

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação - Nível Doutorado
Concentração Patologia Bucal

**ESTUDOS SOBRE A APLICABILIDADE DA CITOPATOLOGIA NO
DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CÂNCER BUCAL**

João Batista Burzlaff

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Co-Orientador: Profa. Dra. Carmen Carolina Saavedra

Porto Alegre, agosto de 2007

À minha família, razão de tudo; à Maria Adelaide, meu grande amor, minha esposa e minha
colega, pelo estímulo e cumplicidade em todos esses anos.

Aos meus filhos amados, Vicente e Mauricio, pelo amor, alegria , amizade e companheirismo.

À minha mãe Luiza, que, com amor, mostrou-me o caminho
e lutou para que eu me mantivesse nele.

À minha irmã Duga, que partiu muito cedo, pelo carinho e dedicação em toda minha vida.

“Quanto aos amigos, são o tesouro mais sagrado que temos, pois eles nos foram dados pela virtude, e não pela Fortuna, enquanto todos os outros bens são adquiridos em vista do prazer ou poder que proporcionam.”

Boécio, A consolação da filosofia III, 3

Ao Prof. Pantelis Varvaki Rados, orientador deste trabalho, amigo verdadeiro desde a graduação e por toda a vida, pelo auxílio, estímulo, paciência e trabalho incansável.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Carmen Carolina Saavedra, co-orientadora deste trabalho, a quem conheci no início do curso e que tanto me estimulou com as “coisas da genética”, área a que acabei me dedicando. Por sua disponibilidade e competência, meu agradecimento e minha homenagem.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela formação na graduação e pós-graduação e pela carreira docente.

Ao Prof. João Jorge Diniz Barbachan, pelos ensinamentos e principalmente pela luta e pelo esforço que fizeram com que a pós-graduação desta faculdade revivesse.

Aos Profs. Manoel Santa’Ana Filho e Onofre Francisco de Quadros, pelos ensinamentos e pela alegria do convívio.

Às colegas Marilene, Berenice, Simone e Márcia, pelo convívio e parceria durante esses anos.

À colega Fernanda Visioli, por todo o trabalho e pelo auxílio em tantas tarefas, pela boa vontade e pela vontade de vencer na patologia.

À Isabel Lauxen, pela boa vontade e amizade de sempre.

À professora Edela Puricelli, que me mostrou o caminho da cirurgia, minha mestre e amiga durante tanto tempo.

Ao João Júlio da Cunha Filho e à Deisi Ponzoni, que assumiram muitas tarefas que deveriam ser minhas durante o período do curso.

Ao Prof. Carlos Alberto Mundstock, meu paraninfo, meu padrinho profissional, que tanto me ensinou, pela alegria do convívio no Departamento de Cirurgia e Ortopedia e pela amizade e apoio em momentos difíceis.

À colega Tatiana Wahl Henning, pelo incansável auxílio nas minhas atividades clínicas.

À Colega Rosemary Peshcke, por tantos artigos.

À Kátia e à Mari, secretárias do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, que tanto me auxiliaram.

À Biblioteca da Faculdade de Odontologia, pelo apoio na obtenção dos intermináveis artigos.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
Objetivo geral	13
Objetivos específicos.....	13
ARTIGO 1 - Aspectos moleculares do câncer bucal: revisão da literatura (revista Odonto Ciência).....	14
ARTIGO 2 - Assessment of the pattern of maturation in oral mucosal cells exposed to alcohol or tobacco: a cytohistologic study (revista Cytopathology)	35
ARTIGO 3 - Validação citopatológica da maturação epitelial em mucosa bucal de fumantes e não-fumantes (revista Brazilian Oral Research).....	65
ARTIGO 4 - Extração do DNA de células esfoliadas da mucosa bucal (Revista da Faculdade de Odontologia da UFRGS)	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXO 1	92

RESUMO

O câncer bucal é uma doença que afeta principalmente homens acima de 40 anos com hábito de fumar e beber. Em geral, esses pacientes têm o diagnóstico da enfermidade realizado tardiamente, acarretando tratamentos complexos, mutilantes e de alto custo tanto financeiro como social e de prognóstico sombrio a ponto do câncer bucal apresentar uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 50%. O diagnóstico precoce representa uma alternativa importante para alterar esse panorama. Os recursos de que os profissionais da área da saúde, principalmente os cirurgiões-dentistas, dispõem são o diagnóstico clínico de lesões estabelecidas acompanhado da biópsia com exame histopatológico. Outra alternativa para o diagnóstico precoce dos carcinomas espinocelulares ocorre quando estes são precedidos de lesões cancerizáveis. Nas duas últimas décadas, a utilização da citopatologia como método de diagnóstico de danos celulares prévios ao aparecimento de lesões clínicas possibilitou sua utilização em mucosa bucal. Os estudos apresentados tratam especificamente desta aplicação clínica, abordando: a) os aspectos genéticos do câncer bucal; b) a correlação histocitopatológica de lesões cancerizáveis em câncer bucal e na mucosa normal exposta aos carcinógenos; c) a validação das amostras citopatológicas; d) a padronização da técnica de extração de DNA em células esfoliadas da mucosa bucal

Palavras Chaves : Câncer bucal, Citopatologia bucal, Prevenção do câncer

Bucal, LOH (Perda de Heterozigosidade), Carcinoma espinocelular Leucoplasia

ABSTRACT

Oral cancer affects mainly men over 40 years who are exposed to tobacco and alcohol. These patients usually receive a late diagnosis, which results in complex, mutilating treatments with high financial and social costs, poor prognosis, and, therefore, a 5-year survival rate lower than 50%. Early diagnosis is critical to change this situation. The resources currently available to healthcare professionals, particularly dentists, are the clinical diagnosis of lesions and biopsies for histopathologic examination. Another alternative for the early diagnosis of squamous cell carcinomas is the identification of precursor lesions. In the last two decades, cytopathology has been used as a method to diagnose cell damage that precedes the appearance of clinical lesions, and this use can be extended to the oral mucosa. The studies reported here deal specifically with this clinical application, and discuss: A) the genetic factors in oral cancer; B) the cytohistologic correlation of cancer precursor lesions and the normal mucosa exposed to carcinogens; C) the validation of cytopathologic samples; D) the standardization of the technique to extract DNA of cells exfoliated from the oral mucosa.

Key Words : Oral cancer, Oral Cytopathology, Squamous cells carcinoma early diagnosis, LOH (Loss of Heterozigosity), Squamous cells carcinoma, Leukoplakia

INTRODUÇÃO

A citopatologia em boca foi, durante muito tempo, um método de diagnóstico auxiliar, de baixa credibilidade. Essa baixa confiabilidade era decorrente do grande número de trabalhos que mostravam resultados falso-negativos ou falso-positivos (1-5). Esses achados demonstravam a efetividade limitada da citopatologia no diagnóstico definitivo de lesões de boca, especialmente quando comparada com o exame histopatológico em pacientes com lesões clínicas ou mesmo com suspeita de diagnóstico de carcinoma espinocelular de boca.

Esse quadro começou a se alterar há aproximadamente 15 anos, com a compreensão de que a citopatologia em boca poderia ocupar um espaço significativo no monitoramento de pacientes expostos a fatores de risco para o carcinoma espinocelular porém sem lesão clínica presente (6).

Os estudos iniciais realizados em nosso programa de pós-graduação partiram do pressuposto de que seria possível encontrar alterações citopatológicas na mucosa bucal de pacientes expostos aos carcinógenos empregando os critérios de Papanicolaou e Traut (7), já bastante comprovados na prevenção do câncer de colo de útero. Tanto no estudo de Kapczinski (8) como no de Silva (9), foi possível encontrar diferenças quantitativas nas células descamadas da mucosa bucal. Outro achado importante desses estudos iniciais foi a constatação de que os diferentes sítios anatômicos apresentam diferentes padrões de descamação.

Posteriormente, no trabalho realizado por Peschke (10), onde foi avaliado o padrão citopatológico de leucoplasias de mucosa bucal antes e após a biópsia, os resultados mostraram que, no tempo experimental, o padrão descamativo da mucosa bucal se manteve o mesmo.

Nessa fase, os estudos citopatológicos consideravam a avaliação de toda a lâmina em busca de células que apresentassem aspectos displásicos ou mesmo mudanças neoplásicas, levando em conta as descrições subjetivas propostas por Carvalho (11). Esse tipo de avaliação consumia um tempo considerável, aspecto limitador importante no emprego da citopatologia como recurso de uso rotineiro em clínica.

Paralelamente a isso, no início dessa última década, ficou clara a defasagem existente no conhecimento dos critérios citopatológicos para indicar células suspeitas de malignidade em boca – por um lado, pelo pouco uso da citopatologia em boca; por outro, pelo advento do sistema Bethesda, novo modelo de graduação citopatológica em outros órgãos (12,13). Esses critérios citopatológicos objetivos deveriam ser definidos a partir de estudos específicos de mucosa bucal, com a realização de correlação histocitopatológica confiável, para que pudesse servir de modelo em estudos futuros.

Em meados da década de 90, como uma maneira adicional de aprimorar o diagnóstico precoce de câncer de boca, começaram a ser utilizados métodos citopatológicos de análise buscando avaliar o ritmo de proliferação celular (14-16). Mais recentemente, continuando a busca de aprimoramento na prevenção do câncer bucal, Luhana et alli e Sudbo et alli puderam determinar, em um estudo longitudinal, a aplicabilidade dessas técnicas citopatológicas como um recurso efetivo para o acompanhamento dos pacientes expostos aos carcinógenos bucais.

A perspectiva de se poder avaliar conteúdo e eventuais danos e/ou alterações de DNA representa uma nova alternativa para o uso da citopatologia bucal. As técnicas de extração de DNA e a avaliação dos eventuais danos já são possíveis em nosso meio, porém não estão completamente definidas.

O termo câncer bucal será empregado como sinônimo de carcinoma espinocelular em vários pontos dos estudos apresentados a seguir. Tal escolha se deve a vários fatores, mas principalmente à prevalência quase que absoluta desse câncer sobre os demais na mucosa

bucal, e também ao fato de que o carcinoma espinocelular é, até o momento, o único tipo de câncer de boca com possibilidade de diagnóstico precoce.

Com base no que foi abordado até aqui, pode-se constatar a existência de algumas lacunas no conhecimento da citopatologia bucal se comparada à citopatologia de outros órgãos. A defasagem se explica, em parte, pelo uso da citopatologia como recurso diagnóstico em lesões de mucosa bucal. A baixa especificidade e sensibilidade das técnicas citopatológicas, principalmente quando comparadas com a biópsia e o exame histopatológico, determinaram o seu abandono e o seu descrédito para uso em mucosa bucal.

O entendimento atual da citopatologia bucal, como um recurso no monitoramento de pacientes expostos reforça a necessidade de resolução de algumas lacunas nesse estágio do seu conhecimento.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Contribuir para a definição de critérios citopatológicos confiáveis em mucosa bucal com vistas ao diagnóstico precoce do câncer bucal.

Objetivos específicos

- Estabelecer a correlação histocitopatológica da mucosa bucal com lesões cancerizáveis e câncer bucal e o padrão de maturação da mucosa bucal exposta a carcinógenos.
- Estabelecer a validação dos exames citopatológicos em mucosa bucal.
- Estabelecer alterações celulares morfológicas indicadoras de dano molecular em mucosa clinicamente normal exposta ou não a carcinógenos.
- Estabelecer uma metodologia para extração de DNA de células esfoliadas da mucosa bucal.

ARTIGO 1 - Aspectos moleculares do câncer bucal: revisão da literatura (revista Odonto Ciência)

ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER BUCAL: REVISÃO DA LITERATURA

MOLECULAR ASPECTS OF ORAL CANCER: REVIEW OF THE LITERATURE

João Batista Burzlaff*

Carmen Carolina Saavedra**

Pantelis Varvaki Rados**

* Professor de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. Doutorando em Patologia Bucal, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

** Professor, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é relatar, com base nos achados da literatura, as alterações genéticas relacionadas ao aparecimento do câncer, bem como a utilização da técnica molecular de amplificação de microssatélites para avaliação de perda de heterozigosidade (LOH) na detecção precoce dessas alterações em pacientes que apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de câncer bucal.

Unitermos: Câncer bucal, citopatologia, perda de heterozigosidade, biologia molecular, diagnóstico precoce.

ABSTRACT

This review aimed at reporting the genetic alterations related to oral cancer based on the findings in the literature. In addition, it discusses the possibility of using the microsatellite amplification technique for assessing loss of heterozygosity (LOH) in the early detection of these genetic mutations in patients exposed to risk factors for oral cancer.

Keywords: Oral cancer, cytopathology, LOH, molecular biology, early diagnosis.

INTRODUÇÃO

O conceito do câncer como doença genética é relativamente recente e relaciona o aparecimento dessa doença ao acúmulo de mutações em células somáticas, sendo que estas ocorrem sobre o controle da expressão de uma série de genes controladores do crescimento celular (Ojopi & Neto³³, 2002; Kwitko²³, 2003).

A carcinogênese está diretamente relacionada ao acúmulo de injúrias em diferentes níveis biológicos, as quais provocam alterações morfológicas, genéticas e bioquímicas na célula cancerosa (Ross⁴², 1998; Ogden & Ccowpe²⁹, 1989; Ogden et al.³⁰, 1990; Ogden et al.³¹, 1997; Ogden²⁸, 1997; Ogden et al.³², 1999; Ribeiro & Freire³⁶, 2002; Braakhuis et al.⁵, 2004). Quanto maior o número de divisões celulares que uma célula sofre, maior o número de chances de ocorrerem alterações em seu DNA (Ojopi & Neto³³, 2002).

Com o avanço da biologia molecular, desenvolveram-se técnicas de diagnóstico com sensibilidade crescente para detectar alterações genéticas precocemente (Zhang & Rosin⁵¹, 2001).

Em relação ao câncer bucal, essas técnicas moleculares têm mostrado efetividade para a detecção de risco em pacientes expostos a fatores etiológicos externos (álcool e fumo), bem como no controle de pacientes em fase pós-tratamento de lesões cancerizáveis (Rosin et al.⁴⁰, 2000; Du et al.¹³, 2000; Johnson¹⁹, 2001; Zhang et al.⁵³, 2001; Rosin et al.⁴¹, 2002).

REVISÃO DA LITERATURA

Gene pode ser definido como a unidade física e funcional do cromossomo. Constitui-se de DNA, que codifica um grupo de informações para a síntese de uma proteína específica, ou de um RNA estável (Ross⁴², 1998; Zaha et al.⁵⁰, 2003). O câncer desenvolve-se a partir do acúmulo de mutações somáticas que alteram genes responsáveis por controlar o equilíbrio entre proliferação, morte celular e integridade genômica.

O controle do ciclo celular é feito pelos proto-oncogenes e pelos genes supressores de tumor nos pontos de checagem. Nesse momento, existe a possibilidade de que as mutações genéticas acumuladas alterem o funcionamento dos proto-oncogenes ou genes supressores de tumor, induzindo um crescimento descontrolado e configurando o câncer (Ross⁴², 1998; Kwitko²³, 2003).

CICLO CELULAR

O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose), resultando na produção de uma nova célula (Goodger et al.¹⁷, 1997). O ciclo completo é dividido em fases: G_{zero} (*gap zero*), período de repouso em que a célula sofre uma série de estímulos por fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), hormônios esteróides e citocinas. Tais estímulos são produzidos pela própria célula ou por células vizinhas, as quais deflagram uma série de eventos morfológicos e reações químicas que devem ocorrer de maneira ordenada e sucessiva nas demais fases do ciclo celular; G_1 (*gap um*); S (*síntese*); G_2 (*gap dois*); e M (*mitose*). Durante a transição entre as fases G_1/S e G_2/M , existem pontos críticos (pontos de checagem) do ciclo celular (Figura 1), os quais envolvem sistemas bioquímicos responsáveis pela verificação de danos no DNA. Quando esses sistemas encontram danos no DNA celular que não possam ser reparados, fazem com que a célula receba instrução para entrar em apoptose (Ross⁴², 1998; Belizário³, 2002). Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor apresentam relação com o desenvolvimento do câncer, pois podem apresentar alterações (mutações) provocadas pela ação de carcinógenos endógenos ou exógenos, que aumentam a instabilidade genômica, levando a mutações adicionais que serão perpetuadas nessa linhagem celular (Silva⁴⁶, 2003). A presença de células geneticamente alteradas é um

risco a ser considerado em relação ao desenvolvimento dessa forma de neoplasia (Braakhuis et al.⁵, 2004).

Os proto-oncogenes representam a forma normal dos genes responsáveis pela multiplicação celular e estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celulares e da morte celular programada (apoptose) (Silva⁴⁶, 2003; Ross⁴², 1998).

Apesar da importância dos oncogenes, muitas das propriedades das células tumorais parecem estar associadas à inativação de genes normalmente expressos, os genes supressores tumorais, que estão associados ao controle negativo da proliferação e do crescimento celular (Ojopi & Neto³³, 2002).

Os genes supressores de tumor, quando ativos, impedem o crescimento celular, sendo capazes de deter sua proliferação, mantendo a célula em G_{zero}, fora do ciclo mitótico (Silva⁴⁶, 2003). As mutações dos genes de supressão tumoral são recessivas, só contribuindo para a formação do câncer quando a função dos dois alelos se perde (Ross⁴², 1998). A inativação dos genes de supressão tumoral tem sido explicada por vários mecanismos de perda de heterozigosidade (LOH), como alterações cromossômicas, mutações de ponto e alguns polimorfismos.

Recentemente, uma nova classificação foi proposta, dividindo os genes supressores tumorais em *gatekeepers* (porteiros), *caretakers* (zeladores) e *landscapers* (observadores). Os *gatekeepers* atuam como limitantes no desenvolvimento tumoral; os *caretakers*, que são os genes responsáveis pela integridade do DNA, atuam no reparo e na manutenção da integridade do genoma. Quando mutados, tornam a célula instável, sujeita a novas mutações; os *landscapers* seriam genes nos quais a mutação primária ocasiona um ambiente anormal local, propiciando a ocorrência de mais mutações e, conseqüentemente, favorecendo a formação do tumor (Silva⁴⁶, 2003).

Diversas alterações moleculares associadas ao desenvolvimento de tumores malignos têm sido descritas ocorrendo nos oncogenes e genes supressores de tumor, tais como amplificação gênica (produção de cópias adicionais de um determinado gene, levando a um rápido aumento da síntese de determinado RNA), deleção (perda de um gene ou parte de um gene em um determinado cromossomo), inserção (inclusão de uma seqüência de DNA em ou próximo a um gene, provocando alterações na sua função ou expressão), translocação (ocorre quando uma porção de um cromossomo é removida e fixada em outro cromossomo, podendo levar a perda ou dano na função de determinado gene) e mutações de ponto (alteração em apenas um par de bases em um gene, levando a uma modificação no produto gênico) (Kwitko²³, 2003).

Ao considerar o epitélio escamoso da mucosa bucal, constata-se que esse tecido mostra uma renovação contínua a partir de células germinativas localizadas na camada basal. Essas células foram recentemente denominadas células-tronco adultas, pois são células com capacidade de auto-renovação e de gerar células-filhas, que podem se diferenciar em todos os tipos celulares encontrados no tecido maduro. Esse mecanismo é responsável pela renovação tecidual e pelo reparo de injúrias ao tecido. Desta forma, essas células estão continuamente retornando ao ciclo celular, em que os genes relacionados com proliferação ficam expostos e suscetíveis às ações de agentes externos (Braakhuis et al.⁵, 2004), sendo, portanto, mais sujeitos a carcinogênese, com relação aos demais tecidos bucais.

GENES RELACIONADOS COM O CÂNCER BUCAL

A gênese do carcinoma espinocelular é um processo de múltiplas etapas, no qual as mutações do DNA vão sendo acumuladas nas células epiteliais, ocorrendo em genes responsáveis pela proliferação celular (Kwitko²³, 2003; Epstein et al.¹⁴, 2002; Ojopi & Neto³³, 2002; Ross⁴², 1998; Mao²⁵, 1997). A etiologia dessas mutações pode estar relacionada com

agentes físicos, químicos ou biológicos, iniciando o processo no nível molecular antes que a identificação microscópica ou clínica seja possível (Ogden²⁸, 1997, Cançado et al.⁹, 2001). Essas mutações envolvem, de maneira mais expressiva, os genes supressores de tumor e os genes de reparo do DNA (Ross⁴², 1998; Mao²⁴, 2000).

GENES DE SUPRESSÃO TUMORAL E A CARCINOGENESE BUCAL

Os genes supressores de tumor começaram a ser relacionados com a oncogênese em diversos tipos de tumores malignos. Dentre eles, destacam-se os relacionados com as proteínas p53 e do retinoblastoma (pRB), uma vez que estes sinalizam o controle da senescência replicativa das células somáticas (Yanamoto et al.⁴⁹, 2002).

A pRB é chave no ponto de restrição existente entre as fases G₁ e S do ciclo celular, pois sua fosforilação permite que o ciclo celular prossiga. Outras proteínas regulam a síntese do DNA: c-myc, N-myc, CDC-2, p21, ciclina A, c-myb e o receptor do EGF (Ogden²⁸, 1997; Ross⁴², 1998).

As mutações da pRB, que estão presentes em todos os retinoblastomas, têm sido descritas em sarcomas, carcinomas pulmonares e tumores de mama, sendo raras no câncer bucal. Entretanto, existe evidência na literatura de alguma correlação entre a expressão da pRB e a progressão do câncer bucal, sugerindo que sua superexpressão possa ter um efeito inibidor da apoptose (Pande et al.³⁴, 1988). Em outros estudos realizados por Pavelic (Gleich et al.¹⁶, 1996) e Regezi et al.³⁷ (1999), foi constatada a relação entre a agressividade clínica do carcinoma espinocelular e a alteração na expressão da pRB. A LOH dos genes pRB e p53, simultaneamente, foi associada a um aumento da agressividade do carcinoma espinocelular de boca por Gleich et al.¹⁶, em 1996.

As mutações do gene p53 foram observadas em mais de 60% dos carcinomas espinocelulares da cavidade bucal, indicando que a expressão da proteína p53 mutada está

diretamente associada à malignidade, já que essas mutações não se expressam na mucosa bucal normal nem em tumores intrabuciais benignos (Yanamoto et al.⁴⁹, 2002; Huang et al.¹⁸, 1999; Mao²⁵, 1997). Entretanto, a marcação imuno-histoquímica da expressão da proteína p53 não deve ser utilizada como marcador absoluto de mutação do gene p53, uma vez que ela pode representar a forma selvagem (não mutada) da proteína e, portanto, não associada com a malignidade (Yanamoto et al.⁴⁹, 2002).

O gene p53 é a chave do controle do ciclo celular, garantindo a estabilidade genômica e conduzindo a célula para a diferenciação ou para a apoptose. Sua mutação está associada a modificações precoces em relação à carcinogênese, porém sua superexpressão em lesões cancerizáveis pode significar que a célula tenha interrompido o seu ciclo celular para permitir a reparação do DNA, ou que a célula tenha iniciado o processo de apoptose (em situações em que o reparo não é possível). Pode, ainda, indicar a existência real de uma alteração genética no gene p53 e, conseqüentemente, que o processo de malignização já tenha se iniciado (Yanamoto et al.⁴⁹, 2002; Gleich et al.¹⁶, 1996).

Outra família de proteínas relacionadas com o gene Bcl-2 representam os principais efetores da apoptose. Essa família de proteínas exhibe membros protéicos anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-Xi, Bcl-W, Bfl-1, Bcl-1, A-1) e proteínas pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bcl, Bcl2, Bik, HrK). Todas essas proteínas exibem dois domínios (BH 1 e BH 2), que regulam a formação de dímeros entre os agonistas e antagonistas da apoptose. Desta maneira, se o nível de expressão das proteínas anti-apoptose for superior, os dímeros anti-apoptose prevalecerão, protegendo a célula da morte celular programada (Reed³⁶, 1994). Vários estudos têm associado um aumento na expressão de Bcl-2 em lesões displásicas da mucosa bucal (Miyashita & Reed²⁷, 1992) e em carcinoma espinocelular da cavidade bucal (Jordan et al.²¹, 1996), pois, em condições normais, a apoptose é um caminho eficaz para

eliminar células com o DNA danificado, evitando seu crescimento e progresso para malignidade (Belizário³, 2002).

O gene p21 codifica uma proteína de 21kDa, que é uma inibidora do complexo CDK (ciclina dependente de quinase), necessário para a transição entre as fases G₁ e S durante o ciclo celular, atuando, dessa forma, no controle da proliferação celular determinando a parada do ciclo. A sua superexpressão pode refletir uma mutação do gene p21, com a produção de uma proteína mutada não funcionante. Ainda há estudos que sugerem outras hipóteses para explicar o papel da p21 na estabilização do ciclo celular (Yanamoto et al.⁴⁹, 2002).

O gene p16, localizado na região cromossômica 9p21, controla a síntese da proteína p16, também relacionada com a progressão da fase G₁ para a fase S no ciclo celular. Mutações no gene p16 podem originar presença de uma forma da proteína não funcional ou uma falta da proteína p16, fazendo com que a célula perca essa possibilidade de controle durante o ciclo celular, redundando em proliferação celular descontrolada (Rosin et al.⁴², 2002).

Conforme mencionado anteriormente, mecanismos de inativação de genes supressores tumorais, como o p16, podem ser diferentes entre si. Esses mecanismos são conhecidos pelo termo geral, LOH, já que as mutações deletérias nos mesmos se comportam como recessivas. Assim, é necessária a perda da função dos dois alelos de um supressor tumoral para que a carcinogênese se instale ou prossiga. A estratégia de investigação desse mecanismo geral de LOH consiste na avaliação do estado de zigosidade em regiões de DNA repetitivo presente em trechos muito próximos a genes de supressão tumoral.

Repetições consecutivas de di, tri ou tetra nucleotídeos são comuns no genoma eucarioto, sendo denominadas de microssatélites. A classe de microssatélites melhor caracterizada no genoma humano consiste de repetições CA (ou GT), sendo estimada uma ocorrência de cerca de 100.000 repetições do tipo (CA)ⁿ.

A instabilidade na região de microssatélites (IMS) reflete erros de replicação devido a falhas no sistema de reparo para corrigir as alterações, levando a um aumento na taxa de mutações até um patamar 1.000 vezes maior do que o normal (Spafford et al.⁴⁴, 2001).

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE NOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Estudos comparativos entre tecidos normais e tumorais demonstraram que o alelo normal de um gene supressor tumoral pode ser inativado por mutações somáticas que levam à situação de LOH no loco. Assim, a análise de microssatélites tem sido útil na detecção de LOH em fenótipos tumorais (Arzimanglou et al.¹, 1988).

Os estudos de LOH, que representa a perda de material genético em um dos alelos cromossômicos, estão relacionados aos genes supressores de tumor, já que estes são recessivos e, para expressarem a mutação, é necessário que os dois alelos apresentem a alteração (Ross⁴², 1998; Huang et al.¹⁸, 1999).

Estudos recentes mostram que a LOH em lesões cancerizáveis da mucosa bucal está claramente associada ao risco de progressão maligna (Zhang et al.⁵³, 2001).

Zhang & Rosing⁵¹ (2001) afirmam que os estudos das alterações genéticas nos genes supressores de tumor são importantes para determinar o risco de evolução da carcinogênese.

As seqüências curtas de microssatélite sucessivamente repetidas podem ser utilizadas para detectar LOH, e certas alterações moleculares podem ser identificadas a partir de células descamadas da mucosa bucal (Scully et al.⁴³, 2003).

Os estudos de LOH podem ser realizados em DNA extraído de células esfoliadas da cavidade bucal, obtidas através da utilização de *cytobrush* (Jones et al.²⁰, 1994; Mao et al.²⁴, 2000; Garcia-Closas et al.¹⁵, 2001). Atualmente, a citologia em base líquida vem sendo utilizada com sucesso, apresentando vantagens em relação à distribuição das células de

maneira mais uniforme na lâmina e na preservação da morfologia celular, mantendo o fundo da lâmina mais limpo, o que facilita a interpretação. Adicionalmente, a utilização da técnica em base líquida permite a realização do exame citológico e de detecção de LOH a partir da mesma amostra, bem como de técnicas de marcação imuno-histoquímicas (Zuna et al.⁵⁴, 2001; Dores¹², 2004).

A leucoplasia é a lesão cancerizável mais freqüente da cavidade bucal, sendo definida como uma placa ou mancha branca localizada nas mucosas e firmemente aderida, que não pode ser removida com raspagem e não está associada a nenhuma outra doença diagnosticável. A leucoplasia corresponde a um termo clínico, podendo apresentar variados padrões histopatológicos de maturação epitelial, apresentando desde hiperkeratose até displasia epitelial (Martins & Barbachan², 1994; Rodrigues et al.³⁹, 2000), e sua transformação em carcinomas é estimada entre 4 a 6% do total de lesões (Marcucci²⁶, 1977).

Califano et al.⁸, em 1996, estabeleceram um modelo de progressão genética para o carcinoma espinocelular no qual genes supressores tumorais e oncogenes estão implicados na evolução desde a mucosa bucal normal até a invasão. De acordo com esses autores, na transição da mucosa normal para uma hiperplasia, existiria uma alteração genética em 9p21, que contém o gene p16. Na evolução até uma displasia, existem alterações em 3p e 17p, alterações em 11p e 13q presentes na alteração até carcinoma *in situ* e alterações em 6p e 4q na evolução até a invasão.

Estudos realizados por Spafford et al.⁴⁴, em 2001, a partir de células esfoliadas em pacientes com carcinoma espinocelular da cavidade bucal mostraram que as alterações genéticas relacionadas ao surgimento dessas neoplasias iniciam com a LOH na região 9p, que está associada com a transição de mucosa normal para uma mucosa apresentando hiperplasia epitelial sem alterações displásicas. A presença de alterações displásicas no epitélio está associada à LOH em 3p e 17p, e o surgimento do carcinoma invasivo está relacionado com

alterações cromossômicas 4q, 6p, 8p, 11q, 13q e 14q, apontando uma possibilidade de determinação de risco a partir da análise molecular de pacientes com lesões cancerizáveis. Essa possibilidade também é ressaltada no estudo de MAO, em 1997, no qual foi verificada uma associação entre a LOH em 9p21 e/ou 3p14 e uma maior possibilidade de progressão de leucoplasia para carcinoma.

Lesões epiteliais da mucosa bucal que mostravam LOH em 3p e em 9p apresentavam risco de progressão maligna, que aumenta se ocorrerem novas LOH em outro *locus*. Essas alterações podem ser analisadas e identificadas a partir da análise de células esfoliadas obtidas através de técnica não-invasiva. A confirmação desses achados sinaliza para uma efetiva ação em relação à supressão dos fatores de risco (Zhang et al.⁵², 2000; Braakhuis et al.⁵, 2004; Rosin et al.⁴⁰, 2000).

Zhang & Rosin⁵¹ (2001) examinaram longitudinalmente 116 biópsias de pacientes com lesões bucais cancerizáveis, analisando a LOH em sete braços de cromossomos (3p, 4q, 8p, 9p, 11q, 13q e 17p) para identificar o risco de progressão maligna. Os autores verificaram que as lesões que progrediram para câncer apresentaram não apenas um elevado número de LOH como também um padrão característico de LOH nos braços cromossômicos estudados. Das lesões progressivas, 97% apresentavam LOH em 3p14 e/ou 9p21, sugerindo que a LOH nesses braços é um pré-requisito para a progressão. Entretanto, essa alteração por si só não é suficiente para provocar uma transformação maligna, existindo a necessidade de perdas adicionais em outros cromossomos para que isso ocorra. A partir desses achados, os autores determinaram três grupos de risco em relação à transformação maligna: baixo risco (não há LOH em 3p e 9p), risco intermediário (LOH no 3p e/ou 9p) e alto risco, com perda nos dois *loci*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular representa aproximadamente 95% do total de neoplasias malignas (Brasil^{6,7}, 2002). Apesar do desenvolvimento tecnológico para o diagnóstico e tratamento do câncer de boca associado à evolução do conhecimento que ocorreu nos últimos anos, a expectativa de sobrevivência tem se mantido inalterada desde a década de 1950 (Bercht⁴, 1994). Para que esses dados apresentem diminuição, são necessárias medidas que estimulem massivamente o abandono dos fatores de risco (álcool e fumo), bem como o treinamento adequado dos profissionais da odontologia, visando a detecção precoce de lesões (Bercht⁴, 1994; Wunsch-Filho & De Camargo⁴⁸, 2001). Uma outra alternativa que se vislumbra atualmente nesta busca de diagnóstico inicial do câncer bucal seria o estímulo ao desenvolvimento e à padronização de técnicas para a determinação do risco de desenvolvimento de câncer antes do estabelecimento da lesão clínica.

Em relação à prevenção do câncer bucal, a realização de análise do material genético das células obtidas por raspado da mucosa pode representar um avanço neste caminho de prevenção (Carvalho¹⁰, 1995; Sugerman, 1996⁴⁷; Kapczinski²², 1997; Ogden²⁸, 1997; Silva⁴⁵, 1997; Peschke, 1999³⁵). Os estudos atuais citados nesta revisão apontam para uma possível correlação entre citologia, morfologia e testes moleculares, criando-se um modelo de predição do risco de câncer bucal. Esses métodos podem ser testados em pacientes expostos aos carcinógenos bucais, que apresentem ou não lesões cancerizáveis ou mesmo em regiões de maior prevalência de câncer bucal, contribuindo para a mudança positiva na qualidade dos dados epidemiológicos de morbimortalidade do câncer bucal na população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arzimanglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumours. *Cancer* 1998; 82(10): 1808-20.
2. Martins MD, Barbachan JJD. Leucoplasia: revisão de literatura e apresentação de caso clínico. *Rev Fac Odontol* 1994; 35(2): 20-2.
3. Belizário JE. Reverter o câncer. *Ciência Hoje* 2002; 31(184): 50-7.
4. Bercht SB. O câncer de boca sob o modelo odontológico hegemônico [tese de doutorado]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 1994.
5. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(6): 317-22.
6. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2001. Disponível em: http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa_2001/. Acesso em: 15 mar 2002.
7. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Prevenção e detecção: fatores de risco. Disponível em: <http://www.inca.org.br/prevencao/fatores.html/>. Acesso em: 15 mar 2002.
8. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11): 2488-92.
9. Cançado RP, Yurgel LS, Santanna Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *Oral Oncol* 2001; 37(5): 446-54.
10. Carvalho G. *Citologia oncológica*. São Paulo: Atheneu; 1995.

11. Carvalho G. Citologia oral. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
12. Dores GB. A citologia em meio líquido e o sistema DNA-CITOLIQ. Disponível em: <http://www.dnacitoliq.com.br/noticias/atualiz.htm>. Acesso em: 19 maio 2004.
13. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000; 29(2): 80-5.
14. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002; 68(10): 617-21.
15. Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T, et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(6): 687-96.
16. Gleich LL, Li YQ, Biddinger PW, Gartside PS, Stambrook PJ, Pavelic ZP, et al. The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 supressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. *Laryngoscope* 1996; 106(11): 1378-81.
17. Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins: an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 1997; 33(2): 61-73.
18. Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, et al. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol* 1999; 35(3): 296-301.
19. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001; 65(4): 328-39.
20. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The cytobrush plus collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77(1): 101-4.

21. Jordan RCK, Katsavellos GC, Barret AW, Apeight PM. Differential expression of BCL2 and BAX in squamous cells carcinoma of the oral cavity *Oral Eur J Cancer* 1996; 32: 6304-11.
22. Kapczinski MP. Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através do uso da citologia esfoliativa [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
23. Kwitko K. A carcinogênese e seus agentes. In: Kwitko K. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance; 2003. p. 325-38.
24. Mao L. Can molecular assessment improve classification of head and neck premalignancy? *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 321-2.
25. Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today* 1997; 3(10): 442-8.
26. Marcucci G. Lesões cancerizáveis da mucosa bucal. *Rev Paul Odontol* 1997; 19(2): 22-7.
27. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 transfer increases relative resistance of S491 and WEH172 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992; 52(19): 5407-11.
28. Ogden GR. The future role of oral exfoliative cytology – bleak or bright? *Oral Oncol* 1997; 33: 2-4.
29. Ogden GR, Cowpe JG. Quantitative cytophotometric analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1989; 27(3): 224-8.
30. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990; 19(2): 53-5.
31. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med* 1997; 26(5): 201-5.

32. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21(2): 126-30.
33. Ojopi EPB, Neto ED. Genes e câncer. *Biotechnol Ciência Desenv* 2002; 27: 28-37.
34. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. PRB and p16 protein alteration in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998; 34: 396-403.
35. Peschke R. Avaliação citopatológica das leucoplasias da mucosa bucal antes e após biópsia [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
36. Reed JC. BCL2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
37. Regezi JA, Dekker NP, Macmillan A, Ramirez-Amador V, Menezes Garcia A, Ruiz-Godoy LM, et al. E p53 p21, rb, and MDM2 proteins in tongue carcinoma from patients 75 years. *Oral Oncol* 1999; 35: 379-83.
38. Ribeiro EMSF, Freire-Mai N. Câncer: causas, prevenção e tratamento. *Ciência Hoje* 2002; 32(189): 34-9.
39. Rodrigues TLC, Costa LJ, Sampaio MCC, Rodrigues FG, Costa ALL. Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológica. *Pesq Odontol Brasil* 2000; 4(4): 337-61.
40. Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 357-62.
41. Rosin MP, Lam WL, Poh C, Le ND, Li RJ, Zeng T, et al. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6447-50.
42. Ross DW. Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. New York: Springer-Verlag; 1998. 168 p.

43. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(5): 251-6.
44. Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cell by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3): 607-12.
45. Silva MCA. Citopatologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
46. Silva J. Genética toxicológica. Porto Alegre: Alcance; 2003.
47. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 1996; 41(2): 71-4.
48. Wünsch-Filho V, Camargo EA . The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Semin Oncol* 2001; 28(2): 158-68.
49. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. P53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(5): 593-600.
50. Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP, orgs. *Biologia molecular básica*. 3ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto; 2003.
51. Zhang L, Rosin MP. Loss of heterozygosity: a potencial tool in management of oral premalignant lesions? *J Oral Pathol Med* 2001; 30(9): 513-20.
52. Zhang L, Cheng X, Li Y, Poh C, Zeng T, Priddy R, et al. High frequency of allelic loss in dysplastic lichenoid lesions. *Lab Invest* 2000; 80(2): 233-7.
53. Zhang L, Cheung KJ Jr, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R, et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer* 2001; 91(11): 2148-55.

54. Zuna RE, Moore W, Dunn ST. HPV DNA testing of the residual sample of liquid-based pap test: utility as a quality assurance monitor. *Mod Pathol* 2001; 14(3): 147-51.

Autor correspondente:

Pantelis Varvaki Rados

Av. Benjamim Constant, 1440/302

CEP 90550-002 – Porto Alegre, RS – Brazil

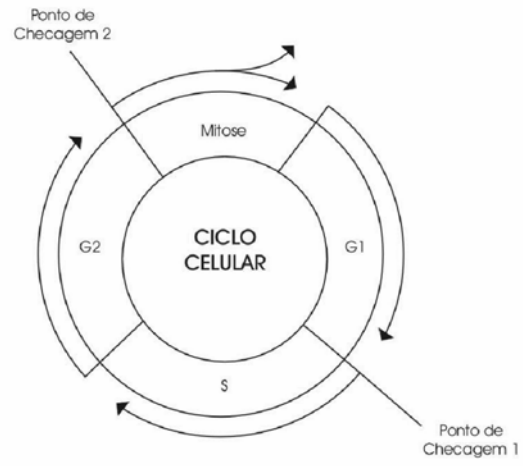
E-mail: pantelis@ufrgs.br; joaoburz@gmail.com

Fone: (51) 33371020, (51) 3316.5021

Legenda da figura:

Figura 1. Representação esquemática do ciclo celular com suas fases e pontos de checagem
(adaptado de Belizário JE Ciência Hoje 2002)

Figura 1



ARTIGO 2 - Assessment of the pattern of maturation in oral mucosal cells exposed to alcohol or tobacco: a cytohistologic study (revista Cytopathology)

Assessment of the pattern of maturation in oral mucosal cells exposed to alcohol or tobacco: a cytohistologic study

Running headline: Maturation in oral mucosal cells exposed to alcohol and tobacco

João Batista Burzlaff, DDS, MS¹; Paula Luce Bohrer, DDS, MS¹; Ricardo Losekan Paiva, DDS, MS¹; Manoel Sant'Ana Filho, DDS, PhD²; Vinicius Duval da Silva, MD, PhD³; Pantelis Varvaki Rados, DDS, PhD²

¹ Graduate Program in Dentistry, Department of Oral Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. ² Professor, Graduate Program in Dentistry, Department of Oral Pathology UFRGS, Porto Alegre, Brazil. ³ Professor, Department of Pathology and Radiation, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

This study received grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazilian Council for Scientific and Technological Development - CNPq, Brazil) and Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Coordinating Agency for Advanced Training of Graduate Personnel - CAPES, Brazil).

Corresponding author:

Pantelis Varvaki Rados

Av. Benjamim Constant, 1440/302 – CEP 90550-002 – Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: +55-51-3316-5011/5023 – Fax: +55-51-3316-5023

E-mail: pantelis@ufrgs.br

Abstract

Objective: To assess the maturation pattern of oral mucosal cells of patients exposed to tobacco and alcohol.

Methods: 1) *Group without lesions.* Smears obtained from the lower lip, border of the tongue and floor of the mouth of 31 control individuals (Group I), 49 tobacco users (Group II) and 27 tobacco/alcohol users (Group III) were stained using the Papanicolaou method. The first 100 cells counted on of each smear determined the maturation pattern and the keratinization index (KI). Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple comparisons test were used for statistical analysis, at a 5% significance level. 2) *Group with lesions.* Cytopathologic and histopathologic studies were conducted for 15 patients – 8 with leukoplakia without epithelial dysplasia, 2 with epithelial dysplasia, and 5 with squamous cell carcinomas.

Results: 1) *Group without lesions.* Statistical analysis revealed a smaller number of superficial cells with nucleus in all sites of the group of tobacco/alcohol users (Group III) than of the control group (Group I), and this difference was statistically significant ($p < 0.005$). 2) *Group with lesions.* The severity of histopathologic findings increased with the increase in the number of cells of the deeper epithelial layers, with a statistically significant difference in the number of intermediate ($p = 0.013$) and parabasal cells ($p = 0.049$), which increased with the severity of the epithelial maturation disorder: leukoplakias with dysplasia had a greater number of intermediate and parabasal cells than leukoplakias without dysplasia; and the number in squamous cell carcinomas was greater than in leukoplakias with dysplasia.

Conclusion: The maturation pattern of cells in the three anatomic sites showed changes that may be associated with the synergistic effect of tobacco and alcohol. Also, the severity of histopathologic findings was associated with the increase in the number of cells in the deeper epithelial layers.

Key words: normal oral mucosa, oral cytopathology, maturation pattern.

Introduction

Squamous cell carcinoma is the most frequent malignant carcinoma of the oral region.¹ To detect it as early as possible, studies have assessed the effects of tobacco and alcohol on the normal oral mucosa.² For ethic reasons, these studies use material from necropsy³ or animals.⁴ Cytopathology is a non-invasive, simple and low-cost method that can be used to assess changes in the oral mucosal cells.⁵⁻⁹ However, studies using the Papanicolaou and Traut classification system have not reported significant results to recommend this method as a tool for early detection of precursor lesions in oral mucosal cells of individuals at risk of squamous cell carcinoma.¹⁰⁻¹² Changes in epithelial maturation patterns resulting from the action of tobacco have been observed, but these findings are still contradictory. Tobacco smoking increases keratinization¹³⁻¹⁶ and delays the maturation of normal oral mucosal cells.¹⁷ Part of these contradictory findings may be assigned to the fact that there are no data correlating the maturation patterns of oral mucosa that already has leukoplakia or carcinomas. This study assessed the maturation pattern of cells exposed to tobacco and alcohol in the normal oral mucosa and in mucosa with leukoplakia or squamous cell carcinoma.

Materials and methods

Participants were recruited among patients seen at the healthcare center of the Porto Alegre Water and Sewerage Department (Departamento Municipal de Água e Esgotos - DMAE) and at the Traumatology and Surgery Outpatient Service at the School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, southern Brazil.

Group of participants with normal oral mucosa (cytopathologic evaluation)

Male patients older than 30 years were randomly selected. Clinical history was obtained according to a specific protocol, and all patients underwent clinical examination of the oral cavity. Exclusion criteria were: systemic diseases; past or current history of benign or malignant tumors; and presence of lesions, except gingivitis and periodontitis.

Based on clinical history, patients were divided into three groups: Group I (control) - patients that had never smoked or had stopped smoking more than 10 years ago; Group II (tobacco) - patients that smoked at least 20 filter cigarettes/day for at least one year, or 10 filter cigarettes/day for more than 10 years;¹¹ Group III (tobacco/alcohol) - patients that smoked at least 20 filter cigarettes/day for at least one year, or more than 10 filter cigarettes/day for more than 10 years, and drank, on average, one glass of any alcoholic beverage every day for at least one year.

Of the 129 patients examined, 107 were included in the study: 31 in the control group (Group I), 49 in the tobacco group (Group II), and 27 in the tobacco/alcohol group (Group III).

Smears were collected from three anatomic sites of the mouth with a wooden spatula: lower lip, border of the tongue, and floor of the mouth. Before smear collection, patients were instructed to remove prostheses and to rinse the mouth with water for 1 minute. The material was spread onto a labeled glass slide for microscopy. Slides were fixed in 100% alcohol and stored in plastic vials.

The slides were stained by the Papanicolaou technique. Qualitative analysis was conducted according to the criteria set in the Papanicolaou and Traut¹⁸ classification system for the identification of malignant cells.

A Zeiss[®] Standard 20 binocular microscope equipped with a planachromatic objective lens was used for microscopic analyses. Two observers blinded to patients' history examined

the maturation pattern in all fields of each slide. One hundred distended and isolated cells were counted on each slide horizontally, from left to right, at 400-x magnification.¹⁹ Cells were classified as anucleated, superficial with nucleus, intermediate, and parabasal. The keratinization index (KI = anucleated and superficial cells with nucleus divided by the number of total cells) was also analyzed (Figure 1).^{14,15}

Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple comparison test were used to compare age between groups, and to assess the maturation pattern of cells and the keratinization index between anatomic sites of the same group and between the three groups: control (Group I), tobacco (Group II) and tobacco and alcohol (Group III). An unpaired *t* test was used to analyze the number of cigarettes smoked daily in each group. The level of significance was set at 5% for all tests.

Group with lesions (cytologic evaluation)

Participants with leukoplakia or squamous cell carcinoma were recruited among patients referred to the Traumatology and Surgery Outpatient Service of the School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, from January 2000 to December 2004. For all patients that agreed to participate in the study, two forms were filled out: one with personal data and information about exposure to etiology factors of leukoplakia or squamous cell carcinoma (tobacco, alcohol, hot drinks such as coffee or tea); and one requesting histopathologic and cytopathologic studies. The definition of leukoplakia and the histologic criteria for the definition of epithelial dysplasia were the same described by the World Health Organization (WHO) in 1978.²⁰ Before smear collection, patients were instructed to remove prostheses and to rinse the mouth with 0.12% chlorhexidine digluconate. Smears were collected with a cytobrush and immediately placed in labeled tubes with Digene Specimen Transport Medium™. After smear collection, leukoplakia biopsy was performed

under local anesthesia with a # 15-blade scalpel. The type of biopsy indicated was partial in lesions larger than 1 cm or with erythroplakia, which were obligatorily performed. Biopsy specimens were immediately fixed in 10% buffered formalin. Samples and their accompanying forms were sent to the Oral Pathology Laboratory for routine histopathologic processing. Modified Papanicolaou staining was used for cytopathology, and hematoxylin-eosin staining, for histopathology.

Samples were identified by numbers, and observers were blinded to patient information while performing the analysis. Cytologic smears were analyzed in all their extension horizontally, from left to right, at 400-x magnification.

Qualitative analysis of smears was performed according to the Papanicolaou and Traut classification.¹⁸

Quantitative analysis

The first 100 cells were randomly counted. Only well-distended and isolated cells were counted, at a 400-x magnification. For the group of patients with lesions, statistical analysis was conducted with the Kruskal-Wallis test to compares all groups, followed by the Mann-Whitney test to compare groups two by two.

Informed consent was obtained from all patients included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Results

Cytology group

Mean age was 45.8 ± 9.31 years in the control group (31 patients), 43.3 ± 9.21 years in the tobacco group (49 patients), and 45.92 ± 5.75 years in the tobacco/alcohol group (27

patients). A statistically significant difference was found in age in the comparison of the control and tobacco groups with the tobacco/alcohol group (Group III). Mean number of cigarettes smoked daily was 20.81 ± 9.42 in the tobacco group (Group II) and 28.03 ± 15.12 in the tobacco/alcohol group (Group III), and this difference was statistically significant. Mean number of glasses of alcoholic beverages drunk daily in Group III was 5.66.

The maturation pattern was analyzed by two observers with interobserver kappa values of 0.82 and 0.85 in comparison with an expert cytopathologist. Qualitative analysis was also conducted by two observers with interobserver kappa values of 0.49 and 0.84 in comparison with an expert cytopathologist. Five slides displaying less than 100 cells were excluded: 2 from Group I (control), 2 from Group II (tobacco), and 1 from Group III (tobacco/alcohol). Slides excluded according to anatomic sites were: 1 of border of the tongue from Group I (control) and another from Group II (tobacco); of floor of the mouth, 2 were excluded from Group I (control), 1 from Group II (tobacco), and 1 from Group III (tobacco/alcohol).

Table 1 shows the distribution of frequency of smears according to the criteria used in the analysis of morphology of malignant cells and to the Papanicolaou and Traut classification.¹⁸ No smear showed epithelial cells with characteristics of malignancy.

A smaller number of superficial cells with nucleus was found in the three anatomic sites of Group III (tobacco/alcohol) than in the control group, and this difference was statistically significant ($p < 0.05$). A greater number of anucleated cells was found in lower lip smears than in the border of the tongue and floor of the mouth smears in the three groups, and this difference was statistically significant ($p < 0.05$). A greater number of superficial cells with nucleus were found in the border of the tongue than in the lower lip or floor of the mouth, and these differences were statistically significant ($p < 0.05$). A greater number of intermediate cells was found in the floor of the mouth smears than in the border of the tongue or lower lip smears, and differences were statistically significant ($p < 0.05$) (Tables 2 to 4). No statistically

significant differences were found in the comparison of keratinization index between the three groups analyzed in the three anatomic sites (Table 5).

Groups with lesion

Fifteen patients were included in the study according to inclusion criteria: 8 patients had leukoplakia without dysplasia; 2 had leukoplakia with dysplasia; and 5 had squamous cell carcinoma. Of the cases of leukoplakia without dysplasia, 3 were diagnosed as hyperkeratosis; 4 as epithelial hyperplasia with hyperkeratosis, and 1 as acanthosis.

Nine of the patients were men. Patient age ranged from 37 to 68 years, and mean age was 50.2 years. Tables 6 and 7 show data for the patients included in the study.

The comparison of the 3 groups revealed a statistically significant difference in the number of intermediate ($p=0.013$) and parabasal cells ($p=0.049$), which increased with the severity of the epithelial maturation disorder: leukoplakias with dysplasia had a greater number of intermediate and parabasal cells than leukoplakias without dysplasia; and squamous cell carcinomas had a greater number than leukoplakias with dysplasia.

The separate comparison of leukoplakia with and without dysplasia revealed a significant difference in the number of parabasal cells ($p=0.046$). A significant difference was found in the comparison of leukoplakias without dysplasia and squamous cell carcinomas in the number of intermediate ($p=0.005$) and parabasal ($p=0.017$) cells. However, the comparison of leukoplakias with dysplasia and squamous cell carcinomas revealed a borderline effect in the number of anucleated squamous cells ($p=0.052$).

The qualitative analysis of leukoplakias without dysplasia revealed that 2 lesions were class I, and 3 were class II and III of the Papanicolaou classification; of the lesions with dysplasia, 1 was class II and one, class III; and of the squamous cell carcinomas, 2 were class III and 3 were class V.

Discussion

Although oral cytologic examination is very sensitive for oral cancer detection, similarly to cervical cytology, biopsy remains indispensable for a final diagnosis.^{6,8,9} Cytologic studies may be useful as a screening tool for the assessment of cellular changes in the apparently normal mucosa, in which case a biopsy is not indicated. This study evaluated the oral mucosa of individuals at the highest risk of developing oral cancer – men over 30 years exposed to tobacco and alcohol – and the most prevalent anatomic sites for the development of this neoplasia.¹ The correlation of histopathologic and cytopathologic findings in our studies shows that, although patient sample was small, findings are promising and partially in disagreement with those reported by other authors,^{14,15} who suggested that cytopathology is not a valid method to identify cell changes in the oral mucosa of patients with lesions.

According to Silverman, Bilimoria & Bhargava, oral mucosa leukoplakia usually has a thick layer of keratin on its surface, and this fact should explain the high rates of false-negative cytopathologic findings. Our results also showed a thick layer of keratin on leukoplakias, but it was possible to find quantitative signs of cell changes (Figures 1,2,3 and Tables 6 and 7). Epstein and Scully²¹ and Dabelsteen et al.²² suggest that hyperkeratotic leukoplakias show little cell atypia due to the scarcity of cells in leukoplakia smears, a problem that may be overcome by the use of current more advanced collection techniques, such as the use of cytobrushes or liquid-based cytology.^{23,24} Analyses with liquid-based cytology are easier because it produces a cleaner smear, without food debris or mucus.¹¹ Studies about cervical cytology have shown an increase in diagnostic sensitivity with the use of liquid-based cytology.²⁵ Although our study is preliminary and our sample was small, results suggest a change in the cytopathologic pattern of the epithelium in leukoplakias. As

the epithelial maturation disorder increases, an increase in the number of intermediate or parabasal cells is also observed (Figures 1,2,3 and Tables 6 and 7). Studies with larger samples may determine specific cytopathologic patterns for each histopathologic condition, especially if the proportional quantification of cell types is introduced. Longitudinal studies are necessary to determine the accuracy and applicability of this method, and long-term follow-up studies of patients with lesions that may become cancerous should be conducted to confirm that changes in these proportions during carcinogenesis are detectable by cytopathology.

Clinically normal mucosal smears did not have abnormal cells, differently from findings reported in previous studies that used the same classification.¹⁰⁻¹² The analysis of these findings should take into consideration that dysplastic changes in the oral epithelium first arise in deeper layers,²⁰ and that normal oral mucosal smears are composed of cells from superficial, intermediate and, rarely, parabasal layers. The maturation pattern in this study was very specific of each anatomic site, similarly to what has already been demonstrated in other studies.^{10,12} Greater numbers of anucleated cells were found in the lower lip; of superficial cells with nuclei, in the border of the tongue smears; and of intermediate cells, in the floor of the mouth. Alcohol and tobacco are associated to cell shrinkage,³ and, therefore, an increased number of parabasal cells in tobacco/alcohol users (Group III) was expected. However, no statistically significant difference in the number of parabasal cells was found in the group of individuals without apparent lesions. This study found a smaller number of superficial cells with nucleus and a trend towards an increased number of intermediate cells in individuals exposed to tobacco and alcohol, which may be indicative of early malignant changes. Similar findings have been reported by Ogden and Cowpe,²⁶ Kapczinski,²⁷ Silva and Rados.²⁸ Our study confirmed that, as the severity of the lesion increases, the number of cells in the deeper layers of epithelium also increases. In leukoplakias without dysplasia, the greatest numbers

were found for superficial cells with nucleus (71.88%), and anucleated squamous cells (25.72%) No parabasal cells were found. This type of cell is found in epithelial dysplasias and, in greater numbers, in squamous cell carcinoma, and there is a statistically significant difference ($p=0.046$) between leukoplakia with and without dysplasia. The number of intermediate cells also increases with severity of lesion: a significant difference was found in number of intermediate cells when leukoplakias without epithelial dysplasia and squamous cell carcinomas were compared. Besides the increase in the number of intermediate and parabasal cells, there is a trend towards a decrease in the number of more superficial cells, the anucleated squamous cells. There is a borderline effect ($p=0.051$) on the difference of number of these cells between epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas (Figures 1,2,3 and Tables 6 and 7).

In this study, most smears were classified as Papanicolaou class I and II. The oral cavity is exposed to agents that may produce persistent subclinical inflammations. Therefore, we believe that the distinction between Papanicolaou class I and II smears does not have clinical relevance and complicates compliance with the cytopathologic diagnosis. The development of a specific classification model for the oral cavity may be more efficient than the adaptation of the Papanicolaou classification of cervical smears for use in oral cytopathology.

The low cost of the Papanicolaou technique makes it an ideal tool for screening patients exposed to risk factors for oral cancer. It is also useful in the assessment of the maturation pattern of cells, and provides a rapid quantitative analysis that takes about 20 minutes per slide.

Several studies have investigated the maturation of the normal oral mucosa exposed to tobacco.¹³⁻¹⁷ The initial purpose of this study was to evaluate the action of alcohol alone. However, this was not possible because of the difficulties in finding individuals exposed only

to alcohol. Also, the different criteria used for the classification of cells made it impossible to compare our findings with those reported in some other studies. The analysis of studies that used the same criteria for cell classification showed that they found an increase in the keratinization index of the hard palate, dorsum of the tongue and buccal mucosa.¹⁴

In a study of reverse female smokers, the keratinization index in the border of the tongue and hard palate was increased, but no difference was found in the buccal mucosa when women were compared with a control group.¹⁵ No changes in the keratinization index resulting from tobacco and alcohol effects were found. This may be explained by the fact that the anatomic sites examined (lower lip, border of the tongue and floor of the mouth) were not as exposed to the action of carcinogen agents as the hard palate. In our study, the only statistically significant difference was the reduction in number of superficial cells with nucleus in the three anatomic sites assessed when exposed to the synergistic action of tobacco and alcohol (Tables 2 to 4). A previous study using the same methodology reported a reduction of this cellular type in the border of the tongue exposed to tobacco.¹² The synergism of tobacco and alcohol may increase the speed of epithelium maturation, to the point that most superficial cells have a nucleus typical of intermediate cells. Although it was not statistically significant, a trend towards a greater number of intermediate cells was found in Group III (tobacco and alcohol) when compared with Group I (control) (Tables 2 to 4).

Another aspect of the cytopathologic examinations is the qualitative assessment that classifies results according to the criteria established by Papanicolaou and Traut.¹⁸ In our study, according to these classification criteria, 6 lesions (75%) without dysplasia were class I or II, which is in agreement with findings in the literature.^{12,27,28} However, 2 lesions (25%) were class III, which is unusual for typically benign lesions. Of the dysplasias, one was class III, which suggests dysplastic changes. However, the other case of epithelial dysplasia was class II, which indicates that cytology did not detect the dysplastic changes. Such finding

should draw attention to the possibility of false-negative results. Of the 5 carcinomas in the sample, 2 were class III, which indicates the presence of dysplastic changes. Therefore, cytology was not able to diagnose malignant neoplasia in these cases. These findings are in agreement with those reported by Epstein and Scully, who found an important number of false-negative results in the cytopathologic assessment of leukoplakias.

Studies using similar criteria of cell classification only investigated the keratinization index, and did not report individual percentages for each cell type.^{14,15}

The possibility of establishing a keratinization index or a deep cell index may, in the future, provide additional information for the effective prevention of oral cancer with the use of the Papanicolaou and Traut criteria.¹⁸

Carcinogenesis is a long process,²⁹ and, therefore, several markers have been used in oral cytopathology to detect early cell changes. In the epithelial cells of the oral mucosa exposed to carcinogens, an increase both in number of micronuclei^{30,31} and in the number and area of AgNORs was observed.¹¹ Also, other forms to evaluate changes in epithelial cells have been used.^{11,32} As the investigation for these markers is costly, they should be indicated only after Papanicolaou screening.

Oral cytopathology has been used as a resource for the early detection of morphologic changes or changes in cell maturation before the clinical appearance of oral mucosal lesions.^{23,26,33,34}

We suggest that the classification of cell types in oral smears may be used as a basis for standardization of new studies and for the assessment of other collection methods, which would improve the follow-up of patients with high risk of developing squamous cell carcinoma. This preliminary study demonstrated that the number of intermediate and parabasal cells increases in direct relation to increases in the histopathologic severity of the

epithelial lesion and to increases in the number of intermediate cells in cytopathologic examination of the oral mucosa of patients exposed to carcinogens.

The morphology of oral epithelial tissue is very different from that of cervical epithelium, and each oral site has different morphologic characteristics and degrees of epithelial maturation.^{10,12,27,28,35} Variations due to age have also been reported.¹⁰ In cervical cancer, lesions are squamous and remain superficial (carcinoma in situ) for a long time. However, in the oral cavity, the lesion is invasive and non-squamous, which may complicate its cytopathologic diagnosis. Silva²⁸ found parabasal cells in the normal mucosa of the tongue and floor of the mouth of patients not exposed to carcinogens, and suggested that, although not frequent, the presence of these cells may be a normal characteristic of these anatomic sites. Montgomery and Von Haam¹⁰ found that, in leukoplakia smears, intermediate cells were predominant in the buccal mucosa when compared with other anatomic sites.

Therefore, based on our findings, we conclude that:

- There is cytopathologic variation in the mucosa of patients exposed to carcinogens, demonstrated by an increase in the number of cells in the deepest layers.
- A cytohistologic correlation may exist in which the severity of the morphologic condition is indicated by an increase in the number of cells from the deepest layers demonstrated in cytopathologic examinations.

References

1. Rich AM, Radden BG. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. *J Oral Pathol* 1984; 13: 459-71.
2. Llewelyn J, Mitchell R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10 year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1994; 32: 146-52.
3. Valentine JA, Scott J, West CR, St Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol* 1985; 14: 654-65.
4. Maier H, Weidauer H, Zoller HK, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 387-91.
5. Banoczy J, Rigo O. Comparative cytologic and histologic studies in oral leukoplakia. *Acta Cytol* 1976; 20: 308-12.
6. Silverman S Jr, Bilimoria KF, Bhargava K, Mani NJ, Shah RA. Cytologic, histologic and clinical correlations of precancerous and cancerous oral lesions in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Acta Cytol* 1977; 21: 308-12.
7. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez E. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral* 2004; 9: 197-203.
8. Shklar G, Cataldo E, Meyer I. Reliability of cytologic smear in diagnosis of oral cancer. *Arch Otolaryngol* 1970; 91: 158-60.
9. Allegra RS, Broderick AP, Corvese N. Oral cytology. seven year oral cytology screening program in the state of Rhode Island. Analysis of 6448 cases. *Acta Cytol* 1973; 17: 42-8.
10. Montgomery PW. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. *J Dent Res* 1951; 30: 12-8.

11. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26: 175-80.
12. Braga FL, Meneguzzi RD, Paiva RL, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. *Rev Odonto Ciencia* 2004; 19: 157-63.
13. Balaez AB, Moreira Diaz E, Rodriguez Perez I, Cathcart Roca F. Modificaciones de los índices de exfoliación celular en la mucosa del paladar y carrillo de fumadores de tabacos (puros). *Rev Cub Estomatol* 1986; 23: 177-81.
14. Brown AM, Young A. The effects of age and smoking on the maturation of the oral mucosa. *Acta Cytol* 1970; 14: 566-9.
15. Reddy CRRM, Sarma PR, Kameswari VR. Oral exfoliative cytology in female reverse smokers having stomatitis nicotina. *Acta Cytol* 1975; 19: 28-31.
16. Mosadomi A, Shklar G, Loftus ER, Chauncey HH. Effects of tobacco smoking and age on the keratinization of palatal mucosa: a cytologic study. *Acta Cytol* 1978; 46: 413-7.
17. Meyer J, Rubinstein AS, Medak H. Early effects on surface cytology of the oral mucosa: cell changes in smokers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1970; 30: 700-10.
18. Papanicolaou GN, Traut HF. *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York: Commonwealth Foundation; 1943.
19. Gedoz L, Bohrer PL, Paiva RL, Sant'Ana MS, Rados PV. Validação citopatológica da maturação epitelial em mucosa bucal de fumantes e não fumantes. *Pesq Odontol Bras* 2004; 18: 196.
20. WHO Collaborating Reference Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral pre-cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 518.

21. Epstein JB, Scully C. Assessing the patient at risk for oral squamous cell carcinoma. *Spec Care Dentist* 1997; 17: 120-8.
22. Dabelsteen E, Roed-Petersen B, Smith CJ, Pindborg JJ. The limitations of exfoliative cytology for the detection of epithelial atypia in oral leukoplakias. *Br J Cancer* 1971; 25: 21-4.
23. Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. *Acta Cytol* 1992; 36: 706-10.
24. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, 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.
25. Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF, Hanselaar AG. Liquid-based cervical cytology. *Cancer* 2003; 99: 263-71.
26. Ogden GR, Cowpe JG. Quantitative cytophotometric analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1989; 27(3): 224-8.
27. Kapczinski MP. Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através do uso da citologia esfoliativa [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
28. Silva MCA, Rados PV. Citologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino. *Rev Fac Odontol* 1997; 38(2): 3-10.
29. Mao L. Leucoplakia: molecular understanding of pre malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today* 1997; 3(10): 442-8.
30. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983; 31: 305-8.

31. Bohrer PL, Santana Filho M, Paiva RL, Rados PV, Lauxen IS. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol* 2005; 49: 265-72.
32. Cançado RP, Yurgel LS, Santanna Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *Oral Oncol* 2001; 37(5): 446-54.
33. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 1445-57.
34. Rodrigues VC, Moss SM, Tuomainen H. Oral cancer in the UK: to screen or not to Screen? *Oral Oncol* 1998; 34: 454-65.
35. Silverman S, Becks H, Farber SM. The diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res* 1958; 37: 195-205.

Table 1. Distribution of frequency of smears classified and stained with the modified Papanicolaou technique according to anatomic site.

	Lower lip			Border of the tongue			Floor of the mouth		
	0	I	II	0	I	II	0	I	II
Group I (control)	6.5	93.5	0	3	58	39	6.5	42	51.5
Group II (tobacco)	4	82	14	2	53	45	2	33	65
Group III (tobacco/alcohol)	4	85	11	0	67	33	4	70	26

Table 2. Distribution of anucleated cells, superficial cells with nucleus, intermediate and parabasal cells in the lower lip.

	Anucleated	Superficial	Intermediate	Parabasal
Group I (control)	11.7±12.46	20.22±15.16	61.61±23.33	0
Group II (tobacco)	18.4±17.04	17.6±12.78	60.4±22.38	0.04±0.19
Group III (tobacco/alcohol)	17.88±15.86	11.85±8.71	66.51±22.05	0.03±0.19

A smaller number of superficial cells with nucleus was found in Group III (tobacco/alcohol) than in Group I (control), and the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Table 3. Distribution of anucleated cells, superficial cells with nucleus, intermediate and parabasal cells in the border of the tongue.

	Anucleated	Superficial	Intermediate	Parabasal
Group I (control)	4.35±17.04	24.67±14.46	67.7±18.38	0.03±0.17
Group II (tobacco)	4.34±4.1	21.62±16.16	72±19.27	0.04±0.19
Group III (tobacco/alcohol)	7.85±11.16	15.07±10.72	77±13.64	0.07±0.26

A smaller number of superficial cells with nucleus was found in Group III (tobacco/alcohol) than in Group I (control), and the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Table 4. Distribution of anucleated cells, superficial cells with nucleus, intermediate and parabasal cells in the floor of the mouth.

	Anucleated	Superficial	Intermediate	Parabasal
Group I (control)	5.7±8.98	12.67±7.91	75.06±23.85	0.09±0.3
Group II (tobacco)	7.71±8.68	12.14±12.12	77.95±18.18	0.14±0.45
Group III (tobacco/alcohol)	4.11±7.29	8.59±7.44	83.59±19.12	0

A smaller number of superficial cells with nucleus was found in Group III (tobacco/alcohol) than in Group I (control), and the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Table 5. Keratinization index (KI) in lower lip, border of the tongue and floor of the mouth according to the three groups assessed.

	Lower lip	Border of the tongue	Floor of the mouth
Group I (control)	0.31	0.29	0.18
Group II (tobacco)	0.35	0.25	0.19
Group III (tobacco/alcohol)	0.29	0.22	0.12

* No statistically significant difference ($p < 0.05$) in the keratinization index (KI) was found between the three groups or between the three anatomic sites.

Table 6. Clinical cases included in the study according to histopathologic diagnosis, age, sex, anatomic site and Papanicolaou classification.

Patient	Histopathologic diagnosis	Age	Sex.	Site	Papanicolaou classification
1	Epithelial hyperplasia and hyperkeratosis	55 years	Male	Dorsum of the tongue	Class II
2	Epithelial hyperplasia and hyperkeratosis	44 years	Male	Buccal mucosa	Class III
3	Epithelial hyperplasia and hyperkeratosis	63 years	Female	Lower lip	Class III
4	Epithelial hyperplasia and hyperkeratosis	48 years	Female	Border of the tongue	Class II
5	Hyperparakeratosis	41 years	Male	Buccal mucosa	Class II
6	Hyperkeratosis	54 years	Male	Lower lip	Class I
7	Hyperkeratosis	44 years	Male	Buccal mucosa	Class I
8	Acanthosis	37 years	Female	Upper lip	Class III
9	Epithelial dysplasia	46 years	Female	Alveolar ridge	Class II
10	Epithelial dysplasia	53 years	Female	Floor of the mouth	Class III
11	Squamous cell carcinoma	53 years	Male	Border of the tongue	Class V
12	Squamous cell carcinoma	54 years	Male	Floor of the mouth	Class III
13	Squamous cell carcinoma	48 years	Male	Lower lip	Class V
14	Squamous cell carcinoma	68 years	Female	Border of the	Class III

15	Squamous cell carcinoma	45 years	Male	Border of the tongue	Class V
----	-------------------------	----------	------	-------------------------	---------

Table 7. Means and standard deviations of each cell type in cytopathologic analysis of the 3 groups with lesions.

	N	Mean	Standard deviation
Anucleated squamous			
Leukoplakia without dysplasia	8	26.75%	16.723
Leukoplakia with dysplasia	2	41%	24.042
Squamous cell carcinoma	5	9.4%	7.987
Total	15	22.87%	17.880
Superficial with nucleus			
Leukoplakia without dysplasia	8	71.88%	16.941
Leukoplakia with dysplasia	2	55.50%	19.092
Squamous cell carcinoma	5	60.60%	23.490
Total	15	65.93%	19.315
Intermediate			
Leukoplakia without dysplasia	8	1.38%	2.387
Leukoplakia with dysplasia	2	3.00%	4.243
Squamous cell carcinoma	5	20.80%	9.680
Total	15	8.07%	10.866
Parabasal			
Leukoplakia without dysplasia	8	0.0%	0.0
Leukoplakia with dysplasia	2	0.5%	0.707
Squamous cell carcinoma	5	9.2%	8.408
Total	15	3.13%	6.323

Figure legends:

Figure 1. Photomicrograph shows leukoplakia with hyperparakeratosis, epithelial hyperplasia and inflammatory infiltrate in connective tissue. (100x H/E). In the lower left panel, discrete signs of hydropic degeneration (400x H/E). In the upper right panel, cytopathology sample shows superficial cells with nucleus and anucleated squamous cells (400x, Papanicolaou).

Figure 2. Photomicrograph shows leukoplakia with epithelial dysplasia (100x, H/E). Small lower panel shows dysplastic signs next to basal cell layer (400x, H/E). In the upper right panel, cytopathology sample shows intermediate cells, superficial cells with nucleus and anucleated squamous cells, but no signs of possibly malignant cells (400x, Papanicolaou).

Figure 3. Photomicrograph shows squamous cell carcinoma with invasion of connective tissue that shows chronic inflammation (100x, H/E). Small lower panel shows dysplastic signs of atypia, hyperchromatism and pleomorphism (400x, H/E). In the upper right panel, cytopathology sample shows cells with nucleus atypia, inflammatory cells, superficial cells with nucleus, and anucleated squamous cells (400x, Papanicolaou).

Figure 1

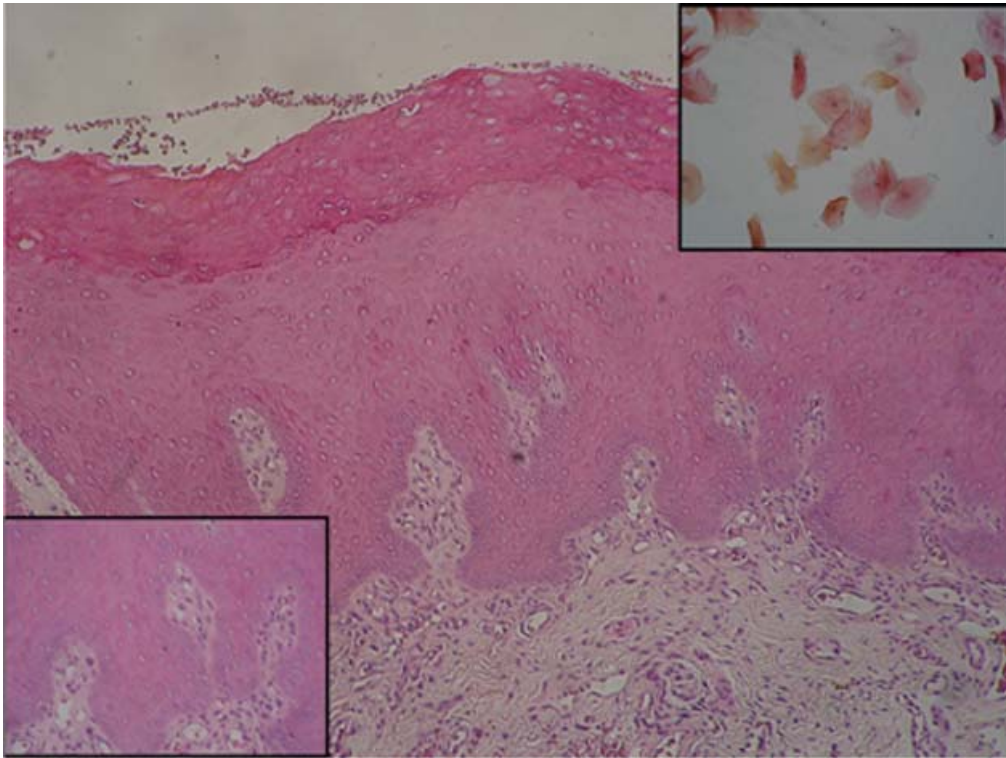


Figure 2

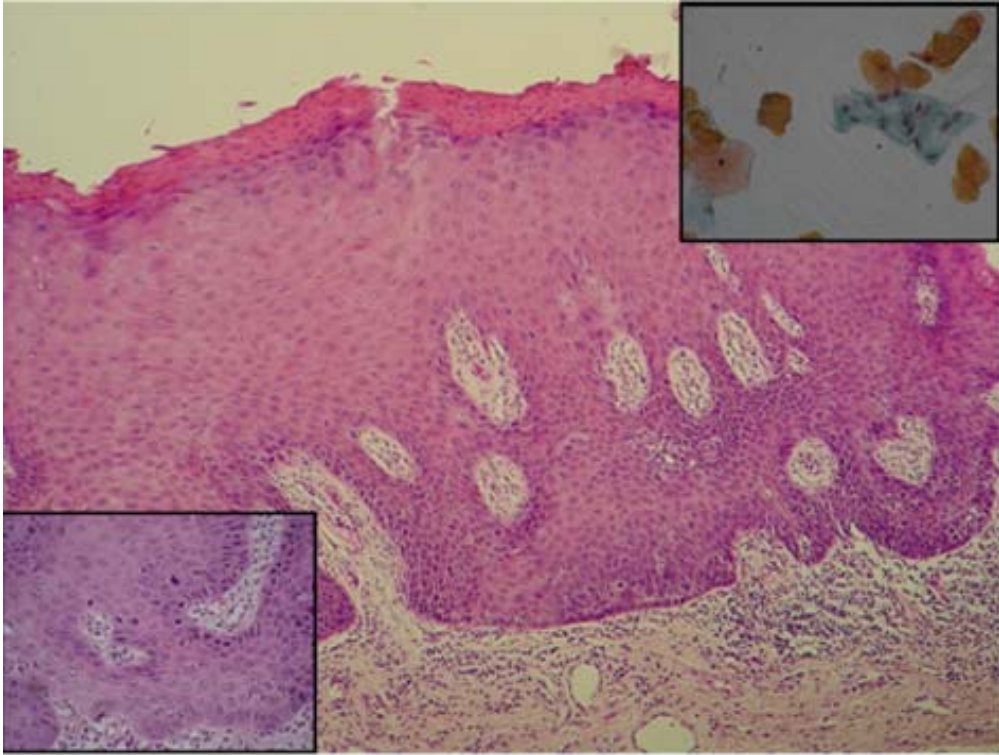
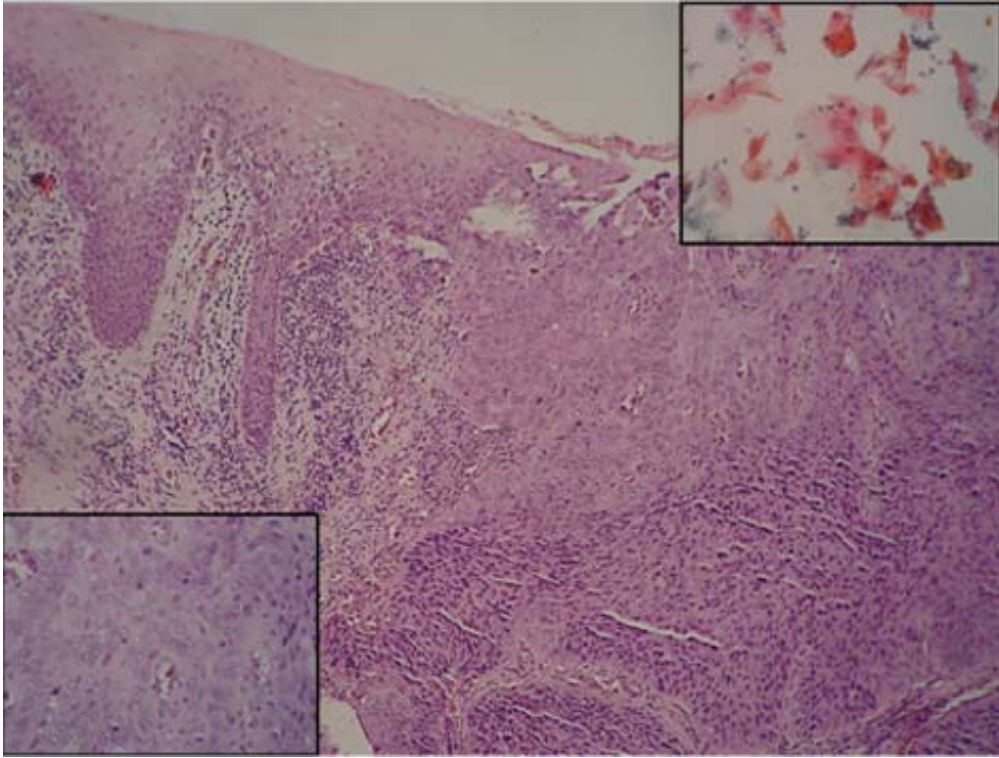


Figure 3



ARTIGO 3 - Validação citopatológica da maturação epitelial em mucosa bucal de fumantes e não-fumantes (revista Brazilian Oral Research)

Validação citopatológica da maturação epitelial em mucosa bucal de fumantes e não-fumantes

Luhana Gedoz; Paula Luce Bohrer; Ricardo Losekan Paiva; João Batista Burzlaff; Manoel Sant'Ana Filho; Pantelis Varvaki Rados

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Autor correspondente:

Pantelis Varvaki Rados

Av. Benjamim Constant, 1440/302

CEP 90550-002 – Porto Alegre – RS – Brazil

E-mail: pantelis@ufrgs.br; joaoburz@gmail.com

Fone: (51) 33165023, (51) 3316.5021

RESUMO

A quantificação do padrão de maturação epitelial tem sido utilizada como recurso para avaliar a presença de alterações celulares no processo de renovação epitelial, principalmente em indivíduos expostos aos fatores de risco para o câncer de boca. No entanto, não há, na literatura, uma concordância com relação ao número de células que deve ser analisado em cada esfregaço citopatológico. Sendo assim, o objetivo desse estudo é o de validar a análise quantitativa das células epiteliais em esfregaços da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não-fumantes. Foram selecionados 10 esfregaços da mucosa bucal de fumantes e 10 de não-fumantes, obtidos dos sítios anatômicos mais acometidos pelo câncer de boca: lábio inferior, borda da língua e assoalho da boca, totalizando 60 lâminas. Os esfregaços foram corados pela técnica de Papanicolaou e Traut e submetidos à quantificação dos tipos celulares (escama anucleada, célula superficial nucleada e célula intermediária). Foram quantificadas as primeiras 50, as primeiras 100 e o total de células não-sobrepostas presentes na lâmina. Para comparação das porcentagens dos tipos celulares, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, com um nível de significância de 5%. Para as 50 primeiras células analisadas, não foi observada correlação estatisticamente significativa para as escamas anucleadas nos esfregaços de lábio inferior e borda da língua de fumantes; para os demais tipos celulares, foi observada correlação. Para as 100 primeiras células analisadas, houve correlação estatisticamente significativa para todos os tipos celulares nos três sítios anatômicos avaliados, em indivíduos fumantes e não-fumantes. Conclui-se que, para a avaliação do padrão de maturação epitelial em esfregaços de lábio inferior, borda de língua e assoalho de boca de fumantes e não-fumantes, é suficiente a quantificação das 100 primeiras células observadas na lâmina.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna que mais acomete a cavidade bucal, sendo mais comum em homens, na faixa etária acima dos 40 anos. Evidências mais recentes mostram um aumento do número de casos em indivíduos mais jovens, na faixa etária abaixo dos 40 anos^{4,6,15}. Os sítios anatômicos de maior prevalência são o lábio inferior, a borda da língua e o assoalho bucal^{5,7,13,21}.

Sabe-se que 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 descamação¹⁹. Alterações nesse processo de maturação epitelial podem indicar precocemente o desenvolvimento do câncer. Essas alterações podem ser observadas através da citopatologia, um método de exame que é fundamentado na análise microscópica de células esfoliadas da mucosa bucal obtidas por raspagem¹.

A citopatologia tem sido utilizada para o monitoramento de indivíduos expostos a fatores de risco para o câncer bucal, especialmente o fumo, o álcool e as radiações solares. Muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o padrão de maturação celular de diferentes regiões da cavidade bucal, demonstrando que os sítios anatômicos da cavidade bucal apresentam diferentes graus de maturação epitelial^{9,17,20}. Foram avaliadas alterações no padrão de maturação epitelial causadas por diferentes estímulos. Entre esses estímulos, destaca-se o fumo^{14,16,18,22}.

Para a quantificação do padrão de maturação epitelial, geralmente são consideradas as primeiras 100 células presentes no esfregaço citopatológico^{12,14,16,18}. Porém, não há na literatura consultada estudos de validação dessa análise.

O objetivo deste estudo foi validar a análise citopatológica quantitativa das células epiteliais em esfregaços da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não-fumantes, nos sítios anatômicos mais acometidos pelo câncer de boca.

METODOLOGIA

A amostra deste estudo foi composta por 20 indivíduos do sexo masculino, com idade acima dos 30 anos, ausência de lesão bucal clinicamente detectável, boa saúde geral e ausência de história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas. Desses indivíduos, 10 eram fumantes, de acordo com os critérios de Ogden et al.¹¹, e 10, não-fumantes.

Foram obtidos esfregaços citopatológicos dos sítios anatômicos mais acometidos pelo câncer de boca: lábio inferior, borda da língua e assoalho da boca. Previamente à coleta das amostras, os indivíduos portadores de próteses totais ou removíveis foram instruídos a removê-las. Todos os indivíduos realizaram um bochecho com água durante 1 minuto.

Foram obtidos três esfregaços de cada paciente, totalizando 60 lâminas. Os esfregaços foram obtidos mediante raspagem da mucosa com espátula de madeira, posterior fixação em álcool absoluto e coloração pela técnica de Papanicolaou modificada. As lâminas foram identificadas numericamente, de acordo com o livro de registros de citopatologia do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS), evitando que o examinador soubesse a que grupo pertencia no momento da análise da mesma.

As lâminas foram avaliadas por quatro examinadores previamente calibrados (Kappa 0,79-0,88) e submetidas à quantificação dos tipos celulares (escama anucleada, célula superficial nucleada e célula intermediária), de acordo com os critérios estabelecidos por Carvalho² (figuras 1, 2 e 3).

Foram quantificadas as primeiras 50, as primeiras 100 e o total de células não-sobrepostas presentes na lâmina, em um aumento de 400x, utilizando-se um microscópio óptico da marca Zeiss, modelo Standard 20, por um único observador, no sentido horizontal, da esquerda para a direita, com a identificação da lâmina à esquerda do observador. Para comparação das percentagens dos tipos celulares, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, com um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram analisadas 60 lâminas e quantificadas, em média, 820 células em cada lâmina.

Nas tabelas 1 e 2, observa-se que não houve correlação estatisticamente significativa na avaliação das células nucleadas no lábio inferior e na borda da língua, respectivamente ($p = 0,653$ e $0,207$). Na avaliação dos demais tipos celulares no lábio inferior e na borda da língua, bem como para todos os tipos celulares no assoalho da boca, foi observada correlação estatisticamente significativa.

Nas tabelas 3 e 4, o teste de Pearson demonstrou que houve correlação estatisticamente significativa para os tipos celulares nos três sítios anatômicos avaliados.

DISCUSSÃO

A análise de amostras de células epiteliais individuais pode representar uma possibilidade de se detectar alterações malignas, especialmente porque cerca de 90% de todos os cânceres de boca são de origem epitelial¹⁰. Essa análise pode ser realizada por meio da citologia esfoliativa, através da avaliação do padrão de maturação dessas células epiteliais. Na boca, as células epiteliais têm um *turnover* de 7 a 14 dias, multiplicam-se na camada basal e vão migrando para a superfície e descamando¹⁹. A análise de alterações nesse padrão de

maturação em pacientes de risco para o câncer de boca pode representar uma possibilidade de monitoramento desses indivíduos.

Montgomery⁹ foi o primeiro a caracterizar as células epiteliais em esfregaços de mucosa bucal clinicamente normal. O autor considerou a classificação do padrão de maturação de acordo com a coloração do citoplasma dessas células. Outros estudos avaliaram o padrão de maturação utilizando os mesmos critérios^{3,8,17,22}. Os estudos mais recentes passaram a utilizar critérios morfológicos do núcleo celular Carvalho².

Em nosso estudo, considerou-se a morfologia nuclear como determinante para a realização dessa classificação. As células com ausência de núcleo foram classificadas como anucleadas; aquelas com núcleo picnótico, sem nenhuma estrutura de cromatina evidente, foram classificadas como superficiais nucleadas; aquelas com núcleo maior e granular foram classificadas como intermediárias; e aquelas em que o núcleo ocupava mais da metade da área celular foram consideradas como parabasais.

Desde o início de sua aplicação em boca, a citopatologia foi utilizada para avaliação do padrão de maturação celular em fumantes e em não-fumantes, sendo que os estudos quantificavam as 100 primeiras células presentes na lâmina^{3,8,12,14,16,17,18,22}. Entretanto, não havia na literatura consultada um embasamento que comprovasse que a avaliação dessas 100 primeiras células seria representativa do total de células presentes na lâmina.

Com relação à análise das 50 primeiras células em lábio inferior de fumantes e borda de língua de não-fumantes, para as células anucleadas, notou-se uma correlação muito fraca ($r = 0,161$ e $r = 0,436$, respectivamente). Sendo assim, a análise das 50 primeiras células em lábio inferior de fumantes e borda de língua de não-fumantes não pode ser considerada representativa de toda a lâmina. No lábio inferior de não-fumantes ($r = 0,749-0,959$), na borda da língua de fumantes ($r = 0,737-0,926$) e no assoalho bucal de fumantes ($r = 0,900-0,934$) e não-fumantes ($r = 0,942-0,954$), foi observada correlação forte. Portanto, a análise das 50

primeiras células presentes na lâmina não pode ser considerada representativa, pois introduziria um viés, uma vez que os sítios anatômicos da cavidade bucal têm padrões de maturação diferentes.

Os resultados deste estudo demonstraram uma correlação forte entre a análise das 100 primeiras células e a análise de toda a lâmina com relação às células superficiais nucleadas ($r = 0,875-0,990$) e intermediárias ($r = 0,884-0,991$) dos três sítios anatômicos avaliados nos indivíduos não-fumantes e fumantes. A análise das células anucleadas da borda de língua de não-fumantes demonstrou uma correlação de $r = 0,658$, e na de fumantes, de $r = 0,684$. Apesar de apresentar uma correlação mais fraca, a análise das células anucleadas de borda de língua em não-fumantes e em fumantes pode ser considerada representativa, quando são analisadas as 100 primeiras células da lâmina.

A utilização dessa técnica, por meio da contagem das 100 primeiras células, aumenta a produtividade, uma vez que diminui o tempo de análise de cada lâmina e pode representar um instrumento para a rotina clínica no monitoramento de indivíduos expostos aos fatores de risco para o câncer de boca.

CONCLUSÕES

Para avaliação do padrão de maturação celular em mucosa bucal de lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal de indivíduos fumantes, a análise das 100 primeiras células presentes no esfregaço pode ser considerada como representativa de toda a lâmina.

REFERÊNCIAS

1. Banóczy J. Exfoliative cytology examinations in the early diagnosis of oral cancer. *Int Dent J* 1976;26(4):398-404.
2. Carvalho G. *Citologia oral*. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
3. Hillmam RW, Kissin B. Oral cytologic patterns in relation to smoking habits. *Oral Surg* 1976;42(2):366-74.
4. Hindle I, Downer MC, Speight PM. The epidemiology of oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34(5):471-6.
5. 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(3):571-4.
6. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-18.
7. Llewellyn J, Mitchell R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10 year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1994;32(3):146-52.
8. Meyer J, Rubinstein AS, Medak H. Early effects of smoking on surface cytology of the oral mucosa. *Oral Surg* 1970;30(5):700-10.
9. Montgomery PW. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. *J Dent Res* 1951;30(1):12-8.
10. Ogden GR. The future role for oral exfoliative cytology-bleak or bright? *Oral Oncol* 1997;33(1):2-4.
11. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *Oral Pathol* 1990;19(2):53-5.

12. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez E. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral* 2004; 9: 197-203.
13. Reis SRA, Lima CR, Marchionni AMT, Setubal MG. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe. I. Fumo, álcool e outros determinantes. *Rev Pos Grad* 1997;4(2):127-32.
14. Romanini J. Utilização da citopatologia em campanha de prevenção do câncer bucal [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
15. Sawyer DR, Wood NK. Oral cancer: etiology recognition and management. *Dent Clin North Am* 1992;36(4):919-44.
16. Silva MCA, Rados PV. Citologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino. *Rev Fac Odontol* 1997;38(2):3-10.
17. Silverman S, Becks H, Farber SM. The diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res* 1958;37(2):195-205.
18. Soares Pinto TA. Quantificação do número de AgNORs em células descamadas da mucosa bucal e sua relação com o tamanho do núcleo em indivíduos fumantes [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
19. Squier CA, Finkelstein MW. Mucosa bucal. *In: Ten Cate AR. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. cap. 16, p. 323-339.
20. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 1996;41(2):71-4.

21. Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol* 2001;37(1):28-35.
22. Zimmermam ER, Zimmermam AZ. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res* 1965;44(4):627-31.

Tabela 1. Distribuição dos valores do teste de correlação de Pearson para a quantificação das 50 primeiras células, em comparação com o total de células presentes na lâmina, de acordo com o tipo de célula e o sítio anatômico em indivíduos fumantes

	Anucleada		Superficial nucleada		Intermediária	
	r	p	r	p	r	p
Lábio inferior	0,161	0,653	0,952	0,000	0,929	0,000
Borda de língua	0,737	0,015	0,926	0,000	0,864	0,001
Assoalho bucal	0,934	0,000	0,900	0,000	0,920	0,000

Fonte: Indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 2. Distribuição dos valores do teste de correlação de Pearson para a quantificação das 50 primeiras células, em comparação com o total de células presentes na lâmina, de acordo com o tipo de célula e o sítio anatômico em indivíduos não-fumantes

	Anucleada		Superficial nucleada		Intermediária	
	r	p	r	p	r	p
Lábio inferior	0,749	0,013	0,959	0,000	0,946	0,000
Borda de língua	0,436	0,207	0,853	0,002	0,827	0,003
Assoalho bucal	0,804	0,005	0,908	0,000	0,944	0,000

Fonte: Indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 3. Distribuição dos valores do teste de correlação de Pearson para a quantificação das 100 primeiras células, em comparação com o total de células presentes na lâmina, de acordo com o tipo de célula e o sítio anatômico em indivíduos fumantes

	Anucleada		Superficial nucleada		Intermediária	
	r	p	r	p	r	p
Lábio inferior	0,823	0,003	0,952	0,000	0,991	0,000
Borda de língua	0,684	0,029	0,972	0,000	0,966	0,000
Assoalho bucal	0,954	0,000	0,942	0,000	0,944	0,000

Fonte: Indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 4. Distribuição dos valores do teste de correlação de Pearson para a quantificação das 100 primeiras células, em comparação com o total de células presentes na lâmina, de acordo com o tipo de célula e o sítio anatômico em indivíduos não-fumantes

	Anucleada		Superficial nucleada		Intermediária	
	r	p	r	p	r	p
Lábio inferior	0,890	0,001	0,990	0,000	0,954	0,000
Borda de língua	0,658	0,039	0,875	0,001	0,884	0,001
Assoalho bucal	0,920	0,000	0,958	0,000	0,938	0,000

Fonte: Indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARTIGO 4 - Extração do DNA de células esfoliadas da mucosa bucal (Revista da Faculdade de Odontologia da UFRGS)

Extração do DNA de células esfoliadas da mucosa bucal

João Batista Burzlaff, Fernanda Visioli, Carmen Carolina Saavedra, Pantelis Varvaki Rados

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Autor correspondente:

Pantelis Varvaki Rados

Av. Benjamim Constant, 1440/302

CEP 90550-002 – Porto Alegre – RS – Brazil

E-mail: pantelis@ufrgs.br; joaoburz@gmail.com

Fone: (51) 33165023, (51) 3316.5021

INTRODUÇÃO

A patologia realiza o diagnóstico baseando-se na morfologia celular; entretanto, atualmente, com os avanços na biologia molecular, as doenças também são estudadas por meio da identificação dos genes envolvidos e de seus produtos protéicos. Muitos métodos laboratoriais permitem avaliar a estrutura e expressão dos genes, e, apesar de estarem em constante evolução, muitos desses testes são simples e podem ser introduzidos na rotina clínica. No estudo do câncer, vários métodos laboratoriais permitem estudar as anormalidades genéticas, incluindo alterações em oncogenes e genes supressores de tumor (1,2).

Para a realização desses testes moleculares, é necessário obter uma amostra de DNA dos indivíduos (3). A forma mais usual é a utilização de sangue periférico, aplicável para estudos individuais. Sendo, no entanto, invasiva e de alto custo para ser aplicada em estudos epidemiológicos, são necessárias fontes alternativas de coleta de material para estudos genéticos em levantamentos populacionais (1,3-5).

Devido à contínua descamação e renovação epitelial, a obtenção de células através da citologia esfoliativa da mucosa bucal é uma alternativa simples, não-invasiva e de baixo custo para a obtenção de amostras de DNA (1,3-5). Entretanto, esse tipo de coleta é vulnerável à degradação se as amostras não forem processadas rapidamente ou congeladas imediatamente após sua obtenção (4). Com o aprimoramento da citopatologia e o desenvolvimento da citologia em base líquida, é possível, com uma única coleta, realizar testes morfológicos e biomoleculares, bem como armazenar amostras por um período de tempo suficiente a extração de DNA (6,7).

Para a extração de DNA, inicialmente é necessária a ruptura, ou lise, das membranas celulares. Para isso, existem diversas metodologias, sendo a forma mais comum a utilização de digestão enzimática com proteinase K, que demanda grande quantidade de tempo e possui

custo elevado. Após, é necessário separar os ácidos nucleicos de outras moléculas (lípidos e proteínas). O método mais utilizado para essa separação emprega solventes orgânicos, como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico; entretanto, esses solventes orgânicos são tóxicos e exigem o uso de capela exaustão (8-10).

Neste estudo, apresentamos uma metodologia de extração de DNA para células epiteliais da mucosa bucal obtidas através de citologia esfoliativa e conservadas em meio líquido. Esse método não-enzimático se baseia na precipitação salina das proteínas celulares com uma solução saturada de cloreto de sódio e foi adaptado do protocolo proposto por Lahiri & Nurnberger, em 1991, para amostras de sangue para uso em estudos de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Além disso, apresenta a vantagem de não empregar reagentes tóxicos.

METODOLOGIA E RESULTADOS

A amostra foi constituída por pacientes encaminhados ao Ambulatório de Cirurgia e Traumatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS) e que apresentavam leucoplasia na mucosa bucal. Os critérios de inclusão no estudo foram: idade acima de 20 anos, ausência de outras lesões em mucosa bucal, boa saúde geral e ausência de história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas. Para a coleta do material do presente estudo, os pacientes eram orientados para remover as possíveis próteses bucais móveis, se presentes, e realizar um bochecho com solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12%. A raspagem para citologia foi realizada com uma escova citológica, imediatamente colocada em meio líquido Digene®, e a embalagem, identificada e armazenada em *freezer* a - 20 °C. O *kit* para exame citológico Digene® contém 1 ml de líquido preservante, sendo que 200 µl foram usados para confeccionar uma lâmina corada segundo a técnica de coloração de Papanicolaou; assim, a extração de DNA foi realizada nos

800 µl restantes. O protocolo usado para a extração de DNA e descrito a seguir foi adaptado do protocolo proposto por Lahiri & Nurnberger (8) para extração de DNA a partir de amostras de sangue para estudos de RFLP:

1. Descongelar a amostra em temperatura ambiente;
2. Agitar em aparelho Vortex® por aproximadamente 1 minuto, retirar a escova do meio líquido Digene® e transferir o líquido para um tubo de centrífuga do tipo Falcon®;
3. Adicionar 800 µl de TKM 1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂ e 2 mM EDTA) e 20 µl de Nonidet P-40® (NP-40, Sigma), agitar manualmente (invertendo os tubos) e centrifugar por 10 minutos a 2.200 rpm;
4. Desprezar o sobrenadante, acrescentar novamente 800 µl de TKM 1, agitar manualmente e centrifugar novamente por 10 minutos a 2.200 rpm;
5. Desprezar o sobrenadante, ressuspender o *pellet* (precipitado) em 128 µl de TKM 2 (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,4 M NaCl e 2 mM EDTA) e, em seguida, passar a amostra para um tubo de microcentrífuga do tipo Eppendorf;
6. Adicionar 8 µl de SDS 10%, agitar manualmente e colocar a amostra em banho seco a 55 °C por 10 minutos;
7. Retirar do banho, adicionar 48 µl de NaCl 6M, agitar manualmente e centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga;
8. Transferir o líquido sobrenadante para outro tubo Eppendorf contendo 368µl de etanol absoluto, desprezando o precipitado de proteína do fundo do frasco;
9. Manter o tubo em *freezer* - 20 °C por 12 horas, centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos, desprezar o sobrenadante e adicionar 200 µl de etanol 70% gelado, centrifugar novamente a 12.000 rpm por 10 minutos, desprezar o sobrenadante. Secar ao ar livre ou em banho seco (55 °C) até que todo o etanol restante evapore. Então, ressuspender o *pellet*, adicionando 60 µl de água deionizada e bidestilada.

O protocolo proposto por Lahiri & Nurnberger (8) foi estabelecido para amostras obtidas de sangue, que, quando comparadas com amostras de citologia esfoliativa, apresentam uma celularidade muito maior; assim, a quantidade de DNA obtida com a citologia esfoliativa é menor, porém suficiente para uso de metodologias como a do *polymerase chain reaction* (PCR). A principal diferença desse método em relação ao protocolo inicial foi no momento em que a amostra é colocada em contato com o etanol absoluto. Nesse momento, a precipitação do DNA não é visível, ao contrário do que acontece com as amostras de sangue onde o DNA pode ser diretamente “pescado” do tubo. Uma vez que nas amostras de citologia esfoliativa isso não ocorreu, foi necessário acrescentar um último passo, que envolve a permanência do tubo em freezer por 12 horas para precipitação e novas centrifugações.

O DNA obtido foi testado em reações de amplificação pela técnica de PCR, utilizando mais de um tipo de *primer* (iniciadores).

Inicialmente, utilizaram-se os *primers* (TTGTGGGCAACATGATGG) e (GAGCCCACAATGGGAGAGTA) para amplificação do gene CCR2, que é rotineiramente empregado em diversos estudos no laboratório. O programa empregado no amplificador envolvia os seguintes passos: 94 °C por 4 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e, por último, 72 °C por 7 minutos.

Como resultado, após eletroforese em gel de agarose 1%, foi obtida uma banda de intensidade considerável e suficiente para prosseguimento de análise dessa região em métodos subseqüentes. Posteriormente, empregaram-se diversos *primers* escolhidos de acordo com a literatura, por sua indicação como iniciadores da síntese de regiões de microssatélite de DNA promissores no diagnóstico de fases da carcinogênese bucal. Em testes preliminares, foram obtidas ampliações das seqüências designadas a seguir:

D11S1778 (forward primer: TAACCTCTACACAGTGTCGTT)

- (reverse primer: GCTTCAGCAGAGAAGCCAT)
- D8S264 (forward primer: GGGAGATTCGGAACATCTGCGTC)
(reverse primer: TGAGTCAGCATAAAGTAAGAGAGAG)
- D3S1300 (forward primer: ACAAAGGAACGTCATGTGGTAGG)
(reverse primer: GCTGTTTATTCTTCGTGGAATGCC)
- D9S171 (forward primer: AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT)
(reverse primer: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT)
- D4S243 (forward primer: AATCCCTTTTCTACCTTTCTATCAC)
(reverse primer: GAGAGGGAGAGATAAAAGATGTAAATG)
- D3S1234 (forward primer: CCTGTGAGACAAAGCAAGAC)
(reverse primer: GACATTAGGCACAGGGCTAA)

Para estas últimas amplificações, as bandas resultantes apresentaram intensidades variáveis, já que nenhuma adequação do programa usado no termociclador chegou a ser desenvolvida.

DISCUSSÃO

O DNA obtido neste estudo foi utilizado com sucesso nas reações de amplificação por PCR e, apesar de não ter sido quantificado o total de DNA extraído de cada amostra, a quantidade foi suficiente para 60 reações de PCR.

Diversos estudos mostram que o DNA extraído de células epiteliais bucais através de diferentes metodologias e protocolos é adequado para utilização em reações de amplificação por PCR (3). Entretanto, importantes questões ficam em aberto em relação à quantidade e qualidade de DNA humano que pode ser obtido a partir de diferentes protocolos de coleta de células bucais e dos diferentes métodos de extração de DNA.

A quantidade, pureza e integridade do ácido nucléico extraído dependem de diversos fatores e têm grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicadas (9).

Lahiri & Nurnberger (8) relatam que essa metodologia de extração de DNA, quando obtido de sangue periférico, produz maior quantidade de DNA do que qualquer outro método, entre 130-160 µg a partir de 5ml de sangue. Ressaltam, também, que o DNA obtido é livre de RNA, proteínas e enzimas degradadoras.

A utilização de sangue periférico é pouco viável, por ser caro e invasivo, porém fornece material suficiente para protocolos mais exigentes, como Southern Blot e a iniciação de linhagens celulares (5). A utilização de células bucais para estudo do DNA pode ser empregada como uma alternativa barata e não-invasiva.

Outro aspecto muito importante é a coleta e o armazenamento criterioso dos esfregaços citopatológicos, a fim de evitar falsos negativos e falsos positivos. Diferentes métodos de coleta produzem diferentes resultados, tanto na qualidade como na quantidade de DNA obtido e, portanto, no desempenho nas técnicas em que será aplicado posteriormente.

Em alguns estudos que utilizam esfregaços bucais, os próprios pacientes realizam a coleta, portanto não há como avaliar se os indivíduos realmente seguiram as recomendações de coleta. Harty et al. (4) verificaram que as amostras obtidas de indivíduos que comeram, beberam ou fumaram 1 hora antes da coleta obtiveram maior número de falhas nas reações de PCR.

Nos estudos em que o próprio paciente realiza a coleta, muitas vezes as amostras são enviadas via postal, podendo ficar muito tempo sem refrigeração (5). Se essas amostras não utilizam um líquido preservante, ficam vulneráveis a crescimento bacteriano, degradação dos ácidos nucléicos e reduzida capacidade de amplificação por PCR (4).

Hayney et al. (11) estudaram a estabilidade de amostras obtidas de *mouthwash* em soluções salinas estocadas por 7 dias à temperatura ambiente (25 a 37 °C), como ocorreria em

amostras enviadas pelo correio. Os autores verificaram que as amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram maiores quantidades de DNA do que as amostras refrigeradas (-20 a 4 °C), sugerindo a presença de DNA bacteriano. Lum & Marchand (12), utilizando amostras em solução à base de álcool, verificaram que o armazenamento à temperatura ambiente não afetou a quantidade de DNA, nem a habilidade de amplificação por PCR, quando comparado com armazenamento a - 20 °C.

O grande benefício desse protocolo é eliminar completamente a utilização de qualquer reagente tóxico, como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, além de eliminar o passo de longa digestão das amostras com proteinase K, diminuindo o custo e o tempo da operação.

Para finalizar, queremos ainda enfatizar a importância do êxito na extração do DNA em citologia bucal, que amplia as possibilidades de prevenção do câncer bucal e de estudos de citotoxicidade para materiais e técnicas em odontologia.

REFERÊNCIAS

1. Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, et al. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol* 1999; 35(3): 296-301.
2. Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cell by microsattelite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3): 607-12.
3. Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T, et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(6): 687-96.
4. Harty LC, Garcia-Closas M, Rothman N, Reid YA, Tucker MA, Hartge P. Collection of buccal cell DNA using treated cards. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 501-6.
5. Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JF, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environ Health Perspect* 1999; 107(7): 517-20.
6. Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF, Hanselaar AG. Liquid-based cervical cytology. *Cancer* 2003; 99(5): 263-71.
7. Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol*. 2006; 42(8): 810-8. Epub 2006 Feb 3.
8. Lahiri K, Nurnberger I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(19): 5444.

9. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesq Odontol Bras* 2001; 15(4): 314-9.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3): 495-503.
11. Hayney MS, Dimanlig P, Lipsky JJ, Poland GA. Utility of a “swish and spit” technique for the collection of buccal cells for TAP haplotype determination. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 951-4.
12. Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 719-24.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a evolução dos conhecimentos sobre citopatologia/bucal em nossa Faculdade, é possível afirmar que essa metodologia demonstrou utilidade no aprofundamento do conhecimento sobre as mudanças que a mucosa bucal apresenta quando exposta aos carcinógenos, mais especificamente frente ao consumo de álcool e tabaco.

Os diferentes sítios anatômicos da mucosa bucal mais propensos ao desenvolvimento do câncer bucal apresentam, sem dúvida, variação do padrão citopatológico em termos quantitativos. As avaliações qualitativas, utilizando os critérios de Papanicolau & Traut, não mostraram a mesma aplicabilidade.

A partir dos achados da existência de uma correlação histocitopatológica aqui demonstrada, percebemos a necessidade de aprofundar os estudos de correlação em mucosa bucal para reforçar essas evidências iniciais. Consideramos importante, ainda, não perder de vista que a citopatologia representa um instrumento de diagnóstico precoce ou de monitoramento de pacientes expostos aos fatores de risco. A biópsia acompanhada de exame histopatológico representa a conduta adequada para o diagnóstico de lesões estabelecidas e visíveis ao exame clínico.

A introdução de técnicas mais recentes de coleta e armazenamento dos esfregaços (meio líquido, uso de escovas) permitiu a possibilidade de estudo de dano genético a partir da extração do DNA de células esfoliadas da mucosa bucal, bem como a avaliação morfológica ou o uso de outras técnicas moleculares a partir da mesma amostra.

Essas técnicas são uma possibilidade real e muito promissora em nosso meio.

REFERÊNCIAS

1. Sandler HC. Errors of oral cytodiagnosis. Report of follow up of 1801 patients. J Am Dent Assoc. 1966;72:851-4.
2. Sandler HC. Reliability of oral exfoliative cytology for detection of oral cancer. J Am Dent Assoc. 1964;68(27):489-99.
3. Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby HF, Garrington GE. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1972;33(1):61-74.
4. Banoczy J, Rigo O. Comparative cytologic and histologic studies in oral leukoplakia. Acta Cytol. 1976;20:308-12.
5. Rovin S. An assessment of the negative oral cytology diagnosis. J Am Dent Assoc. 1967;74:759-62.
6. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. Anal Quant Cytol Histol. 1999;21(2):126-30.
7. Papanicolaou GN, Traut HF. Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear. New York: Commonwealth Foundation; 1943.
8. Kapczinski MP. Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através do uso da citologia esfoliativa [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
9. Silva J. Genética toxicológica. Porto Alegre: Alcance; 2003.
10. Peschke R. Avaliação citopatológica das leucoplasias da mucosa bucal antes e após biópsia [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
11. Carvalho G. Citologia oral. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.

12. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9.
13. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ; ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*. 2002;287(16):2120-9.
14. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen IS, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol: a cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26:175-80.
15. 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;49:265-72.
16. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med*. 1990;19(2):53-5.

ANEXO 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul