicas com acantose, hiperqueratose e displasia epitelial. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre a mucosa normal (grupo controle) e o grupo displasia epitelial.

Apesar de diversos estudos mostrarem claramente o aumento de AgNORs em pacientes expostos ao fumo e álcool, assim como em pacientes com leucoplasias e carcinomas espinocelulares, Gedoz et al. (2007)¹⁶ em um estudo longitudinal demonstrou que a variação ao longo do tempo nos parâmetros de AgNOR apresenta um caráter individual. Dessa forma, análises ainda mais precisas são necessárias para avaliar o risco de desenvolver câncer bucal. Portanto, decidimos acrescentar a análise da perda de heterozigosidade no locus 9p21. Segundo Zhang et al. (2012)¹³, este locus é um dos mais importantes para determinar o risco de transformação maligna de leucoplasias bucais. No entanto, este tipo de análise nunca havia sido realizada em pacientes sem lesão, mas expostos aos fatores de risco, fumo e álcool. Para tanto, era importante estabelecer a citopatologia como um método para coleta de DNA, visto que nesses pacientes a biópsia não é indicada. O DNA obtido mostrou-se satisfatório em relação à concentração e a pureza. Observamos que as concentrações tanto do

sangue quanto da citologia foram em média 20ng/μL, o que permite a realização de cerca de 60 reações de PCR utilizando 10ng de DNA. Digno de nota, a concentração do grupo da leucoplasia, obtida por citologia, foi menor (média 10,69 ng/μL). Este fato provavelmente é explicado pelo aumento da ceratinização das lesões leucoplásicas, o que resulta na obtenção de um menor número de células nucleadas.

Verificamos que a frequência de alterações em 9p21 aumenta nos pacientes expostos ao fumo e álcool, assim como nos pacientes com lesão, atingindo sua frequência máxima de cerca de 70% nos pacientes com leucoplasia. Indo em concordância ao trabalho de Califano et al. (1996)¹⁸, podemos concluir que há uma alteração precoce no locus 9p21. Em nosso estudo, cerca de 30% dos indivíduos controle também apresentaram mutações em 9p21. Mutações em controles benignos, também foram vistas por outros autores. Califano et al. (1996)¹⁸, observou LOH em 20% de lesões hiperplásicas benignas, e Accurso et al. (2010)²⁶ observou LOH e MSI em 9p21 em cerca de 50% dos fibromas estudados pelo seu grupo.

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

Um ponto a ressaltar é que além da perda de heterozigidade em 9p21, também existem outros mecanismos que inativam a proteína p16, e da mesma forma que esta estão associados ao risco de cancerização de leucoplasias. Um desses

mecanismos é a metilação de CDKN2A.^{27,28} Também já foram observadas mutações pontuais, mas de acordo com a literatura são menos frequentes, os mecanismos mais comuns de inativação são perda da heterozigozidade (LOH) e a metilação, sendo que a literatura reporta que LOH acontece em torno de 39% das leucoplasias bucais, enquanto que em nosso estudo a LOH de 9p21 ocorreu em torno de 46% das leucoplasia estudadas.²⁹

Conclusões

A citopatologia é um método útil para avaliação da atividade proliferativa e de mutações genéticas em pacientes com risco para transformação maligna em relação ao câncer bucal. Observamos um aumento na atividade proliferativa assim como uma maior frequência de mutações em 9p21 nos indivíduos expostos aos fatores de risco para o câncer de boca, assim como nos pacientes com lesões cancerizáveis.

Referências do artigo

1. Neville BW, DAY TA. Oral Cancer and precancerous lesion. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52:195-215.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Accessed in May 15, 2015.
3. Van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18:33-37.
4. Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today.* 1997; 3:442-448.
5. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14: 47-62.
6. Banóczy J, Rigó O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 1991;19:265-267.

7. Schepman EM , Smeele LE, Van Der Waal, I. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. *Eur J Cancer B Oral Oncol.*1996; 32B:416-419.

8. Delilbasi C, Akman H, Redezep E, et al; Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. *Turk J Med Sci.* 2003;33:39-42.

9. Scheifele C, Reichart P, Dietrich, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.*2003; 39: 619–625.

10. Jahanbani J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 iranian textile workers. *Oral Dis.*2003;9:302–304.

11. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados . AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analyt Quant Cytol Histol.*2004;26:175-180.

12. Rosin MP, Poh CF, Elwood JM , et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. *J Can Dent Assoc.*2008;74:261–266.

13. Zhang L, Poh CF, Williams M, et al. Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles – Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*.2012;5:1081–1089.
14. Li JMJ , Poi MJ, Tsai MDT. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer . *Biochemistry* .2011;50(25):5566–5582.
15. Spafford MF, Koch MW, Reed AL, et al. Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma among Exfoliated Oral Mucosal Cells by Microsatellite Analysis. *Clin Cancer Res*.2001;7:607-612.
16. Gedoz L, Lauxen IS, Sant’ana Filho M, Rados PV. 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*.2007;29:231-238.
17. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The Effect of Alcohol Consumption on Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2001;72:183-189.
18. Califano J,Riet PVD, Westra W. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res*.1996;56:2488-2492.

19. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol.*1989;158:185–188.
20. Xie X, Clausen OP, Sudbö J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.*1997;79:2200-2208.
21. Xie X, Angelis PD, Clausen OPF, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncology.*1999; 35:502-509.
22. Cançado RP, Yurgel LS, Sant'ana filho M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Oral Oncol.*2001;37(5):446-454.
23. Ahmed HG, Babiker AEA. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to toombak and smoking. *Rare Tumors.*2009;1(18):50-52.
24. Spolidorio LC, Nevesa KA , Soaresb CP ,et al Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. *Micron.*2002;33:605–608.

25. Hildebrand LC, Carrard VC, Lauxen IS, Quadros OF, Chaves ACM, Sant'Ana-Filho M. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.2010;15(2):328-334.

26. Accurso BT, Warner BM, Thomas J, et al. Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112:359-366.

27. Cao J, Zhou J, Gao Y, et al. Methylation of p16 CpG Island Associated with Malignant Progression of Oral Epithelial Dysplasia: A Prospective Cohort Study. *Clin Cancer Res*.2009;15:5178-5183.

28. Asokan GS, Jeelani S, Gnanasundaram N. Promoter Hypermethylation Profile of Tumour Suppressor Genes in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*.2014;8(10):ZC09-ZC12.

29. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene*.1997;14:1799-1803.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular bucal é o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo e o quinto mais comum em homens brasileiros (PARKIN et al., 2005; INCA, 2014). Apesar dos avanços científicos nesse campo de pesquisa, as taxas de mortalidade do câncer bucal são altas e têm se mantido inalteradas nas últimas décadas, ao contrário de outros tipos de câncer como de mama, próstata e útero que apresentaram um declínio na sua mortalidade. Estratégias de prevenção ao câncer bucal são imprescindíveis, assim um fator importante a ser considerado nesse processo de cancerização é a exposição dos indivíduos aos fatores de risco, tais como álcool e tabaco. A redução desses fatores de risco pode ser uma ferramenta eficaz para a redução da morbidade e mortalidade associada ao câncer de boca (NEVILLE, DAY, 2002, VAN DER WAAL, 2013; ANTUNES et al., 2001; BIAZEVIC et al., 2006).

No entanto, além das campanhas de prevenção, para reduzirmos a mortalidade causada pelo câncer, é fundamental investir na pesquisa sobre detecção precoce dessas lesões, assim como na identificação de indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca. Dessa forma, seria possível agir de forma mais eficaz, insistindo na cessação de hábitos nocivos e utilizando-se terapias quimiopreventivas, por exemplo.

A literatura demonstra que é possível detectar alterações precoces em indivíduos expostos a esses fatores de risco (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007), o que tem incentivado a busca de biomarcadores que sinalizem maior predileção para o

desenvolvimento do câncer bucal. A citopatologia tornou-se uma ferramenta importante neste campo de pesquisa por ser uma metodologia não invasiva, possibilitando a coleta de material biológico em pacientes sem lesão clinicamente, onde uma biópsia não é indicada. Além disso, permite a coleta sistemática de amostras biológicas sem causar danos ao paciente (GEDOZ, 2007).

Por acreditarmos no potencial desse tipo de metodologia utilizamos no nosso trabalho a análise de AgNORs, que é uma técnica quantitativa que analisa a velocidade de proliferação celular, uma das principais alterações que surge ao longo do processo de carcinogênese (DERENZINI et al., 1998; DERENZINI et al., 2000). Esta técnica já demonstrou anteriormente alterações em indivíduos expostos aos fatores de risco, além de ser uma técnica com alta praticidade e baixo custo. Estudos comprovam que indivíduos expostos aos fatores de risco apresentem maiores quantidades de AgNORS, no entanto, também é evidente o caráter individual dessa variação (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007). Por este motivo, decidimos associar a técnica de AgNOR com uma análise molecular de mutações em um gene supressor de tumor.

Neste estudo, além da técnica de AgNOR, validamos uma metodologia para a extração de DNA através da citologia, pois considerando que a carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, o estudo de alterações genéticas é muito importante para avaliar o risco de desenvolver um carcinoma espinocelular no indivíduo. Evidências científicas mostram que a perda de heterozigotidade no locus 9p21 parece ser a mais importante para predição de transformação maligna de leucoplasias bucais (ZHANG et al., 2012).

Um objetivo importante deste estudo foi correlacionar os níveis de AgNOR com a análise molecular da integridade do locus 9p21 onde está localizado o gene supressor tumoral CDKN2A. A análise de AgNOR já mostrou-se bastante útil para verificar alterações na atividade proliferativa de indivíduos fumantes e/ou alcoolistas. A correlação com a perda de heterozigosidade num gene que controla o ciclo celular seria mais uma forma de validar esta análise, mostrando que a velocidade de proliferação celular é um reflexo de alterações no ciclo celular. Nossos resultados mostram uma tendência de maior atividade proliferativa nos pacientes com mutações em 9p21, no entanto, esta não foi estatisticamente significativa.

A falta de diferenças estatisticamente significativas em nosso estudo provavelmente é consequência de uma amostra pequena, visto que não atingimos o número de participantes que o cálculo amostral apontou. Futuros estudos longitudinais e com maiores amostras são necessários para confirmar se essas análises são capazes de prever o surgimento de câncer na cavidade bucal.

O período de latência para que ocorra a transformação maligna é variável e pode ser muito longo, o que dificulta o acompanhamento longitudinal destes pacientes. Portanto, uma forma eficaz de identificar os indivíduos que apresentam risco maior de desenvolver uma neoplasia maligna na cavidade bucal é de extrema importância. Enquanto isso, todos aqueles que são expostos cronicamente ao fumo e álcool, assim como aqueles que apresentam uma leucoplasia devem ser considerados como de risco e acompanhados de perto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BÁNÓCZY, J. Exfoliative Cytology Examinations in the Early Diagnosis of Oral Cancer. *Int Dent J*, v. 26, n. 4, p. 398-404, 1976.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro:INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em 15/05/2015.

DERENZINI, M. et al. Nuclear Function and Size in Cancer Cells. *Am J Pathol*, v. 152, n. 5, p. 1291-1297, 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissue. *J Pathol.*, v.191, n. 2, p. 181-186, 2000.

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*, v. 29, n. 4, p. 231-238, 2007.

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

VAN DER WAAL I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*,v.1, n 18, p 33-37,2013.



PAIVA, R.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analyt Quant Cytol Histol*, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.

ZHANG,L et al .Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles – Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. v 5, n 9, p 1081–1089, 2012.

PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J., PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

6. ANEXOS

Anexo 1

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

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

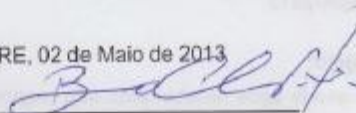
Necessita Apreciação da CONEP:

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
PROPEQ/UFRGS

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

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- pacientes sem lesão

Caro participante,

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

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

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

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

Nome Completo: _____

Telefone: _____

Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

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

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- pacientes com lesão

Caro participante,

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

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

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

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

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

Nome Completo: _____

Telefone: _____

Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

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

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

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

Anexo 3

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

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

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

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

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

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

1.10. Você estudou até:

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

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

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

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

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

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

2.4. Você usa algum produto para bochecho

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

2.5. Com que frequência

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

2.6. Quando iniciou o uso?

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

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

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

3. Fatores comportamentais

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

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos _____

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

3.5 Quantos cigarros por dia _____

3.6 Por quantos anos _____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

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

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

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

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

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

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4. Artrite () () ()

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

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

4.7. Qual ?_____

Anexo 4

TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS AgNORs*

A técnica citoquímica da AgNOR será baseada na técnica descrita por Ploton *et al.* (1986), e segue os seguintes passos:

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

gelatina e, uma em água destilada na temperatura ambiente.

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

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