

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

STÉPHANIE RODRIGUES D'ÁVILA

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE NO LÓCUS 9P21E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE PROLIFERATIVA NA CARCINOGENESE BUCAL

Porto Alegre  
2015

STÉPHANIE RODRIGUES D'ÁVILA

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE NO LÓCUS 9P21E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE PROLIFERATIVA NA CARCINOGENESE BUCAL

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre  
2015

### CIP - Catalogação na Publicação

D'Ávila, Stéphanie Rodrigues  
Análise da perda de heterozigosidade no locus  
9p21e sua associação com a atividade proliferativa na  
carcinogênese bucal / Stéphanie Rodrigues D'Ávila. --  
2015.  
47 f.

Orientadora: Fernanda Visioli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,  
BR-RS, 2015.

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

## AGRADECIMENTOS

*Na vida não estamos sozinhos. Estamos cercados por pessoas. Algumas delas se mostram especiais - seja por gestos, seja por palavras- e marcam etapas da nossa vida! Ao longo desses cinco anos fui agraciada por esses anjos! Se hoje finalizo esse capítulo, realizada e feliz, só tenho a dizer: obrigada!*

Obrigada **família...**

*A família sempre foi minha base e meu porto seguro, reflexo do que sou e me tornei. Obrigada por acreditarem em mim desde o pré-vestibular! Por entenderem minhas crises de ansiedade com os estudos, provas e trabalhos e vibrarem com cada conquista! Vocês estiveram sempre ali: no momento da dúvida, do medo, da alegria e da comemoração. Sempre me apoiando e me incentivando a dar o melhor de mim! Meu amor incondicional!*

Obrigada **amigos e colegas...**

*Na nossa trajetória vamos conquistando amizades que devemos cultivar pra vida toda. São amizades de pessoas que estão sempre perto mesmo longe, de pessoas que mesmo com problemas te colocam pra cima quando você está triste, de pessoas que não economizam no carinho e no cuidado e te ajudam no que for preciso! A vocês, minha eterna gratidão!*

Obrigada orientadora **Fernanda Visioli...**

*Meu maior exemplo de docência! Tornou todo o meu aprendizado leve e muito construtivo! Obrigada por todas as experiências compartilhadas, pela compreensão, confiança e principalmente por todo o carinho e amizade! Tem uma frase do Nikos Kazantzakis que toda vez que leio lembro muito de ti: "Professores ideais são aqueles que se transformam em pontes e que convidam os alunos a cruzá-la, depois de ter facilitado sua passagem, com alegria e colapso, incentivando-os a criar pontes a partir de suas próprias atitudes." Tu consegues de forma autêntica e natural dar um sentido muito especial a ela. Estás no meu coração!*

Obrigada **Marcelo Lamers...**

*Jamais esqueceria o meu primeiro orientador! Quem me concedeu a primeira oportunidade de entrar no mundo da Patologia e tornou possível a criação dos laços que tenho no presente. Me fez amadurecer muito como pessoa e discente, tornou os meus sábados pela manhã muito produtivos, mas principalmente conquistou meu carinho e admiração pra vida toda! Obrigada por toda a amizade e confiança!*

Agradeço também:

*Às mestrandas Francine, Viviane Palmeira e Bruna Jalfim que trabalharam diretamente no projeto auxiliando nas coletas e elaboração de algumas fases. O trabalho em conjunto é o que diferencia na obtenção de resultados, mudanças e crescimento. Formamos por dois anos uma ótima equipe e com certeza a ajuda de vocês foi essencial para a finalização desse TCC. Como dizia Clarice Linspector "Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe". Obrigada por toda a dedicação e empenho!*

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

*À todos os colegas/amigos, funcionários e professores da Patologia Bucal da FO/UFRGS, pelo companheirismo, ajuda técnica e teórica.*

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

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

## RESUMO

D'ÁVILA, Stéphanie Rodrigues. **Análise da perda de heterozigosidade no locus 9p21 e sua associação com a atividade proliferativa na carcinogênese bucal.** 2015. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, apresentando alterações progressivas sobre o genoma celular. Portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna. Os principais fatores de risco para o câncer bucal são o consumo de álcool e tabaco. O desafio atual é a busca de biomarcadores que demonstrem essas alterações precocemente, para que possam ser identificados os indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Uma das primeiras alterações no processo de carcinogênese é o aumento da atividade proliferativa celular, geralmente causado por mutações nos genes que controlam o ciclo celular. O gene CDKN2A, localizado no locus 9p21, é um gene comumente mutado nos cânceres humanos e codifica a proteína p16, que desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular na carcinogênese bucal. Para tal finalidade foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos que foram divididos nos seguintes grupos: controle (n=22), álcool-fumo (n=27), leucoplasia (n=23) e grupo carcinoma (n=21). A partir do raspado citológico foi confeccionada uma lâmina para impregnação por prata e análise de AgNOR. O restante das células foi utilizado para extração do DNA para amplificação por PCR e sequenciamento. Observamos que os parâmetros de AgNOR e a frequência de mutações no locus 9p21 foram maiores nos grupos expostos aos carcinógenos e com lesões em relação ao controle, com diferenças estatisticamente significativas nos valores de AgNOR dos pacientes com leucoplasias em relação ao controle. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também maior velocidade de proliferação em relação aos pacientes sem mutações, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Concluímos que a citopatologia é um método útil para avaliação da atividade proliferativa e de mutações genéticas em pacientes com risco para transformação maligna em relação ao câncer bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal. Leucoplasia. AgNOR. Fumo. Álcool. Perda de heterozigosidade. CDKN2A.

## ABSTRACT

D'ÁVILA, Stéphanie Rodrigues. **Epithelial proliferation of the oral mucosa and its association with loss of heterozygosity in 9p21 by cytopathology**. 2015. 60 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

The carcinogenesis in the oral cavity is a multistep process, with progressive changes on the cellular genome. Therefore, the development of cancer in the oral mucosa is often preceded by a potentially malignant lesion. The main risk factors for oral cancer are alcohol and tobacco intake. The current challenge is the search for biomarkers that demonstrate the early alterations, so higher risk individuals to the development of oral cancer can be identified. One of the earliest changes in the carcinogenesis process is the enhancement of cell proliferative activity, usually caused by mutations in cell cycle control genes. The *CDKN2A* gene, located in the 9p21 locus, is a commonly mutated gene in human cancers and encodes the p16 protein, which plays a critical role in cell cycle regulation. The objective of this study was to evaluate the frequency of loss of heterozygosity in the 9p21 locus and the cell proliferative activity in oral carcinogenesis. For this purpose a cytopathologic collection was performed. The patients were divided into the following groups: control (n=22), alcohol-smoking (n=27), leukoplakia (n=23) and carcinoma group (n= 21). From the cytology, brush a slide for silver impregnation and AgNOR analysis was prepared. The remaining cells were used for DNA extraction, followed by PCR amplification and genetic sequencing. We observed that the AgNOR parameters and the frequency of 9p21 locus mutations were higher in the groups exposed to carcinogens and injuries in the control. Higher statistically significant values of AgNORs were observed in Leukoplakia group in comparison to control. The patients with mutation in 9p21 also showed increased speed proliferation compared to patients without mutations, although this difference was not statistically significant. We conclude that the cytopathology is a useful method to evaluate the proliferative activity and gene mutations in patients with risk for malignant transformation to oral cancer.

Keywords: Oral cancer. Leukoplakia. AgNOR. Smoking. Alcohol. Loss of heterozygosity. *CDKN2A*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>07</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBEJTIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
	<b>ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO B- QUESTIONÁRIO APLICADO AO PACIENTE.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO C- TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS AgNORs.....</b>	<b>46</b>

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

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

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

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

Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que atuaria como um agente iniciador, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular. Ainda que a exposição ao fumo associada ao álcool tenha mostrado efeito multiplicador, o papel do álcool como agente isolado não é tão claro (OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999). O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos

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

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

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

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0.42 e 5% (BANÓCZY; RIGÓ, 1991; SCHEPMAN et al., 1996; DELILBASI et al., 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003; JAHANBANI, 2003). Segundo Carrard e colaboradores (2010) a prevalência de leucoplasias na população da região metropolitana de Porto Alegre é de 1.01%. A leucoplasia se apresenta como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra patologia (BARNES et al., 2005). Ao se deparar com uma leucoplasia há a necessidade de realizar-se uma biópsia para que seja possível o diagnóstico histopatológico, uma vez que estas lesões podem apresentar inúmeras alterações epiteliais (KRAMER et al., 1978).

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

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

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

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

- Aumento do número de figuras de mitoses (algumas atípicas);
- Presença de mitoses na metade superficial do epitélio;
- Aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- Nucléolos volumosos;
- Duplicação da camada basal;
- Estratificação epitelial irregular;

- Ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa;
- Papilas epiteliais em forma de gota;
- Perda da polaridade das células da camada basal;
- Perda de aderência intercelular;
- Hiperchromatismo nuclear;
- Pleomorfismo celular.

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

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

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

Para esse fim, técnicas quantitativas estão sendo associadas à citopatologia para que possamos mensurar modificações na mucosa bucal. Uma técnica quantitativa associada à citopatologia é a análise de AgNORs. Regiões Organizadoras Nucleolares

(NORs) são sequências de DNA que codificam o RNA ribossômico, contribuindo, portanto, para a síntese ribossomal. Durante a interfase, essas regiões se aproximam e, juntamente com o RNAr (RNA ribossômico) e proteínas, formam o nucléolo. Quando essas regiões estão sendo ativamente transcritas, elas se associam a proteínas que têm afinidade pela prata, assim, as NORs ativas aparecem como pontos pretos dentro do núcleo amarelo-acastanhado, sendo então chamadas de AgNORs (HERNANDEZ-VERDUN, 1983; TRERÉ, 2000).

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

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

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

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

Dentro do que é sabido até o momento, é possível constatar-se que a citopatologia é um recurso de monitoramento que vem se mostrando cada vez mais efetivo para a observação de modificações iniciais ou mesmo prévias ao aparecimento

de lesões potencialmente malignas ou câncer bucal. No entanto, fica evidente o caráter individual desse tipo de avaliação, sugerindo que alguns indivíduos são mais suscetíveis do que outros aos carcinógenos bucais (GEDOZ et al., 2007).

Apesar dos avanços na pesquisa empregando citopatologia como ferramenta de monitoramento e de diagnóstico de risco existe ainda a necessidade de utilização de testes mais precisos para verificar o potencial de malignização de forma individual. Um dogma central da carcinogênese é que o desenvolvimento do câncer requer a acumulação de múltiplas alterações genéticas. Portanto, lesões que progridem para carcinoma espinocelular tendem a ser geneticamente diferentes de lesões clinicamente semelhantes, mas que não progridem (REIBEL, 2003). Detecção destas alterações pode ser um poderoso preditor de risco para o desenvolvimento de câncer bucal. Como resultado, seria possível identificar quais os pacientes devem ser tratadas de forma mais agressiva, seja por acompanhamento mais frequente ou usando abordagens tradicionais como regimes quimiopreventivos (ROSIN et al., 2000).

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

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

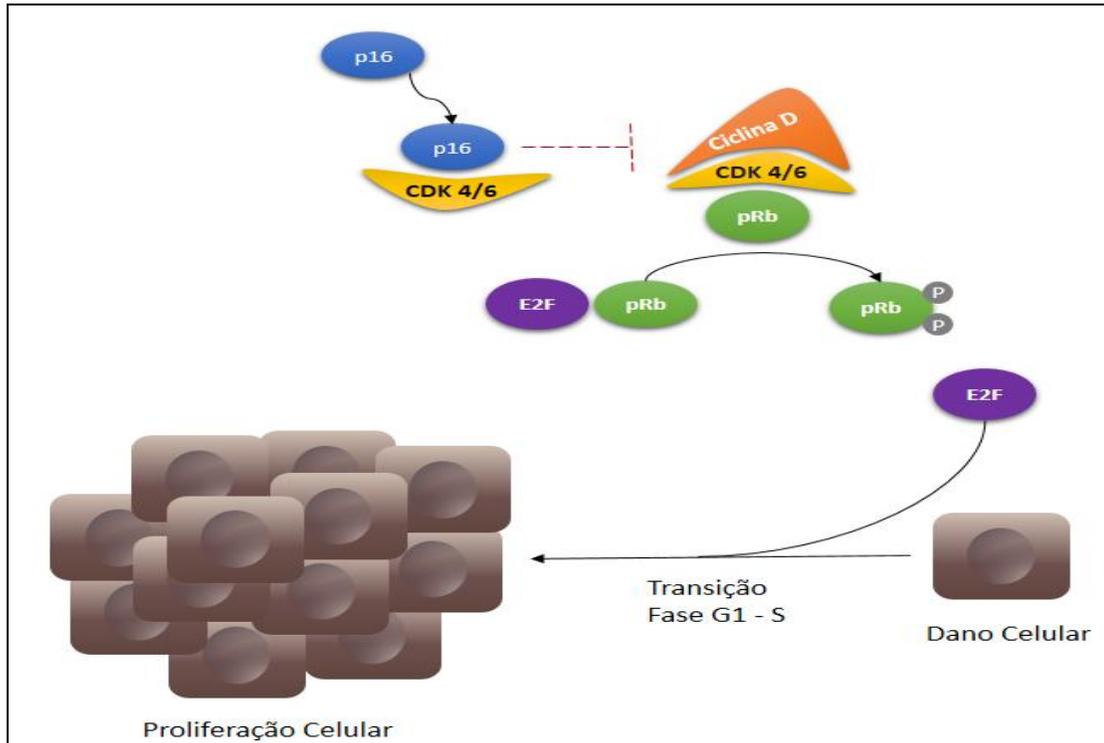
O estudo realizado por Rosin et al. (2000) teve por objetivo avaliar a perda de heterozigosidade (LOH) comparando leucoplasias que progrediram ou não para o carcinoma espinocelular. Todas as leucoplasias, que progrediram para carcinoma espinocelular apresentavam perda do 3p14 e 9p21, com risco relativo de malignização 24 vezes maior do que as lesões que não apresentavam tal alteração. No entanto, a perda destes alelos específicos, ocorria com significativa frequência também em lesões que não progrediram para carcinoma espinocelular. Logo, outros marcadores foram necessários para a avaliação do potencial de malignização. Lesões cancerizáveis com perda do 3p e/ou 9p e alguma outra perda adicional nos cromossomos 4q, 8p, 11q, 13q e 17p, possuíam risco de transformação em carcinoma espinocelular 33 vezes maior quando comparadas com lesões que não apresentaram perdas em tais alelos.

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

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

O gene *CDKN2A* codifica a proteína p16. A proteína p16 desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB (Retinoblastoma), também considerado um gene supressor tumoral. Durante a fase G1, p16 inibe CDK4 (quinase dependente de ciclina 4) e CDK6 (quinase dependente de ciclina 6), impedindo que os mesmos fosforilem Rb, que se mantém ligado ao fator de transcrição E2F (Figura 1), dessa forma impedindo a passagem do ciclo celular para a fase S (GUERRA ENS et al., 2005).

Figura1- Cascata de sinalização da proteína p16.



Fonte: Adaptado de CHUDNOVSKY; KHAVARI; ADAMS, 2005, p. 817.

Além disso, as alterações genéticas não são o único mecanismo para silenciar *CDKN2A* em carcinomas espinocelulares, mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos (LOYO, 2013). A inativação de p16 envolve quatro tipos de alterações genéticas, tais como: hipermetilação, perda de heterozigosidade (LOH) e mutação pontual (LI, 2011). Acredita-se que a inativação de p16 é um evento precoce e importante na progressão tumoral (JAMES, 2001).

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

Diante do que foi exposto, observamos que apesar de esses estudos mostrarem que existe uma forte associação entre perda de heterozigosidade e progressão de

lesões potencialmente malignas para carcinomas, não existem estudos que avaliem esse tipo de alteração em mucosa ainda clinicamente normal, mas expostas aos carcinógenos do fumo e álcool. A análise da perda de heterozigidade pode ser realizada com o emprego de pouca quantidade de DNA, logo a citologia esfoliativa pode ser uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação da mucosa bucal clinicamente normal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

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

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 com a progressiva severidade do estado de doença do indivíduo (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Comparar a velocidade de proliferação com a progressiva severidade do estado de doença do indivíduo (sem lesão, mas exposto aos fatores de risco, presença de lesão cancerizável e presença de câncer);
- Correlacionar a perda de heterozigosidade no locus 9p21 com a velocidade de proliferação celular avaliada por AgNOR;

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Análise da perda de heterozigosidade no locus 9p21e sua associação com a atividade proliferativa na carcinogênese bucal**

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

#### **Abstract**

A carcinogênese na cavidade bucal apresenta alterações progressivas sobre o genoma celular. O desafio atual é a busca de biomarcadores que demonstrem essas alterações precocemente, para que possam ser identificados os indivíduos de maior risco para o desenvolvimento do câncer. Uma das primeiras alterações nesse processo é o aumento da atividade proliferativa, geralmente causado por mutações nos genes que controlam o ciclo celular. O gene *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular na carcinogênese bucal. Foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos nos grupos: controle (n=22), álcool-fumo (n=27), leucoplasia (n=23) e grupo carcinoma (n=21). A partir do raspado citológico foi confeccionada uma lâmina para análise de AgNOR e o restante das células foi utilizado para extração do DNA. Observamos que os parâmetros de AgNOR e a frequência de mutações no locus 9p21 foram maiores nos grupos expostos aos carcinógenos e com lesões em relação ao controle, com diferenças estatisticamente significativas nos valores de AgNOR dos pacientes com leucoplasias em relação ao controle. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também maior velocidade de proliferação em relação aos sem mutações, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Concluímos que a citopatologia é um método útil para avaliação da atividade proliferativa e de mutações genéticas em pacientes com risco para transformação maligna para o câncer bucal.

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

## Introdução

O carcinoma espinocelular representa a maioria de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, assim é usado muitas vezes como sinônimo para o termo câncer bucal. É considerado o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo.<sup>1</sup> De acordo com o Instituto Nacional do Câncer<sup>2</sup> estimam-se para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.010 em mulheres. Suas taxas de mortalidade são altas e têm se mantido inalteradas nas últimas décadas.<sup>1,3</sup> Dessa forma, a implementação de estratégias mais eficazes de combate ao câncer são necessárias.<sup>3</sup>

A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna.<sup>4,5</sup> A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais freqüente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5%.<sup>6-10</sup> Evidências científicas têm demonstrado que é possível detectar alterações precoces em pacientes expostos aos fatores de risco e com lesões potencialmente malignas, fato que tem motivado a busca de biomarcadores com possibilidade de utilização em nível populacional que venham a contribuir na identificação de indivíduos com maior risco ao desenvolvimento de câncer bucal.<sup>11</sup>

Existe uma forte associação entre perda de heterozigosidade e transformação maligna de lesões potencialmente malignas. A perda de heterozigosidade representa a perda de um alelo em um locus específico, causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo a partir de um par cromossômico, resultando em uma homozigosidade anormal.<sup>12</sup> A perda de heterozigosidade no locus 9p21 parece ser a mais importante para predição de transformação maligna de leucoplasias bucais.<sup>13</sup> O gene supressor tumoral *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, é um gene supressor tumoral, e codifica a proteína p16 que desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular através da sua interação com a proteína RB (Retinoblastoma).<sup>14</sup>

Nos indivíduos que apresentam a mucosa bucal clinicamente normal, mas são expostos aos fatores de risco, fumo e álcool, a citologia esfoliativa é uma alternativa não invasiva para coleta e avaliação de alterações celulares. Associada à citopatologia,

a análise de AgNORs, Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs), é uma técnica quantitativa que demonstra a velocidade de proliferação celular. Estudos prévios identificaram um aumento da velocidade de proliferação celular na mucosa bucal morfolologicamente normal de pacientes expostos a carcinógenos, fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle através dessa técnica.<sup>11,16</sup>

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

## **Metodologia**

### **Amostra**

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

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

(2) Grupo Álcool e Fumo: constituídos por pacientes que não apresentam lesões bucais, mas são expostos aos fatores de risco para essas lesões. Pacientes que fumam no mínimo 20 cigarros com filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos e/ou que consomem regularmente bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica é caracterizado pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia segundo o indicado por Tezal et al. 2001<sup>17</sup>, por no mínimo um ano.

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

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

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

Após a concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE, foi realizado um questionário com informações pertinentes ao estudo. Foram coletados dados sobre hábitos (consumo de fumo, álcool e chimarrão). No exame clínico foi realizada a análise de CPOD (Dentes cariados, perdidos e obturados). O packyear é calculado multiplicando o número de carteiras de cigarro (equivalente a 20 cigarros) fumadas por dia pelo número de anos que a pessoa fuma. Por exemplo, um packyear é definido como 20 cigarros fumados por dia, durante um ano (<http://smokingpackyears.com/>).

### **Coleta Citopatológica**

Pacientes do grupo 1 e grupo 2 foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal no sítio borda de língua (sítio de maior incidência do câncer bucal), e os pacientes do grupo 3 e grupo 4 foram submetidos à realização de exame citológico na região onde está localizada a leucoplasia ou carcinoma espinocelular. O esfregaço citopatológico foi transferido para uma lâmina de vidro. Após, o cytobrush foi então imerso em tubo contendo solução PBS (Phosphate buffer saline) para obtenção de células para extração de DNA. A solução foi centrifugada a 10.000RPM (rotações por minuto) durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet celular foi ressuspenso em 25µL de PBS e transferido para cartão FTA (Whatman International Ltd, Abingdon, Cambridge, UK).

## **Coleta de Sangue Periférico**

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

## **Extração DNA**

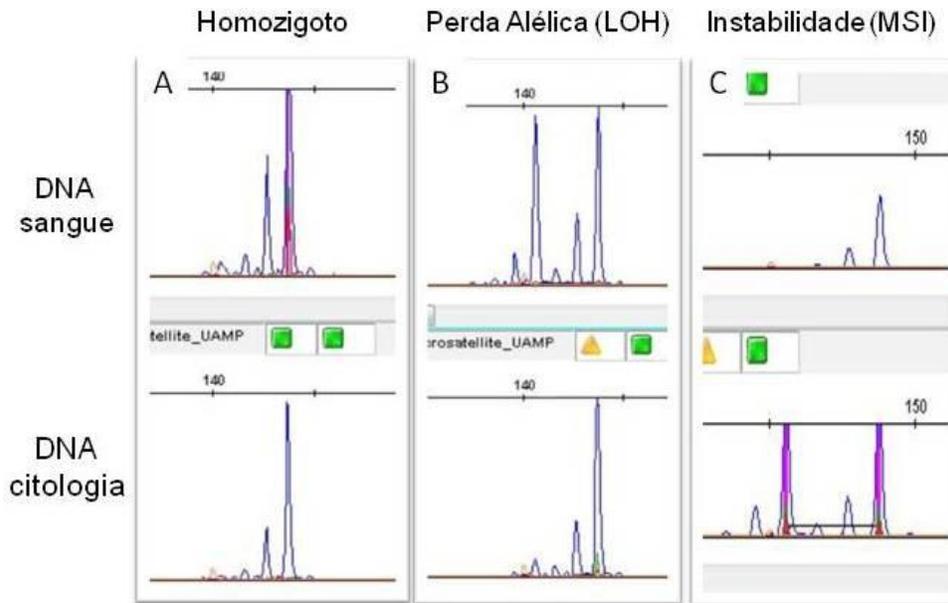
O isolamento de DNA foi realizado a partir de discos de 3mm de papel obtido do cartão FTA. Os discos eram colocados em tubo do tipo eppendorf, lavados com 500µL de água ultra pura (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Em seguida era adicionado 30µL de água ultrapura e aquecido a 95°C durante 30 minutos. A concentração e pureza do DNA foram avaliadas com espectrofotômetro. A pureza foi determinada pela razão da Absorbância 260/ Absorbância 280.

## **Amplificação por PCR e análise dos fragmentos**

A perda alélica foi analisada utilizando-se o marcador de microssatélite IFNA localizado no cromossomo 9p21. O primer forward foi marcado com fluorescência FAM. As reações de PCR foram realizadas num volume total de 20µL contendo 10ng de DNA, primers forward e reverse, solução tampão, oligonucleotídeos e enzima Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A amplificação por PCR foi realizada no equipamento StepOnePlus (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e consistiu em 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 70°C por 60 segundos. Em seguida a análise dos fragmentos foi realizada por eletroforese capilar no equipamento ABI Genetic Prism 3500 e os dados analisados através do software Gene Scan Analysis (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

A perda de heterozigosidade (LOH) foi determinada pelo cálculo da proporção entre a altura de pico de alelos normais e tumorais, utilizando a fórmula: (altura do pico do alelo 1 da amostra de interesse/ altura do pico do alelo 2 da amostra de interesse) / (altura do pico do alelo 1 da amostra controle / altura do pico do alelo 2 na amostra controle). A proporção de mais de 0.5 indica LOH. A instabilidade de microssatélite

(MSI) foi definida como a presença de novos tamanhos de fragmentos na amostra de interesse, que estavam ausentes no DNA controle (Figura 1). A eletroforese capilar foi realizada na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



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

### Técnica para quantificação das AgNORs

No esfregaço citológico submetido à impregnação pela prata, foram capturadas imagens de 50 células, bem distendidas e não sobrepostas, em um microscópio binocular, em aumento 1000x, com óleo de imersão. Foi realizada a contagem das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989)<sup>19</sup> e então foi calculada a média de AgNORs/núcleo (mAgNOR). Um segundo parâmetro de avaliação utilizado foi o percentual de células com mais do que 1, 2, 3 e 4 AgNORs/núcleo (pAgNOR), de acordo com metodologia proposta por Xie et al. (1997).<sup>20</sup> A quantificação de AgNORs foi realizada por dois pesquisadores cegos e calibrados. A calibragem intra e inter-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ( $\geq 0,75$ ).

### **Análise Estatística**

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

### **Resultados**

Um total de 93 pacientes foi incluído no estudo, as características demográficas da amostra estão descritas na Tabela 1. Observamos que os pacientes dos grupos com lesões (Leucoplasia e Carcinoma) apresentaram média de idade mais elevada do que os demais, assim como o índice CPOD. Observamos também que a média de packyears foi semelhante entre os grupos Leucoplasia e Álcool-Fumo, porém aumentou de forma substancial no grupo Carcinoma. Observamos também um índice alto de ex-fumantes (46,6%) e ex-alcoolistas (40%) no grupo dos pacientes com carcinoma espinocelular. A maior parte das lesões estava localizada em língua, assoalho bucal e palato. O exame histopatológico das 23 amostras de leucoplasias revelaram que 6 espécimes apresentaram displasia epitelial, 6 hiperparaceratose, 5 hiperortoceratose, 2 hiperplasia epitelial com hiperortoceratose, 1 hiperplasia inflamatória e 1 hiperplasia epitelial.

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

	<b>Grupo controle (n=22)</b>	<b>Grupo Álcool-Fumo (n=27)</b>	<b>Grupo Leucoplasia (n=23)</b>	<b>Grupo Carcinoma (n=21)</b>
<b>IDADE (média + DP)</b>	52,16 (±14,05)	48,3 (±11,58)	59,91 (±13,46)	66,09 (±7,96)
<b>GÊNERO</b>	100% Masculino	100% Masculino	43,5% Masculino	81% Masculino
<b>FREQUÊNCIA DE FUMANTES</b>		81,48% 7,4% Ex-fumantes	64,28% 28,5 % Ex-fumantes	46,60% 46,6% Ex-fumantes
<b>PACKYEARS (média + DP)</b>		29,20 (±12,64)	29,79 (±22,78)	66,49 (±93,17)
<b>CONSUMO DE CHIMARRÃO</b>	72%	85,18%	72,20%	60,00%
<b>BEBIDAS ALCÓOLICAS</b>		81,48% 18,51% Ex-consumidor	88,80% 5,5% Ex-consumidor	45% 40% Ex-consumidor
<b>CPOD (média + DP)</b>	7,25 (± 6,8)	10,5 (± 7,61)	14,94 (± 8,36)	22,61(± 8,14)
<b>LOCALIZAÇÃO DA LESÃO</b>			LINGUA ----- 31,8% PALATO ----- 27,2% ASSOALHO ----18,1% REBORDO-----9% LÁBIO-----4,5% M. JUGAL-----4,5% F. DE SULCO ----4,5%	LINGUA -----38,0% ASSOALHO---38,0% REBORDO----9,5% GENGIVA ----4,7% LÁBIO-----4,7%

A tabela 2 apresenta os resultados referentes à análise de AgNOR nos diferentes grupos. Foram observadas medianas maiores nos pacientes dos grupos de risco e com lesões em relação ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e Leucoplasia ( $p < 0,05$ ). Quando as leucoplasias foram estratificadas em relação ao diagnóstico histopatológico, observamos maiores medianas dos parâmetros de AgNOR nas leucoplasia não-displásicas ( $n=6$ ) em relação às leucoplasias displásicas ( $n=15$ ), porém sem diferença estatisticamente significativa. A correlação entre a exposição ao fumo (packyears) e mAgNOR foi avaliada pela

correlação de Spearman e não foi observada correlação significativa ( $R=0,061$ ,  $p=0,645$ ).

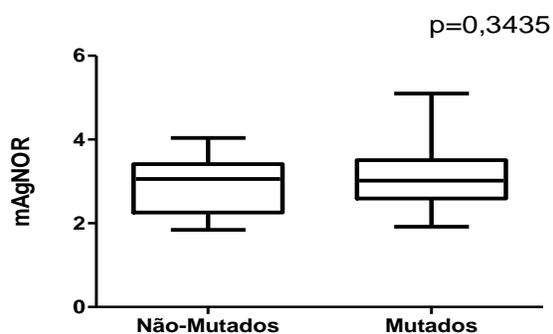
**Tabela 2.** Distribuição das variáveis de AgNOR de acordo com os grupos. Q1-Q3, intervalo interquartil.  $p$ , Teste de Kruskal-wallis.

	mAgNOR		pAgNOR>1		pAgNOR>2		pAgNOR>3		pAgNOR>4	
	mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Controle (n=22)	2.44a	(2.05-3.07)	74a	(66-88)	41a	(28-61)	15a	(9.5-32.5)	2a	(2-15)
Álcool-Fumo (n=27)	2.93a,b	(2.64-3.24)	86a,b	(76-90)	58a,b	(46-68)	30a,b	(16-44)	14a,b	(8-18)
Leucoplasia (n=23)	3.40b	(2.72-4.00)	92b	(80-1000)	74b	(54-90)	42b	(22-66)	20b	(8-36)
Leucoplasia Não-displásica	3.4A	(2.62-3.98)	96A	(80-100)	74A	(56-92)	42A	(18-66)	18A	(8-30)
Leucoplasia Displásica	2.96A	(2.5-4.0)	85A	(72.5-89)	58A	(43-77)	35A	(16.5-59.5)	18A	(6-36)
Carcinoma (n=21)	3.06a,b	(2.56-3.31)	90a,b	(80-95)	66a,b	(48-76)	34a,b	(18-45)	10a,b	(8-17)
$p$	0,0104		0,0071		0,011		0,0068		0,0012	

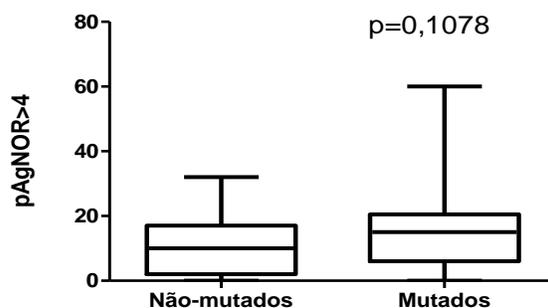
Após a quantificação, utilizamos o DNA para avaliar se há alteração cromossômica no locus 9p21 (Tabela 3). Observamos um aumento na frequência de mutações por perda de heterozigidade e instabilidade nos grupos expostos aos carcinógenos e nos grupos com lesão. A correlação entre mutações no gene *CDNK2A* com a velocidade de proliferação celular avaliada por mAgNOR (Gráfico 1), mostra que a velocidade de proliferação celular é semelhante nos pacientes com e sem mutação em 9p21. Observamos também que o percentual de células com mais do que 4AgNORs por núcleo (Gráfico 2) é maior nos pacientes que apresentaram mutação no locus 9p21. No entanto, esta associação não foi estatisticamente significativas.

**Tabela 3.** Frequência das alterações encontradas no locus 9p21 de acordo com os grupos estudados.

	PERDIDO		HOMOZIGOTO		RETENÇÃO		LOH		MSI		TOTAL Mutações	
	N	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
<b>Controle (n=22)</b>	1	4,5	4	18,2	9	40,9	4	18,2	4	18,2	<b>8</b>	<b>34,8</b>
<b>Álcool-Fumo (n=27)</b>	1	3,7	3	11,1	5	18,5	12	44,4	6	22,2	<b>18</b>	<b>66,7</b>
<b>Leucoplasia (n=23)</b>	1	4,3	1	4,3	5	21,7	13	56,5	3	13,0	<b>16</b>	<b>69,6</b>
<b>Não-displásica</b>	0	0	0	0	5	33,3	9	60	1	6,6	<b>10</b>	<b>66,6</b>
<b>Displásica</b>	1	16,6	1	16,6	0	0	2	33,3	2	33,3	<b>4</b>	<b>80</b>
<b>Carcinoma (n=21)</b>	3	14,3	1	4,8	9	42,9	5	23,8	3	14,3	<b>8</b>	<b>38,1</b>



**Gráfico 1.** Associação do mAgNOR com a perda da heteroziguidade no locus 9p21. Teste de Mann-Whitney,  $p=0,3435$ .



**Gráfico 2.** Associação do pAgNOR > 4 com a perda da heteroziguidade no locus 9p21. Teste de Mann-Whitney,  $p=0,357$ .

## Discussão

Os aspectos clínicos das lesões associados as características histopatológicas são os principais critérios utilizados para avaliar a possibilidade de transformação maligna de uma leucoplasia bucal.<sup>21 22,23</sup> Todavia, nem todas as leucoplasias que apresentam displasias epiteliais irão sofrer transformação maligna. De acordo com a literatura, aproximadamente 15% das lesões leucoplásicas que evoluem para um câncer bucal não apresentam atipias celulares.<sup>24,25</sup> Isso significa que a graduação histopatológica não é capaz de predizer quais lesões vão sofrer ou não transformação maligna. Dessa forma, fica evidente a fragilidade do atual modelo de predição do comportamento biológico destas lesões ao não traduzir de forma confiável e objetiva a evolução das leucoplasias bucais. Além disso, para os pacientes expostos à carcinógenos como o fumo e o álcool, mas sem lesão, a não indicação da biópsia e exame histopatológico impossibilita a avaliação do risco, visto que também apenas uma parte desses pacientes irá desenvolver o câncer bucal. Portanto, na busca de biomarcadores que sinalizem maior risco de transformação maligna, o principal objetivo deste estudo foi avaliar, por meio da citopatologia, a frequência de perda de heterozigosidade no locus 9p21 e a atividade proliferativa celular da mucosa bucal de indivíduos em grupos de risco para o câncer de boca- grupos Álcool-Fumo e Leucoplasia, comparando-os com indivíduos controle (não expostos a carcinógenos) e com indivíduos que já desenvolveram o carcinoma espinocelular.

A citologia esfoliativa é uma técnica fácil e indolor que pode ser muito útil para o rastreamento e monitoramento de pacientes com maior risco de desenvolver o câncer bucal, pois é uma forma de coleta não invasiva. Dessa forma, permite a análise da mucosa clinicamente normal, onde uma biópsia não seria indicada, além de permitir a coleta sistemática de amostras biológicas durante o monitoramento longitudinal dos pacientes.<sup>11,16</sup> Técnicas quantitativas são associadas à citopatologia para aumentar a quantidade de informações. A técnica de AgNOR é bastante utilizada por ser uma técnica de fácil execução e nos informar a velocidade de proliferação celular, uma das alterações iniciais no processo de carcinogênese.<sup>11,16</sup> No trabalho de Xie et al. (1999)<sup>26</sup>, foi estudada a correlação da técnica de AgNORs com um marcador de proliferação celular bastante usado na literatura que é o Ki-67, os resultados demonstraram que há

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

Observamos que o valor das medianas de mAgNOR e pAgNORs aumentaram quando analisamos pacientes dos grupos Álcool-Fumo, Leucoplasia e Carcinoma em relação ao grupo Controle, com diferença significativa entre os grupos Leucoplasia e Controle ( $p < 0,05$ ). Cançado et al. (2001)<sup>27</sup>, Paiva et al. (2004)<sup>11</sup>, Ahmed et al. (2009)<sup>28</sup> e Jindal S, Chauhan I e Grewal Hk (2013)<sup>29</sup> utilizaram o método da citologia para estudar pacientes controle e expostos aos fatores de risco álcool e fumo e também observaram um aumento da mAgNOR nos pacientes expostos em relação aos controles. O aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) no grupo Álcool-Fumo pode ter ocorrido em consequência do alto desvio padrão entre os indivíduos analisados. A variabilidade demonstrada pelos resultados obtidos pode representar o reflexo de uma condição individual, sugerindo que cada indivíduo exposto responde de maneira própria com maior ou menor sensibilidade a ocorrência de danos celulares causados pela exposição aos carcinógenos<sup>16</sup>. Outra observação importante é que dos 27 indivíduos do grupo álcool-fumo, quatro somente ingeriam bebidas alcoólicas dentro dos critérios de inclusão, ou seja, não possuíam o fumo como hábito associado. Jindal S, Chauhan I e Grewal Hk (2013)<sup>29</sup> observaram que o parâmetro mAgNORs foi estatisticamente maior no grupo que fumava e bebia quando comparado com os grupos que apresentavam esses hábitos isolados. Avaliando isoladamente a média de AgNORs dos pacientes do nosso estudo que apenas ingeriam álcool, observamos que seus valores eram menores (mAgNOR=2,64  $\pm$  0,39). Isso pode ter alterado o resultado final da análise quantitativa.

A maioria dos artigos encontrados na literatura utiliza a técnica da histologia (por meio de biópsia) para avaliação de AgNOR em casos de leucoplasias e carcinomas espinocelulares. Sharma e Saxena (2012)<sup>30</sup> foi o único estudo que encontramos que utilizou o método da citologia para avaliação quantitativa de AgNORS. Os grupos eram compostos por mascadores de tabaco com e sem lesões ceratóticas, fumantes com e sem leucoplasia displásica, pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular e indivíduos controle. Foi observado um aumento significativo na mAgNOR e percentual de células com mais de 3 e 5 AgNORS no grupo CEC, fumantes com e sem lesão e mascadores de tabaco em comparação com o controle ( $P < 0,05$ ). No nosso trabalho

também encontramos diferenças significativas nesses resultados entre o Grupo Controle e Leucoplasia.

Baseando-se em referências que utilizaram como metodologia cortes histológicos, resultado semelhante foi observado por Hildebrand et al. (2010)<sup>31</sup>, que comparou a mucosa normal com lesões leucoplásicas como acantose, hiperqueratose e displasia epitelial. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre a mucosa normal (grupo controle) e o grupos com e sem displasia epitelial o que corrobora o nosso estudo. Spolidorio et al. (2002)<sup>32</sup>, também observaram o aumento da mediana de mAgNOR nos grupos displasia epitelial e carcinoma microinvasivo em relação ao controle. Comparando os estudos, constatamos que os nossos valores observados são em torno de 10% superiores. Essa diferença pode ser devido ao tipo de metodologia utilizada (pois o estudo de Hildebrand et al.<sup>31</sup> e Spolidorio et al.<sup>32</sup> foram realizado em cortes histológicos e não em esfregaços citológicos), tamanho da amostra, sítios anatômicos diferentes, ou uma combinação destes fatores.

Quando subdividimos as leucoplasia em displásicas e não-displásicas, observamos que as displásicas apresentaram menores valores nos parâmetros de AgNOR que as leucoplasias não-displásicas, todavia sem correlação significativa entre os valores. Hildebrand et al. (2010)<sup>31</sup> também não encontraram correlações significativas ao comparar o mAgNOR e pAgNOR entre os diferentes tipos de desordens epiteliais do seu estudo. Xie et al.<sup>20</sup> usando contagens de mAgNOR descobriram um aumento da taxa de proliferação do epitélio normal à leucoplasia e carcinoma, mas não foram capazes de distinguir uma diferença significativa entre leucoplasias displásicas e não-displásicas. A correlação não significativa pode ser reflexo do número limitado de amostras em cada grupo quando as leucoplasias foram estratificadas, foi comparada 6 displasias epiteliais com 15 desordens epiteliais não displásicas (hiperplasia epitelial, hiperparaceratose e hiperortoceratose). Além disso, há um consenso na literatura de que é grande a discordância intra e inter-examinador na graduação histopatológica das leucoplasias, resultando em dificuldades na avaliação do prognóstico do paciente. Isso pode, além de dificultar conclusões precisas sobre os eventos progressivos e regressivos das leucoplasias, também dificultar o valor preditivo das alterações celulares para os eventos de malignização.<sup>33,34</sup> Devemos levar em

consideração, ainda, a imprevisibilidade do comportamento biológico desta lesão. De acordo com Nunes<sup>35</sup> uma maior ou menor contagem de AgNORs pode apontar, na realidade, uma evolução ou regressão da lesão leucoplásica, a despeito de sua gradação histológica.

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

Observamos que a frequência de mutações no locus 9p21 foi maior nos grupos expostos aos carcinógenos e com lesões em relação ao controle. Os pacientes que apresentavam mutação em 9p21 apresentaram também uma tendência a maior velocidade de proliferação em relação aos pacientes sem mutações. Verificamos que a frequência de alterações em 9p21 aumenta nos pacientes expostos ao fumo e álcool, assim como nos pacientes com lesão, atingindo sua frequência máxima de cerca de 70% nos pacientes com leucoplasia. Estes achados estão em concordância ao trabalho de Califano et al. (1996)<sup>18</sup> e podemos então concluir que há uma alteração precoce no locus 9p21.

Todavia, cerca de 30% dos indivíduos controle também apresentaram mutações em 9p21. Mutações em controles benignos, também foram vistas por outros autores. Califano et al. (1996)<sup>18</sup>, observou LOH em 20% de lesões hiperplásicas benignas, e Accurso et al. (2010)<sup>36</sup> observou LOH e MSI em 9p21 em cerca de 50% dos fibromas estudados pelo seu grupo. Além disso, é interessante ressaltar que normalmente para que ocorra a transformação maligna, ambos os alelos normais dos genes supressores

do tumor devem estar lesionados. Isso sugere que mesmo ocorrendo a perda de heterozigosidade no gene, sua função ainda poderá ser mantida. No entanto, deve-se considerar o aumento do risco de instabilidade genômica e conseqüente inativação, pois já houve perda de material genético.<sup>37</sup>

Uma observação importante nos nossos resultados é que a freqüência de mutações no grupo carcinoma foi menor em relação ao grupo leucoplasia. Assim como apresentou valores mais baixos nos parâmetros de AgNOR em relação ao grupo leucoplasia. Isso possivelmente se deve a um viés da coleta, pois no momento da coleta da lesão maligna, que usualmente encontra-se ulcerada e bastante friável, ocorre sangramento e o sangue é coletado juntamente com as células esfoliadas. Dessa forma, temos a presença de células do estroma no esfregaço, alterando assim as taxas de perda de heterozigosidade e proliferação nesse grupo.

É importante considerar que além da perda de heterozigosidade em 9p21, também existem outros mecanismos que inativam a proteína p16, e da mesma forma que esta estão associados ao risco de cancerização de leucoplasias. Um desses mecanismos é a metilação de *CDKN2A*.<sup>38,39</sup> Também já foram observadas mutações pontuais, mas de acordo com a literatura são menos freqüentes, os mecanismos mais comuns de inativação são perda da heterozigozidade (LOH) e a metilação, sendo que a literatura reporta que LOH acontece em torno de 39% das leucoplasias bucais, enquanto que em nosso estudo a LOH de 9p21 ocorreu em torno de 56% das leucoplasia estudadas.<sup>40</sup>

## **Conclusões**

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

## Referências

1. Neville BW, DAY TA. Oral Cancer and precancerous lesion. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52:195-215.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Accessed in May 15, 2015.
3. Van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18:33-37.
4. Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today.* 1997; 3:442-448.
5. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14: 47-62.
6. Banóczy J, Rigó O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 1991;19:265-267.
7. Schepman EM, Smeele LE, Van Der Waal, I. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B:416-419.
8. Delilbasi C, Akman H, Redezep E, et al; Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. *Turk J Med Sci.* 2003;33:39-42.
9. Scheifele C, Reichart P, Dietrich, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2003; 39: 619–625.
10. Jahanbani J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 iranian textile workers. *Oral Dis.* 2003;9:302–304.
11. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados . AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analyt Quant Cytol Histol.* 2004;26:175-180.
12. Rosin MP, Poh CF, Elwood JM, et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. *J Can Dent Assoc.* 2008;74:261–266.
13. Zhang L, Poh CF, Williams M, et al. Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles – Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5:1081–1089.

14. Li JMJ , Poi MJ, Tsai MDT. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer .*Biochemistry* .2011;50(25):5566–5582.
15. Bremner JF, Braakhuis BJM, Ruijter-Schippers HJ, et al. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Laboratory Investigation*.2005;85:1481–1488.
16. Spafford MF, Koch MW, Reed AL, et al. Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma among Exfoliated Oral Mucosal Cells by Microsatellite Analysis. *Clin Cancer Res*.2001;7:607-612.
16. Gedoz L, Lauxen IS, Sant'ana Filho M, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol*.2007;29:231-238.
17. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The Effect of Alcohol Consumption on Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2001;72:183-189.
18. Califano J, Riet PVD, Westra W. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res*.1996;56:2488-2492.
19. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*.1989;158:185–188.
20. Xie X, Clausen OP, Sudbø J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*.1997;79:2200-2208.
21. Jiang, WW., H. Fujii, et al. *Accumulative increase of loss of heterozygosity from 22. leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity*. *Cancer*. 2001; 92(9): 2349-2356.
22. Reibel, J. *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(1): 47-62.
23. Tilakaratne, WM., M. Sherriff, et al. *Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features*. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(7): 533-540.
24. Silverman, S., Jr., M. Gorsky, et al. *Leukoplakia, dysplasia, and malignant transformation*. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod*. 1996; 82(2): 117.
25. Silverman, S., Jr., M. Gorsky, et al. (1984). *Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients*. *Cancer* 53(3): 563-568.

26. Xie X, Angelis PD, Clausen OPF, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*. 1999; 35:502-509.
27. Cançado RP, Yurgel LS, Sant'ana Filho M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Oral Oncol*. 2001;37(5):446-454.
28. Ahmed HG, Babiker AEA. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to tobacco and smoking. *Rare Tumors*. 2009;1(18):50-52.
29. Jindal S, Chauhan I, Grewal HK. Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organizer regions and micronuclei. *J Cytol* 2013;30:174-8
30. Sharma A, Saxena S. *Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion*. *Indian J Dent Res* 2012;23:251-6
31. Hildebrand LC, Carrard VC, Lauxen IS, Quadros OF, Chaves ACM, Sant'Ana-Filho M. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(2):328-334.
32. Spolidorio LC, Neves KA, Soaresb CP, et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. *Micron*. 2002;33:605–608.
33. Abbey, LM., G. E. Kaugars, et al. *Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995; 80(2): 188-191.
34. Karabulut, A., J. Reibel, et al. *Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions*. *J Oral Pathol Med*. 1995; 24(5): 198-200. Nunes FD Leucoplasia bucal: aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e histoquímicos. São Paulo, 1991. 83p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
35. Nunes FD Leucoplasia bucal: aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e histoquímicos. São Paulo, 1991. 83p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
36. Accurso BT, Warner BM, Thomas J, et al. Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112:359-366.
37. Robbins, Cotran. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

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

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

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

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

A literatura demonstra que é possível detectar alterações precoces em indivíduos expostos a esses fatores de risco (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007), o que tem incentivado a busca de biomarcadores que sinalizem maior predileção para o desenvolvimento do câncer bucal. A citopatologia tornou-se uma ferramenta importante neste campo de pesquisa por ser uma metodologia não invasiva, possibilitando a coleta de material biológico em pacientes sem lesão clinicamente, onde uma biópsia não é indicada. Além disso, permite a coleta sistemática de amostras biológicas sem causar danos ao paciente (BANOCZY, 1976).

Por acreditarmos no potencial desse tipo de metodologia utilizamos no nosso trabalho a análise de AgNORs, que é uma técnica quantitativa que analisa a velocidade de proliferação celular, uma das principais alterações que surge ao longo do processo de carcinogênese (DERENZINI et al., 1998; DERENZINI et al., 2000). Esta técnica já

demonstrou anteriormente alterações em indivíduos expostos aos fatores de risco, além de ser uma técnica com alta praticidade e baixo custo. Estudos comprovam que indivíduos expostos aos fatores de risco apresentem maiores quantidades de AgNORS, no entanto, também é evidente o caráter individual dessa variação (PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al., 2007). Por este motivo, decidimos associar a técnica de AgNOR com uma análise molecular de mutações em um gene supressor de tumor.

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

Um objetivo importante deste estudo foi correlacionar os níveis de AgNOR com a análise molecular da integridade do locus 9p21 onde está localizado o gene supressor tumoral *CDNK2A*. A análise de AgNOR já mostrou-se bastante útil para verificar alterações na atividade proliferativa de indivíduos fumantes e/ou alcoolistas. A correlação com a perda de heterozigotidade num gene que controla o ciclo celular seria mais uma forma de validar esta análise, mostrando que a velocidade de proliferação celular é um reflexo de alterações no ciclo celular. Nossos resultados mostram uma tendência de maior atividade proliferativa nos pacientes com mutações em 9p21, no entanto, esta não foi estatisticamente significativa.

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

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

como aqueles que apresentam uma leucoplasia devem ser considerados como de risco e acompanhados de perto.

## REFERÊNCIAS

- ANTUNES, J. L. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 4, p. 345-350, 2001.
- BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytology examinations in the early diagnosis of oral cancer. **Int. Dent. J.**, Bedford Hills, v. 26, no. 4, p. 398-404, 1976.
- BANÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, no. 5, p. 265-267, 1991.
- BARNES, L. et al. (Ed.). **Pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 177-179.
- BIAZEVIC, M.G. et al. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n.10, p. 2105-2114, 2006.
- CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, p. 2488-2492, 1996.
- CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; SANT'ANA FILHO, M. Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 5, p. 446-454, 2001.
- CARRARD, V. C. et al. Alcohol and oral cancer: comments on related mechanisms. **Rev. Bras. Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.
- CARRARD, V. C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 17, p. 171-179, 2010.
- CASTELLSAGUE, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, New York, v. 108, p. 741-749, 2004.
- CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 115, no. 4, p. 813-824, 2005.
- DELILBASİ, C. et al. Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. **Turk J. Med. Sci.**, [S.l.], v. 33, p. 39-42, 2003.
- DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 32, p. 149-192, 1991.
- DERENZINI, M. et al. Nucleolar Function and Size in Cancer Cells. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 152, no. 5, p. 1291-1297, 1998.

- DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissue. **J. Pathol.**, New York, v.191, no. 2, p. 181-186, 2000.
- GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 29, no. 4, p. 231-238, 2007.
- GUERRA, E. N. S. et al. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p. 31-37, 2005.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, New York, v.144, no. 4, p. 646-674, 2011.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. **Biol. Cell**, New York, v. 49, no. 3, p. 191-202, 1983.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> >. Acesso em: 15 maio 2015.
- JAHANBANI, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 iranian textile workers. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 9, no. 6, p. 302–304, 2003.
- JAMES, W. R.; DAVID, S. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 264, p.42–55, 2001.
- KRAMER, R. H. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 46, no. 4, p. 518-539, 1978.
- LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, p. 302-312, 1997.
- LI, J. M. J.; POI, M. J.; TSAI, M. D. T. The regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and relevance to cancer. **Biochemistry**, [S.I.], v. 50, no. 25, p. 5566–5582, 2011.
- LOYO, M. et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head Neck**, New York, v. 35, no. 3, p. 454–463, 2013.
- MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol. Med. Today**, Cambridge, v. 3, p. 442-448, 1997.
- NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesion. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 52, p.195-215, 2002.

- OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. A etiology of oral cancer: alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 36, no. 4, p. 247-251, 1998.
- OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no. 5, p. 216-220, 1999.
- PAIVA, R. L. et al. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v. 26, no. 3, p. 175-180, 2004.
- PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 55, no. 2, p. 74-108, 2005.
- QUINN, C. M.; WIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J. Pathol.**, New York, v. 160, no. 2, p. 93-102, 1990.
- RAYESS, H.; WANG, M. B.; SRIVATSAN, E.S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. **Int. J. Cancer**, New York, v. 130, p. 1715 - 1725, 2012.
- REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 14, p. 47-62, 2003.
- ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 6, no. 2, p. 357-62, 2000.
- ROSIN, M. P. et al. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 62, p. 6447-6450, 2002.
- ROSIN, M. P. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 74, no. 3, p. 261-266, 2008.
- SCHEIFELE, C.; REICHART, P.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 6, p. 619-625, 2003.
- SCHEPMAN, E. M.; SMEELE, L. E.; VAN DER WAAL, I. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, London, v. 32B, no. 6, p. 416-419, 1996.
- TREERÉ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 127-131, 2000.

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

VAN DER WAAL I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v.1, no. 18, p. 33-37, 2013.

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

XIE, X. et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, [S.I.],v. 79, no. 11, p. 2200-2208, 1997.

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

ZHANG, L. et al. Loss of Heterozygosity (LOH) profiles – validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prev. Res.**, Philadelphia, v. 5, no. 9, p 1081–1089, 2012.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

 <p><b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ- REITORIA DE PESQUISA -</p>	 <p>Plataforma Brasil</p>
<p><b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b></p>		
<p><b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b></p>		
<p><b>Titulo da Pesquisa:</b> ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL</p>		
<p><b>Pesquisador:</b> Fernanda Visioli</p>		
<p><b>Área Temática:</b></p>		
<p><b>Versão:</b> 3</p>		
<p><b>CAAE:</b> 06949612.7.0000.5347</p>		
<p><b>Instituição Proponente:</b> Universidade Federal do Rio Grande do Sul</p>		
<p><b>Patrocinador Principal:</b> Faculdade de Odontologia</p>		
<p><b>DADOS DO PARECER</b></p>		
<p><b>Número do Parecer:</b> 261.037</p>		
<p><b>Data da Relatoria:</b> 04/04/2013</p>		
<p><b>Apresentação do Projeto:</b></p>		
<p>Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.</p>		
<p><b>Objetivo da Pesquisa:</b></p>		
<p>Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.</p>		
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b></p>		
<p>Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.</p>		
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b></p>		
<p>Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.</p>		
<p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b></p>		
<p>Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.</p>		
<p>Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro          Bairro: Farcopilha CEP: 90.040-060          UF: RS Município: PORTO ALEGRE          Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br</p>		
<p>Página 01 de 02</p>		

 <b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ- REITORIA DE PESQUISA -</b>	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Continuação do Parecer: 261.037

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

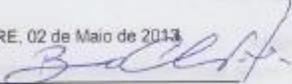
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**  
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Situação do Parecer:**  
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**  
Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**  
Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 02 de Maio de 2013



Assinador por: <b>José Artur Bogo Chies</b> (Coordenador)	<b>Bruno Cassel Neto</b> Vice-Pró-Reitor de Pesquisas PROPEQU/FRG
-----------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------

## ANEXO B– QUESTIONÁRIO APLICADO AO PACIENTE

Entrevistador: \_\_\_\_\_

### 1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação \_\_\_\_\_

1.2. Identidade \_\_\_\_\_

1.3. Endereço \_\_\_\_\_

1.4. Telefone \_\_\_\_\_

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

1.6. Qual sua data de nascimento: \_\_\_\_\_ Qual sua idade hoje \_\_\_\_\_

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

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

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

1.10. Você estudou até:

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

### 2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

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

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

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

1 ( ) nada 2 ( ) palito 3 ( ) fio dental 4 ( ) outro \_\_\_\_\_

2.4. Você usa algum produto para bochecho

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

2.5. Com que frequência

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

## 2.6. Quando iniciou o uso?

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

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

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

## 3. Fatores comportamentais

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

3.2 Quantos cigarros por dia \_\_\_\_\_

3.3 Há quantos anos\_\_\_\_\_

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

3.5 Quantos cigarros por dia\_\_\_\_\_

3.6 Por quantos anos\_\_\_\_\_

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar\_\_\_\_\_

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

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

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

5( ) outros\_\_\_\_\_

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana \_\_\_\_\_

## 4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes ( ) ( ) ( )

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

4.3 Doença cardíaca ou renal ( ) ( ) ( )

4.4. Artrite ( ) ( ) ( )

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

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

4.7. Qual ?\_\_\_\_\_

## ANEXO C - TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DAS AgNORs\*

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

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

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