

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

**QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE AgNORs EM CÉLULAS
DESCAMADAS DA MUCOSA BUCAL E SUA RELAÇÃO COM O
TAMANHO DO NÚCLEO EM INDIVÍDUOS FUMANTES**

TATIANA ANDREA SOARES PINTO

Dissertação elaborada como parte
dos requisitos obrigatórios para a
obtenção do título de Mestre em
Patologia Bucal.

Orientador: Prof.Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, junho de 2001.

S676a

Soares Pinto, Tatiana Andrea

Quantificação do número de AgNORs em células descamadas da mucosa bucal e sua relação com o tamanho do núcleo em indivíduos fumantes / Tatiana Andrea Soares Pinto ; Orientação de Pantelis Varvaki Rados. – Porto Alegre, 2001.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Curso de Mestrado em Odontologia - Patologia Bucal.

1. Mucosa bucal 2. Citopatologia 3. Relação núcleo/citoplasma
4. Fumo 5. AgNORs I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Odontologia II. Título

Eloisa Futuro Pfitscher
CRB 10/598

CDU 616.31

“Não é possível existir naquilo que não fomos, naquilo que não vivemos; mas é possível crescer através daquilo que buscamos, daquilo que sentimos.”

GOETHE

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar ao meu lado em todos os momentos.

À família que proporcionou a formação do meu caráter,

Em especial à ti **mãe** por sempre me mostrares o quanto é importante progredir. Mais que isso, por conseguires provar que a vida é para ser conquistada e que apesar dos obstáculos tudo é possível. Como dizes, o que importa é sermos verdadeiros, acreditarmos no amor e buscarmos aquilo que nos faz feliz.

Às minhas irmãs **Nessa** e **Gi**, que apesar de me verem crescer, guardam em seu coração a minha imagem da infância.

Ao meu **pai** e minha **vózinha**, que Deus proteja e abençõe. E que através da mente eu consiga expressar a alegria que sinto por ter vivenciado etapas inesquecíveis da minha vida junto a vocês.

Ao **Rodrigo**, que através da convivência se revelou um grande companheiro. Com quem eu divido minhas tristezas e multiplico as alegrias. Seria redundante dizer que te amo, mas eu não me perdoaria se não te dissesse o quanto te agradeço por me ensinares a valorizar minhas qualidades e aceitar meus defeitos.

À **Dra. Magali**, pelos seus conselhos e ensinamentos. Por me mostrar um pouco mais sobre mim mesmo.

À família que viabilizou o meu progresso profissional,

Em especial ao meu orientador **Prof.Dr. Pantelis**, pelo carinho e dedicação dispensados nestes cinco anos de convivência. Por ter valorizado a minha força de vontade e me dado a oportunidade de ser considerada filha de “Deus”. Mais que isso, por ser um grande amigo, conselheiro e por ter como qualidade o discernimento.

Ao **Prof.Dr. Manoel**, pela sua sinceridade acima de tudo. Por ser capaz de traçar desafios e ser incansável na sua conquista. Desses anos de convivência posso afirmar que o resultado é o respeito e a admiração.

Ao **Prof.Dr. Onofre**, por ser insubstituível. Por me acompanhar desde o início da graduação e estar sempre disposto a compartilhar a sua experiência. Muito obrigada pelos conselhos, pelo carinho e pela compreensão.

Ao **Prof.Dr. Barbachan**, por suas atividades junto à diretoria da nossa Faculdade e por dedicar grande parte de sua vida à Odontologia.

À **Isabel**, por sua amizade e perfeição no processamento laboratorial.

À **Adriana e Rose**, por me concederem sempre um sorriso e me lembrarem de tudo aquilo de bom que a vida é capaz de nos proporcionar a cada momento.

À **CAPES** e à **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, por incentivarem a pesquisa e proporcionarem um ensino de qualidade.

À equipe da cirurgia,

À **Profa.Dra. Edela Puricelli**, por seu exemplo de vitória e luta à favor da Odontologia. Afirmando o meu respeito e carinho.

Ao **Prof. João Batista**, pela sua amizade e por manter sempre as portas abertas. E aos demais membros da equipe e funcionários da esterilização, o meu sincero agradecimento.

Um muito obrigado aos meus **amigos**,

Kelly, Lú, Anelisa, Cláucia, Chris, Fernando, Lisi Hehn, Gustavão, Juju, Cris, Ane, Mônica, Clélea, Fábio, Júlio, Sapo, Brillhante, Pati, Sal, Dani, Alice, Luhana, Carol, Verônica, Vinícius, Paulinha e aos demais **colegas** que compartilharam esta conquista.

Para os **amigos do peito**, é com certeza desnecessário citar nomes, todos por si só já se identificaram e espero que saibam que prezo muito o fato de poder conviver a cada momento e de aprender a cada conversa. Agradeço a todos o ombro para o desabafo, a compreensão e o carinho.

Ao **peçoal do consultório**,

Gorda, Tica, Pati, Simone, Nando e demais colegas reafirmo a felicidade que sinto em fazer parte deste ambiente de amizade e trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
RESUMO.....	16
SUMMARY.....	18
INTRODUÇÃO.....	20
REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1. Câncer.....	22
2. Tabaco.....	23
3. Citopatologia e Carcinogênese.....	24
4. Método de Impregnação pela Prata das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs).....	30
PROPOSIÇÃO.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	67

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Projeto na Comissão Científica e Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS

ANEXO II – Consentimento informado

ANEXO III – Termo de consentimento

ANEXO IV – Modelo de ficha para cadastramento dos pacientes

ANEXO V – Técnica de impregnação pela prata das AgNORs

ANEXO VI – Técnica de Papanicolaou Modificada

ANEXO VII - Critério para análise morfológica dos esfregaços obtidos pelo método de Papanicolaou

ANEXO VIII – Critério para classificação dos esfregaços obtidos pelo método de Papanicolaou

***LISTAS DE ABREVIATURAS, TABELAS,
GRÁFICOS E FIGURAS***

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR	Silver-staining Nucleolar Organizer Regions Regiões Organizadoras Nucleolares Impregnadas pela Prata
DNA	Desoxyribonucleic Acid Ácido Desoxiribonucleico
<i>et al</i>	e colaboradores
IMAGELAB®	Sistema de processamento e análise de imagens
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KI	Karyopyknotic Index Índice Cariopicnótico
Ki67/ MIB1	Marcador de proliferação celular
N/C	Relação núcleo/citoplasma
NORs	Nucleolar Organizer Regions Regiões Organizadoras Nucleolares
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen Antígeno nuclear de proliferação celular
px	pixels (unidade de medida)
rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleic Acid Ácido Desoxiribonucleico Ribossômico

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição e freqüência dos esfregaços classificados e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado nos grupos de fumantes e não-fumantes de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2001.47

TABELA 2: Comparação dos valores médios da relação núcleo/citoplasma (N/C) e a sua respectiva referência aproximada relativa à proporção entre a área nuclear e a citoplasmática das células obtidas de esfregaços nos diferentes sítios bucais de pacientes fumantes e não-fumantes. Porto Alegre. 2001.49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Distribuição da amostra segundo a faixa etária.46
GRÁFICO 2: Comparação entre a média do número de AgNORs por núcleo em relação ao grupo fumante e não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.48
GRÁFICO 3: Comparação da relação núcleo/citoplasma (N/C) entre o grupo fumante e não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.49
GRÁFICO 4: Relação entre o número de AgNORs por núcleo e o respectivo tamanho de área nuclear (pixels).50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando células epiteliais superficiais nucleadas (Classe I). Coloração Papanicolaou Modificado. (100x).	40
FIGURA 2: Fotomicrografia de esfregaço de língua mostrando células epiteliais superficiais nucleadas com presença de infiltrado inflamatório (Classe II). Coloração Papanicolaou Modificado. (100x).	40
FIGURA 3: Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando células epiteliais superficiais nucleadas (Classe I). Coloração de Papanicolaou Modificado (400x).	41
FIGURA 4: Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando célula epitelial superficial nucleada com presença de células inflamatórias (Classe II). Coloração de Papanicolaou Modificado (400x).	41
FIGURA 5: Fotomicrografia de célula atípica impregnada pela prata observada em esfregaço de soalho bucal de paciente fumante. Verifica-se presença de 3 AgNORs no interior da área nuclear e alteração da relação núcleo/citoplasma. Técnica de impregnação pela prata. (400x).	43
FIGURA 6: Fotomicrografia de célula superficial nucleada impregnada pela prata observada em esfregaço de soalho bucal de paciente fumante. Verifica-se presença de 7AgNORs no interior da estrutura nuclear. Técnica de impregnação pela prata. (400x).	43

RESUMO

RESUMO

A citopatologia bucal é um método de diagnóstico baseado em células obtidas por raspagem. Com a finalidade de constatar quantitativamente as alterações celulares ocasionadas pelo fumo em mucosa bucal clinicamente normal, durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS de 2000, foram selecionados todos os indivíduos homens, fumantes e não-fumantes, acima de 40 anos e sem lesão bucal aparente. O processo de seleção resultou em um total de 13 fumantes e 9 não-fumantes. Os sítios bucais estudados foram: vermelhão do lábio inferior, porção anterior do soalho bucal e borda da língua. De cada sítio estudado foram obtidos dois esfregaços, sendo o primeiro submetido à técnica de impregnação pela prata (AgNORs) para avaliação quantitativa via IMAGELAB® e o segundo ao método de Papanicolaou Modificado para confirmação de normalidade. Através do teste estatístico Mann-Whitney ($p=0,05$) foram obtidos os seguintes resultados: (1) em soalho, o número de AgNORs por núcleo foi superior em fumantes comparado ao grupo não-fumantes; (2) em língua, a relação núcleo/citoplasma em fumantes é maior em comparação aos não-fumantes; (3) em lábio, o grupo com média acima de 3 AgNORs/núcleo apresentou área nuclear maior. Considerando que cada sítio possui comportamento específico frente às injúrias ocasionadas pelo fumo, concluímos que as referências quantitativas de relação núcleo/citoplasma e número de AgNORs/núcleo são eficazes para o controle de alterações celulares prévias à lesão bucal visível.

SUMMARY

SUMMARY

Cytopathology is a diagnostic method based on cell scraping. The aim of this study was to quantify cell alterations from smoking habits. For this purpose, every male over 40 years of age, smokers and non-smokers with no apparent oral lesion, was selected, during the 2000 Campaign Against Cancer in Novo Hamburgo/RS. The select process resulted in 13 smokers and 9 non-smokers. The sites selected for study were lips, tongue and the floor of the mouth. For each site, two scrapings were made, being the first submitted to silver staining (AgNORs) and quantitative analysis by the Imagemlab system, and the second to the Modified Papanicolaou method, to confirm normality. The Mann-Whitney statistical analysis ($p=0,05$) displayed the following results: (1) in the floor of the mouth, the number of AgNORs for each nucleus was superior in smokers when compared to non-smokers; (2) the nucleus/cytoplasm relationship in smokers' tongue is greater than non-smokers; (3) in the lips, there was a greater nuclear area in the group with averages over 3 AgNORs/nucleus. Each site displayed a specific behavior to the injuries determined by the smoking habits. Thus, it could be concluded that the quantitative references of nucleus/cytoplasm relationship and the quantity of AgNORs/nucleus are efficient to assess cell alterations prior to a visible oral lesion.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A citopatologia bucal é um método laboratorial de exame baseado na observação de células obtidas por raspagem para avaliação do padrão morfológico celular. Tal método permite a verificação de alterações celulares prévias à presença de lesão bucal clinicamente visível. O emprego de técnicas quantitativas em citopatologia visam a obtenção de maior sensibilidade em relação ao diagnóstico precoce do câncer bucal. No presente estudo, serão quantificados o número de AgNORs por núcleo e mensuradas as áreas nuclear e citoplasmática de células observadas em esfregaços de mucosa bucal clinicamente normal de fumantes e não-fumantes obtidos do lábio, soalho bucal e língua. A comparação entre os resultados obtidos nos diferentes grupos visa constatar quantitativamente as alterações celulares prévias à presença de lesão bucal clinicamente visível relacionadas aos efeitos do fumo.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1.Câncer

O Ministério da Saúde estima que no ano de 2001 serão registrados 305.330 novos casos e 117.550 óbitos por câncer em todo o Brasil. Sendo estimados para o sexo masculino 150.450 casos novos e 63.330 óbitos. Para o sexo feminino 154.880 novos casos e 54.220 óbitos. Especificamente em relação ao câncer de boca, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) calcula, em relação ao sexo masculino, 7.940 novos casos e 2.565 óbitos. Em relação ao sexo feminino estima 2.625 novos casos e 660 óbitos (INCA, 2001).

CONLEY e SADOYAMA (1973) constataram que de 90 casos de carcinoma de células escamosas em mucosa jugal avaliados, 91% ocorreram após os 40 anos de idade, sendo a maior incidência entre os 60 e 70 anos. Dentre o total de casos estudados, 65% ocorreram em homens, havendo uma forte correlação com o hábito de fumar.

BOYLE *et al.*(1990) baseados em dados mundiais sobre a epidemiologia do câncer de boca afirmam que esta patologia é mais prevalente em homens com idade avançada. Além disso, mencionam que o fumo e o consumo de álcool são identificados como importantes fatores de risco para o câncer bucal.

PINHOLT, RINDUM e PINDBORG (1997) em um estudo retrospectivo de 100 casos de câncer de boca diagnosticados consecutivamente entre 1986 e 1991, observaram que a ocorrência de câncer bucal é mais freqüente acima dos 40 anos de idade. Neste estudo, 55% dos casos ocorreram entre 60 e 79 anos.

Dentre os sítios bucais de possível ocorrência do câncer, os de maior prevalência são: borda vermelha do lábio inferior, soalho bucal e superfícies lateral e ventral da língua (JORDAN e DALEY, 1997).

2. Tabaco

HOFFMANN e WYNDER (1986) afirmam que o tabaco contém mais de 3900 constituintes químicos. Dentre esses, diversos compostos orgânicos apresentam ação genotóxica e carcinogênica conhecida. Tais substâncias incluem os alcanos, as nitrosaminas, os hidrocarbonetos aromáticos, os hidrocarbonetos heterocíclicos e as aminas (LÖFROTH,1989).

A partir do estudo dos efeitos do fumo e a etiologia do câncer de boca, laringe e faringe, CHOI e KAHIO (1991) constataram que o risco de ocorrência de câncer está relacionado ao número de cigarros consumidos por dia e ao tempo de duração do hábito. Em relação a fumantes e ex-fumantes, o risco de ocorrência de câncer diminui gradualmente após o abandono do hábito (CHOI e KAHIO,1991; LEWIN *et al.*,1998).

SOARES PINTO, PHILIPPI e RADOS (2000), a partir da avaliação citopatológica da mucosa bucal normal de indivíduos fumantes e

não-fumantes, verificaram a presença de alterações celulares - como o aumento do volume nuclear em relação ao citoplasmático - prévias à manifestação clínica visível. Sendo considerada a citopatologia um método eficaz na prevenção do câncer bucal.

3. Citopatologia e Carcinogênese

PAPANICOLAOU (1941), buscando determinar os efeitos do estrogênio sobre o epitélio da mucosa vaginal, transformou a citopatologia em um método de uso simples e rápido para observação da morfologia celular. Em 1943, PAPANICOLAOU e TRAUT constataram a possibilidade de identificação da presença de células neoplásicas em esfregaços obtidos e corados por este método. Tais pesquisas resultaram na adoção do Método de Papanicolaou para o diagnóstico precoce e prevenção do câncer de colo de útero.

MONTGOMERY (1951), mediante a utilização da técnica de Papanicolaou em esfregaços de mucosa bucal normal, observou que o padrão celular varia conforme o sítio anatômico envolvido, porém não sofre alteração significativa considerando os fatores: idade, sexo e ciclo menstrual.

Mediante a tentativa de padronizar as características celulares presentes em esfregaços de mucosa normal, neoplasias benignas e malignas da cavidade bucal, SILVERMAN Jr, BECKS e FARBER (1958) observaram que, dependendo do grau de maturação do tecido, as células oriundas de esfregaços de mucosa bucal normal assumem características morfológicas e tintoriais distintas. De acordo com esse aspecto, SANDLER

et al. (1960) classificaram as células observadas em esfregaços de mucosa normal como: basais, pré-ceratinizadas e ceratinizadas. Sendo as células para-basais normalmente coradas de verde-azulado, apresentando núcleo granular regular e nucléolos pequenos. As células escamosas pré-ceratinizadas de formato irregular, planas, poliédricas e de núcleo mais denso e menor, com relação núcleo/citoplasma variando de 1:6 a 1:50 ou mais. E as células ceratinizadas alaranjadas ou mais comumente rosadas, podendo apresentar núcleo picnótico ou serem anucleadas. Em relação aos esfregaços derivados de carcinomas, observa-se presença de células atípicas apresentando um ou mais dos critérios comumente aceitos para a determinação de alterações celulares compatíveis com malignidade. Sendo estes basicamente descritos como: (1)alterações no padrão de distribuição da cromatina nuclear, (2)presença de núcleos aumentados, (3)aumento da relação núcleo/citoplasma, (4)hipercromatismo nuclear, (5)nucléolos múltiplos e proeminentes.

Segundo WALKER (1962) e SANDLER (1964), a confiabilidade do resultado referente ao diagnóstico de alterações celulares depende de fatores que incluem a coleta de uma amostra representativa de células do tecido, e a competência do examinador em distinguir entre a morfologia normal do padrão celular e a ocorrência de malignidade.

O fato de a técnica de obtenção e fixação de esfregaços citopatológicos ser simples, rápida, indolor e atraumática, segundo SANDLER (1964) possibilita a utilização da citopatologia para avaliação de lesões bucais por médicos e dentistas, especializados ou clínicos gerais.

GOLDSBY, NEWTON e STAATS (1964) citam a mensuração do tamanho celular e nuclear, bem como a determinação da relação núcleo/citoplasma, como os três mais importantes fatores a serem considerados na determinação do grau de normalidade de esfregaços bucais.

A citologia fundamenta-se no processo fisiológico de renovação celular. O epitélio pavimentoso estratificado sob condições normais encontra-se em constante processo de esfoliação. Dessa forma, a descamação das células superficiais segue um “turnover” normal nos epitélios. As células das camadas mais profundas do epitélio normal possuem fortes ligações entre si. Nos casos de alteração de maturação, tais células sofrem perda da adesividade e passam a descamar juntamente com as células superficiais. Tal fenômeno explica a possibilidade de coleta, através da realização do esfregaço citopatológico, e posterior avaliação microscópica de possíveis alterações no padrão celular obtido (CAHN, 1965).

Buscando verificar as possíveis alterações no processo de maturação celular do epitélio bucal normal decorrentes dos efeitos do fumo, BROWN e YOUNG (1970) avaliaram através da citopatologia a variação do padrão celular nos seguintes sítios bucais: palato duro, mucosa jugal e borda lateral dorsal da língua. Como critério de avaliação, os autores utilizaram o KI (*Karyopyknotic Index*) que representa a proporção entre células superficiais anucleadas e células superficiais com núcleo picnótico em relação à totalidade das células avaliadas em cada esfregaço. Os resultados

obtidos referentes ao aumento do KI em todos os sítios bucais avaliados, segundo BROWN e YOUNG (1970), indicam a exposição ao fumo um fator capaz de alterar significativamente o processo de maturação celular do epitélio normal.

FOLSOM *et al.* (1972) afirmam que um dos maiores valores em relação à citologia esfoliativa é o fato de esta ser uma técnica não-invasiva que possibilita uma simples e indolor coleta de células de diferentes camadas do epitélio para observação microscópica.

BERNSTEIN e MILLER (1978) citam a utilização da citopatologia como método de diagnóstico de câncer bucal, displasias e outras doenças específicas desde que as limitações desta técnica sejam perfeitamente entendidas e consideradas. COWPE e LONGMORE (1981) citam a utilização de técnicas quantitativas em citopatologia como recurso para a obtenção de maior sensibilidade desse método de diagnóstico na detecção do câncer bucal.

A partir da avaliação da ultraestrutura celular da mucosa bucal clinicamente normal de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas no trato aerodigestivo superior, INCZE *et al.* (1982) constataram o aumento da área nuclear e a alteração da relação núcleo/citoplasma. Segundo os autores, a mucosa aparentemente normal de pacientes susceptíveis aos efeitos carcinogênicos do tabaco revelam anormalidades morfológicas compatíveis com o conceito de que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que consiste na ocorrência de sucessivas alterações genômicas durante um longo período de tempo. INCZE *et al.*

(1982) afirmam que a presença de células inflamatórias na porção epitelial, apesar de não ser uma anormalidade celular, é um dado importante porque sugere uma provável presença de espaços intercelulares na membrana basal que permitem a migração destas células inflamatórias.

ODGEN, COWPE e GREEN (1990), através da avaliação quantitativa de células observadas em esfregaços de mucosa jugal normal de pacientes fumantes e não-fumantes, observaram por intermédio de um sistema computadorizado de análise de imagens que o grupo fumante possui aumento significativo da área nuclear em comparação ao não-fumante. Em relação à área citoplasmática, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Microscopicamente as lesões cancerizáveis podem apresentar graus de displasia epitelial, variando desde uma discreta alteração citológica e arquitetônica de uma displasia moderada até anormalidades como pleomorfismo celular, incluindo alto índice de mitoses ou presença de mitoses atípicas observadas na displasia severa (Mac DONALD e SAKA¹, 1991 apud JORDAN e DALEY, 1997). A etiologia relacionada ao câncer envolve diversos fatores e consiste em um processo progressivo compreendido como: iniciação, promoção e progressão tumoral (SCULLY, 1992). Diversas etapas relacionadas a alterações de comportamento e morfologia celular antecedem a ocorrência do câncer bucal (SPEIGHT e MORGAN, 1993).

1. MACDONALD, D.G.; SAKA, S.M. Structural indicators of the high risk lesion. In: JOHNSON, N.W. **Risk markers for oral diseases**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 165-187.

Em geral, o aumento da severidade da displasia está associado a um aumento do risco de transformação maligna (LUMERMAN, FREEDMAN e KERPEL, 1995).

Eventos genéticos relacionados a modificações do DNA resultam na aquisição do genótipo maligno. Tendo caráter fundamental para o desenvolvimento do câncer, as alterações relativas a um número de oncogenes. Tal fator, associado à presença de mutações e deleções, têm sido identificados como parcialmente responsáveis pela ocorrência do carcinoma bucal (CALIFANO, 1996).

Basicamente os fatores etiológicos relacionados ao câncer podem ser definidos como alterações genéticas (mutações, deleções e alteração do número de oncogenes) e resultantes da exposição a carcinogênicos de origem externa (JORDAN e DALEY, 1997).

Com o objetivo de estudar a influência do fumo sobre a mucosa bucal em pacientes do sexo masculino acima dos 30 anos, SILVA e RADOS (1997) realizaram uma avaliação citológica qualitativa (observação dos critérios de malignidade celular de Papanicolaou) e quantitativa (contagem de células de diferentes graus de maturação) em esfregaços de mucosa bucal clinicamente normal de homens fumantes e não-fumantes coletados dos seguintes sítios: sítios lábio inferior, borda de língua e soalho bucal. No grupo dos fumantes foi observado maior número de esfregaços inflamatórios (classe II) e um aumento da velocidade de maturação celular ou menor adesividade das células epiteliais. A partir destes resultados, os autores

afirmam que o fumo altera o padrão citológico das áreas anatômicas avaliadas interferindo no processo de maturação celular. Além disso, SILVA e RADOS (1997) mencionam que tais alterações podem ser entendidas como uma adaptação do epitélio de revestimento bucal às agressões provocadas pelos agentes físico-químicos do fumo percebidas pela citologia mas ainda sem manifestações clínicas.

As alterações malignas na mucosa bucal são ocasionadas pelo acúmulo de mutações em genes reguladores de crescimento, resultando inicialmente em um aumento da atividade proliferativa celular e consequente distúrbio no processo de maturação epitelial. Tais aspectos podem ser observados clinicamente em leucoplasias. Este aumento da proliferação celular pode tornar as células epiteliais mais susceptíveis aos danos genéticos (GIROD *et al.*, 1998). Pelo fato de as alterações genéticas serem acumuladas durante a carcinogênese e precederem a transformação maligna ou o processo de invasão relativo ao carcinoma espinocelular, GIROD *et al.* (1998) alertam que devem ser definidos marcadores destas mudanças moleculares ou celulares associados a estágios específicos da doença.

4. Método de Impregnação pela Prata das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs)

Regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos cromossômicos constituídos por genes ribossomais. Associado a esses genes (rDNA) está um conjunto de proteínas não-histônicas que possuem

seletividade tintorial pela prata (HERNANDEZ-VERDUN e DERENZINI, 1983).

As NORs, após impregnação pela prata, são denominadas AgNORs. A técnica que utiliza a impregnação pela prata é específica para a detecção de NORs ativas, as quais são demonstradas pela ligação da prata às proteínas não-histônicas associadas estritamente a essas regiões. NORs ativas são aquelas onde DNAr potencialmente ativo é localizado. Através da microscopia óptica, as proteínas AgNOR podem ser identificadas como pontos pretos bem delimitados que em células durante a interfase estão exclusivamente localizados no interior dos nucléolos (DERENZINI e PLOTON, 1991; OLIVEIRA, LAUXEN e SANT'ANA FILHO, 1999).

WHITAKER *et al* (1993) menciona a utilização da análise quantitativa das AgNORs como um recurso para a avaliação da atividade proliferativa de neoplasias. A partir da avaliação quantitativa do número de AgNORs por núcleo (mAgNOR) e do percentual de núcleos com valores estipulados >1, >2, >3 e >4 AgNORs (pAgNORs) em 8 amostras de epitélio normal, 20 de displasias e 51 de carcinomas de células escamosas da cavidade bucal, XIE *et al.* (1997) constataram que no epitélio normal 70% dos núcleos apresentaram apenas 1 ou 2 AgNORs enquanto nos casos de carcinomas de células escamosas mais de 60% dos núcleos apresentaram um quantidade superior a 4 AgNORs. Em displasias, a frequência de distribuição das AgNORs variou entre os valores obtidos em relação ao epitélio normal e carcinomas de células escamosas. Segundo XIE *et al.*

(1997), a quantificação de AgNORs, especificamente de pAgNOR > 1 , parece ser um recurso útil na diferenciação entre epitélio normal, displasia e carcinoma de células escamosas da cavidade bucal.

Buscando verificar a possibilidade de correlação entre proliferação epitelial e progressão de doença em mucosa bucal, MACCLUSKEY *et al.* (1999) avaliaram o índice de proliferação epitelial (PI) através do marcador Ki-67 em 12 amostras de mucosa bucal normal, 17 de displasia e 18 de carcinoma de células escamosas. A partir da comparação entre os três grupos de lesões, MACCLUSKEY *et al.* (1999) verificaram aumento significativo ($p < 0,001$) do índice de proliferação epitelial com o aumento da severidade da lesão, sendo o aumento de PI tanto nos casos de displasias como de carcinomas significativamente maior ($p < 0,001$) em comparação à mucosa bucal normal.

Com o objetivo de correlacionar as diferenças da mucosa bucal normal entre fumantes e não-fumantes, SAMPAIO *et al.* (1999) realizaram uma análise quantitativa de AgNORs em esfregaços de mucosa jugal obtidos através da citopatologia. A partir da quantificação de AgNORs por núcleo, observaram que a frequência de núcleo com mais de 5 AgNORs foi superior no grupo fumante. Sendo este dado um indicativo de que existe um aumento da atividade proliferativa nas células da mucosa bucal clinicamente normal de fumantes. Tais autores mencionam a importância de estudos adicionais para a avaliação destes achados no desenvolvimento do câncer bucal.

Buscando validar a utilização da contagem de AgNORs como um marcador de atividade proliferativa, COSTA *et al.* (1999) utilizaram a técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR e Ki-67/AgNOR para avaliar a relação entre o número de AgNORs e a expressão imunohistoquímica desses marcadores de proliferação celular em carcinomas espinocelulares. A análise estatística revelou diferença significativa dos números médios de NORs/núcleo entre células PCNA positivas e negativas e entre células Ki-67 positivas e negativas. Segundo COSTA *et al.* (1999), os resultados obtidos indicam que a análise quantitativa da média do número de AgNORs por núcleo representa um método útil e acessível para a mensuração do grau de proliferação celular em lesões de carcinoma espinocelular.

DERENZINI (2000) relata que a avaliação de lesões tumorais a partir de marcadores como o PCNA, MIB1/Ki67 e bromodioxiuridina apenas viabilizam a mensuração da porcentagem de células em proliferação (*growth fraction*). Sendo, a avaliação quantitativa em relação à distribuição das AgNORs, o único recurso para a obtenção de dados relativos ao grau de rapidez de proliferação celular (*proliferation rate*).

Buscando avaliar quantitativamente as AgNORs durante as diferentes fases do ciclo celular mediante recursos de eletroforese e observação da distribuição das AgNORs em membranas de nitrocelulose, SIRRI, ROUSSEL e HERNANDEZ-VERDUN (2000) constataram que a quantidade de AgNORs é baixa na fase G-1 e alta na fase S-G2. Dessa forma, segundo os autores, a constatação de uma alta quantidade de

AgNORs indica que a maioria das células estão em S-G2 e poucas em G1 caracterizando um aumento no grau de rapidez de proliferação celular.

A partir da avaliação citopatológica das alterações celulares relacionadas ao fumo, CANÇADO, YURGEL e SANT'ANA FILHO (2001) constataram que diferenças significativas em relação à média de AgNORs/núcleo e a porcentagem média de núcleos como mais de 3 AgNORs ($p=0,0001$) entre indivíduos fumantes e não-fumantes, tanto no bordo da língua quanto no soalho de boca. Sendo os valores encontrados no grupo de fumantes superiores aqueles do grupo de não-fumantes. A partir da análise dos resultados, os autores sugerem que há correlação entre o aumento da proliferação celular na mucosa bucal e o hábito de fumar.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

A citopatologia é um método de diagnóstico baseado em células obtidas por esfregaço da mucosa. Tal exame permite a observação de alterações celulares prévias à lesão bucal clinicamente visível. Considerando tais aspectos e o de que a utilização de técnicas quantitativas representam um recurso para a obtenção de maior sensibilidade de diagnóstico em citopatologia, o presente estudo tem por objetivo quantificar o número de AgNORs por núcleo e mensurar as áreas nuclear e citoplasmática de células observadas em esfregaços de mucosa bucal clinicamente normal de fumantes e não-fumantes nos sítios bucais referentes ao lábio, soalho e língua. A comparação entre os resultados obtidos nos diferentes grupos visa constatar quantitativamente as alterações celulares prévias à presença de lesão bucal aparente resultantes dos efeitos do fumo.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante a Campanha de Combate ao Câncer Bucal de Novo Hamburgo realizada em setembro de 2000, foram selecionados todos os indivíduos do sexo masculino e com ausência de lesão bucal clinicamente visível que durante a anamnese informaram apresentar as seguintes características: (1) hábito de fumar acima de 20 cigarros/dia durante no mínimo 10 anos ou nunca ter fumado; (2) ausência de doenças sistêmicas; (3) sem história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas. Somente permaneceram neste estudo os pacientes que após receberem esclarecimentos sobre a metodologia e objetivos desta pesquisa (anexo II) concordaram em assinar o termo de consentimento (anexo III).

O processo de seleção resultou em um total de 22 pacientes que foram divididos em dois grupos: fumantes e não-fumantes. Os grupos formados constituíram-se respectivamente por 13 fumantes e 9 não-fumantes.

Foram considerados fumantes aqueles que fumavam mais de 20 cigarros/dia (BROWN e YOUNG, 1970; OGDEN, COWPE e GREEN, 1990). Sendo considerados não-fumantes os indivíduos que nunca fumaram. Portanto, não foram incluídos neste estudo ex-fumantes.

A obtenção do material para estudo foi realizada através da citopatologia.

Mediante a utilização de uma espátula de madeira foram obtidos esfregaços dos seguintes sítios bucais: vermelhão do lábio inferior, terço médio da borda da língua do lado esquerdo e porção anterior do assoalho bucal. O material coletado foi distendido sobre uma lâmina de vidro para microscopia previamente identificada e acondicionado em frasco tipo Borel contendo etanol a 95% como fixador.

Foram realizados dois esfregaços em cada sítio, referente a cada paciente. Tal metodologia resultou na obtenção de 66 esfregaços, sendo 39 de fumantes e 27 de não-fumantes.

As lâminas referentes ao primeiro esfregaço foram submetidas à técnica de impregnação pela prata adaptada por PLOTON *et al* (1986) (anexo IV) e as relativas ao segundo coradas pelo Método de Papanicolaou modificado (anexo V).

A análise morfológica das células presentes nos esfregaços corados pelo método de Papanicolaou modificado foi realizada em um microscópio óptico marca Zeiss modelo Standard 20, com aumento inicial de 100x, por um observador (Figuras 1 e 2). Nos casos em que houve a necessidade de distinção entre uma possível alteração celular e a presença de defeitos em relação à sobreposição dos constituintes celulares, procedeu-se à observação microscópica em aumento de 400x (Figuras 3 e 4). A lâmina foi lida em toda a sua extensão, no sentido horizontal, da esquerda para a direita conforme o esquema a seguir.

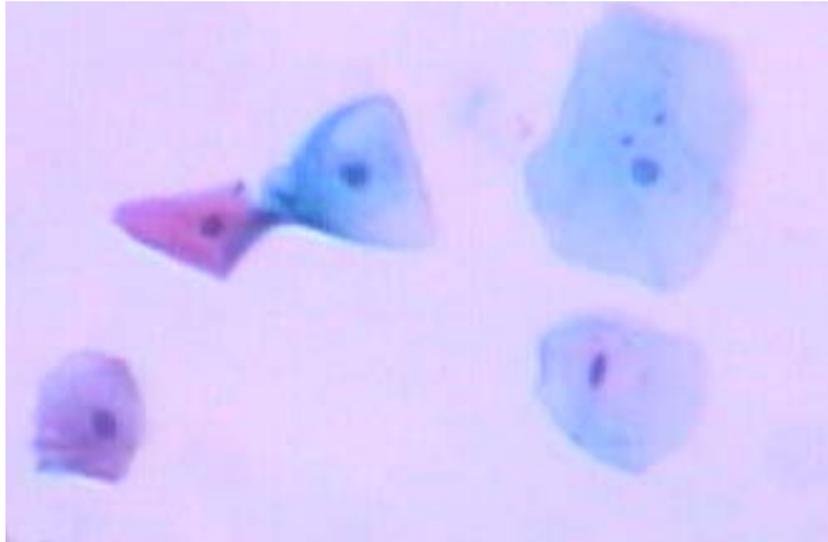


Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando células epiteliais superficiais nucleadas (Classe I). Coloração de Papanicolaou Modificado. (100x)



Figura 2. Fotomicrografia de esfregaço de língua mostrando células epiteliais superficiais nucleadas com presença de infiltrado inflamatório (Classe II). Coloração de Papanicolaou Modificado. (100x)

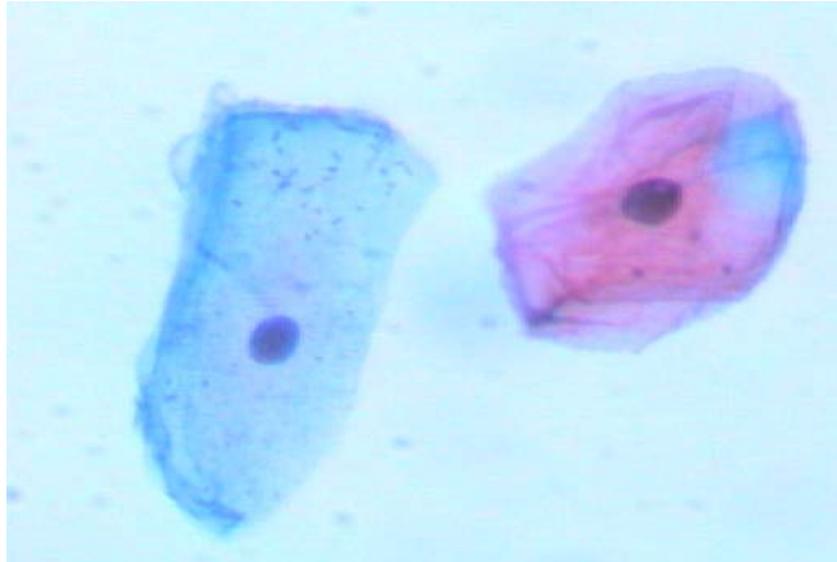


Figura 3. Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando células epiteliais superficiais nucleadas (Classe I). Coloração de Papanicolaou Modificado. (400x)

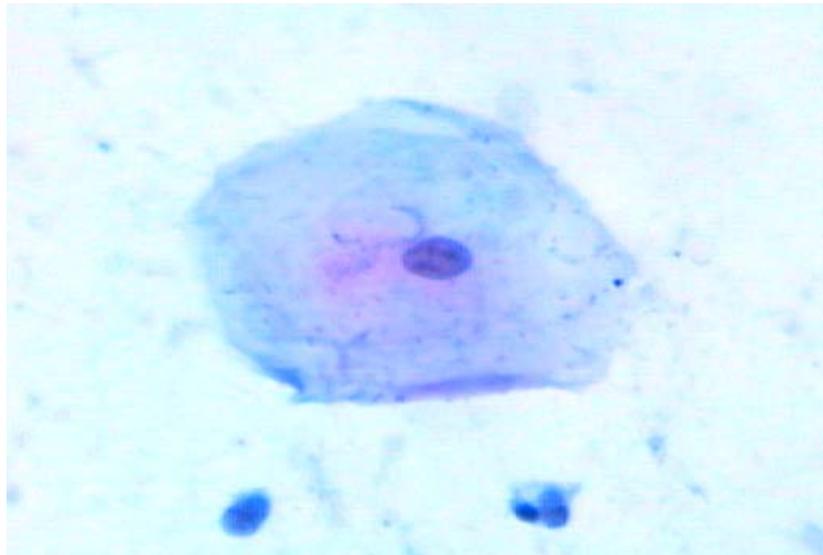
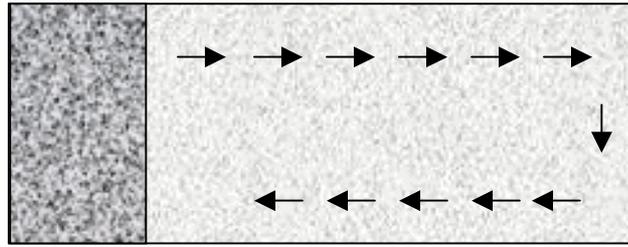


Figura 4. Fotomicrografia de esfregaço de lábio mostrando célula epitelial superficial nucleada com presença de células inflamatórias (Classe II). Coloração de Papanicolaou Modificado. (400x)



Esquema ilustrativo da leitura de lâminas.

Os esfregaços foram classificados segundo os critérios estabelecidos por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943) apresentados no anexo VII. A técnica de Papanicolaou foi adotada neste estudo com a finalidade de confirmar o grau de normalidade dos esfregaços obtidos da mucosa bucal com ausência de lesão clinicamente visível.

A observação das células presentes nos esfregaços submetidos à impregnação pela prata foi realizada em um microscópio marca Zeiss modelo Standard 20 em aumento de 400x, por um observador (Figura 5). Os esfregaços foram avaliados em toda a sua extensão, no sentido horizontal, da esquerda para a direita. As avaliações quantitativas foram realizadas em todas as células nucleadas distendidas e não sobrepostas presentes na total extensão de cada esfregaço. Células anucleadas não foram incluídas neste estudo. A metodologia de captura das imagens para avaliação quantitativa consistiu na identificação microscópica inicial em aumento aproximado de 400x de uma célula nucleada distendida e não-sobreposta e transmissão desta imagem via vídeo-câmera para um monitor de vídeo TCÊ 17". A vídeo-câmera utilizada no presente estudo foi da marca JVC modelo TK-C620 com as seguintes especificações: tipo (vídeo câmera colorida), sistema de sinal (NTSC standard), tamanho da imagem (1/3 polegadas), resolução (470TV linhas-horizontais), número de pixels 380,000 (771(H) x 492(V)), sensor de imagem (CCD). As especificações referentes à imagem digitalizada

obtida constituem: alta qualidade de vídeo, padrão RGB (16,7 milhões de cores), tamanho 160 x 120 pixels, formato (bmp). A partir desta imagem digitalizada (Figura 6), procedeu-se à contagem do número de AgNORs e mensuração das áreas celular total e nuclear por intermédio da utilização do sistema de processamento e análise de imagem IMAGELAB[®]. Obteve-se o valor correspondente à área citoplasmática, a partir da subtração de valores entre as áreas total e nuclear.

Os critérios utilizados para a contagem das AgNORs foram os estabelecidos por CROCKER *et al.* (1989). Sendo estes, a contagem de todas as estruturas esféricas impregnadas pela prata presentes dentro de núcleos de contorno bem definido. E, no caso da existência de agregados (pontos pretos unidos ou sobrepostos), estes devem ser contados como apenas uma estrutura. A concordância referente à determinação quantitativa das AgNORs por núcleo foi testada inter e intra-examinadores através do *Kappa*.

Os valores relativos à contagem do número de AgNORs por núcleo e à mensuração das áreas nuclear e citoplasmática das células observadas em esfregaços de pacientes fumantes e não-fumantes foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney ($p=0,05$) para verificação da presença de diferença estatisticamente significativa em relação a estas variáveis nos grupos estudados. A relação N/C correspondeu à razão entre o valores das áreas nuclear e citoplasmática. Os resultados obtidos a partir das observações morfológicas e quantitativas dos esfregaços serão apresentados a seguir sob a forma de gráficos e tabelas.



Figura 5. Fotomicrografia de célula atípica impregnada pela prata observada em esfregaço de soalho bucal de paciente fumante. Verifica-se a presença de 3AgNORs no interior da área nuclear e alteração da relação núcleo/citoplasma. Técnica de impregnação pela prata. (400x)

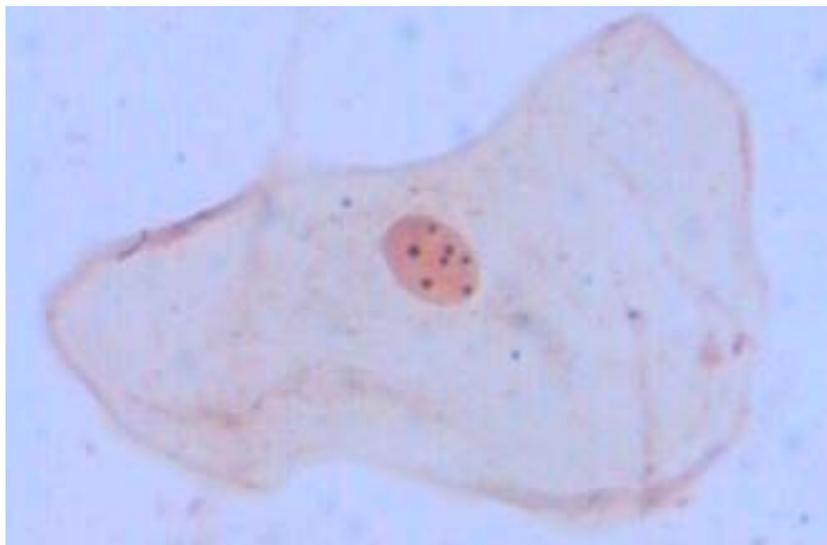


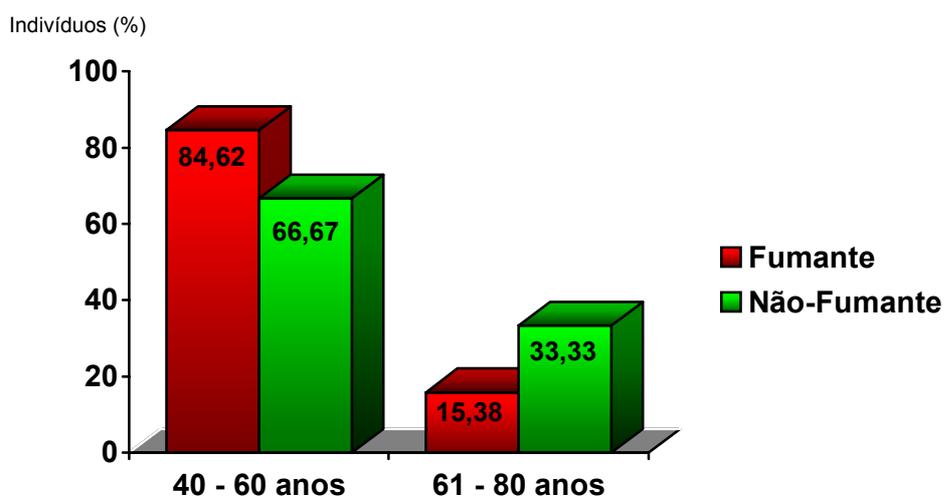
Figura 6. Fotomicrografia de célula superficial nucleada impregnada pela prata observada em esfregaço de soalho bucal de paciente fumante. Verifica-se a presença de 7AgNORs no interior da estrutura nuclear. Técnica de impregnação pela prata. (400x)

RESULTADOS

RESULTADOS

A amostra foi composta por indivíduos acima de 40 anos de idade. No grupo fumante 84,62% dos indivíduos tinham entre 40 e 60 anos e 15,38% entre 61 a 80 anos. Em relação ao grupo não-fumante, 66,67% dos indivíduos tinham entre 40 a 60 anos e 33,33% entre 61 a 80 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição da amostra segundo a faixa etária.



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Mediante a análise qualitativa das lâminas coradas pelo método de Papanicolaou Modificado em fumantes, foram obtidos os seguintes resultados:

- do total de 13 esfregaços realizados em lábio, 6 (46,15%) foram classificados como classe I e 7 (53,85%) como classe II de Papanicolaou.

- dentre os 13 esfregaços correspondentes ao soalho bucal, 1 (7,69%) foi classificado como classe I, 11 (84,62%) como classe II e 1 (7,69%) como classe III.

- do total de 13 esfregaços realizados na borda da língua, 2 (15,38%) foram classificados como classe I e 11 (84,62%) como classe II.

Considerando o grupo não-fumante , os seguintes resultados foram obtidos:

- dentre os 9 esfregaços realizados em lábio, 2 (22,22%) foram classificados como classe I e 7 (77,78%) como classe II.

- no soalho bucal e borda de língua, o total de 9 (100%) esfregaços correspondentes a cada sítio foram classificados como classe II de Papanicolaou. (Tabela 1)

Tabela 1. Distribuição e freqüência dos esfregaços classificados e corados pelo Método de Papanicolaou Modificado nos grupos de fumantes e não-fumantes de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2001.

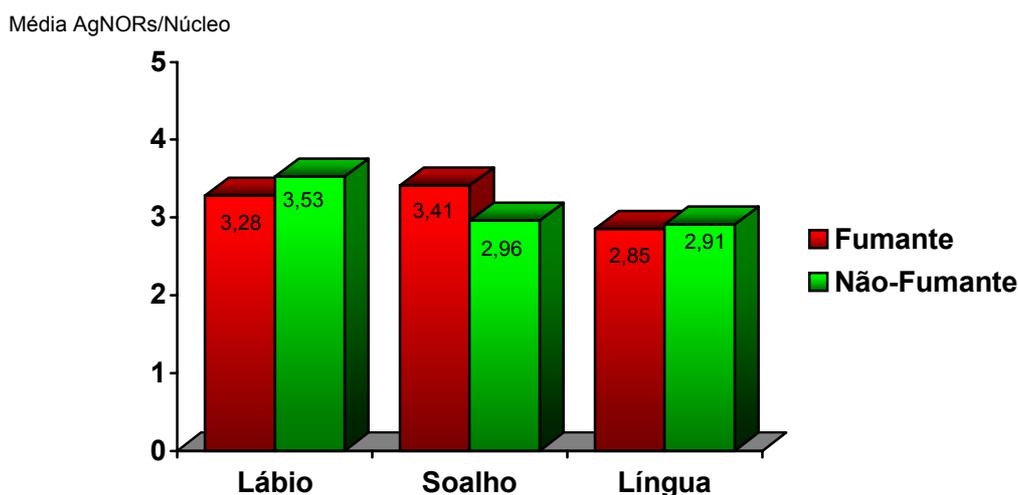
	Fumantes						Não-Fumantes					
	Lábio		Soalho		Língua		Lábio		Soalho		Língua	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Classe I	6	46,15	1	7,69	2	15,38	2	22,22	0	0	0	0
Classe II	7	53,85	11	84,62	11	84,62	7	77,78	9	100	9	100
Classe III	0	0	1	7,69	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Mediante a análise quantitativa referente aos esfregaços estudados, foram obtidos os resultados abordados a seguir.

Em relação ao número de AgNORs por núcleo em esfregaços de mucosa bucal clinicamente normal de pacientes fumantes e não-fumantes, foram verificadas diferenças significativas ($p=0,045$) entre esses grupos no sítio soalho de boca. O grupo fumante possui quantidade superior de AgNORs por núcleo em comparação ao não-fumante. Nos demais sítios bucais estudados, não foram observadas diferenças significativas relativas a esta variável nos diferentes grupos (Gráfico 2).

Gráfico 2. Comparação entre a média do número de AgNORs por núcleo em relação ao grupo fumante e não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Considerando a relação núcleo/citoplasma (N/C), os valores médios de N/C podem ser igualmente representados pela referência correspondente à proporção do núcleo em relação ao citoplasma (N:C) (Tabela 2).

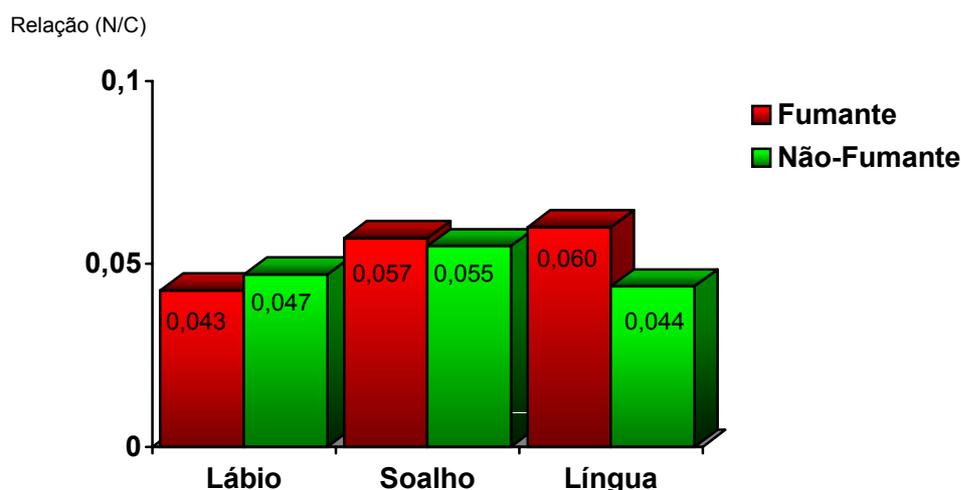
Tabela 2. Comparação dos valores médios da relação núcleo/citoplasma (N/C) e a sua respectiva referência aproximada relativa à proporção entre a área nuclear e a citoplasmática das células obtidas de esfregaços nos diferentes sítios bucais de pacientes fumantes e não-fumantes. Porto Alegre. 2001.

	Fumantes		Não-Fumantes	
	N/C	N:C	N/C	N:C
Lábio	0,043	1:23	0,047	1:21
Soalho	0,057	1:17	0,055	1:18
Língua	0,060	1:17	0,044	1:23

Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Em língua, foi verificada variação significativa ($p=0,016$) da relação núcleo/citoplasma (N/C) entre fumantes e não-fumantes. O grupo fumante apresenta maior valor correspondente à N/C em comparação ao grupo não-fumante. Em lábio e soalho bucal, não foram verificadas diferenças significativas em relação a esta variável entre os diferentes grupos estudados (Gráfico 3).

Gráfico 3. Comparação da relação núcleo/citoplasma (N/C) entre o grupo fumante e não-fumante nos diferentes sítios bucais estudados.

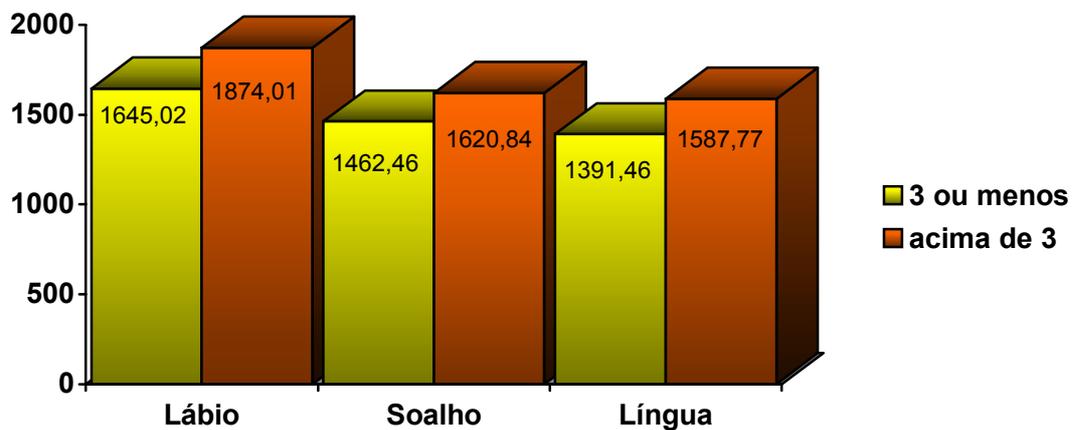


Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

No lábio, foi constatada diferença significativa ($p=0,033$) entre a área de núcleos com mais de 3 AgNORs e de núcleos com 3 ou menos AgNORs. O grupo com mais de 3 AgNORs/núcleo apresentou maior área nuclear (Gráfico 4).

Gráfico 4. Relação entre o número de AgNORs por núcleo e o respectivo tamanho de área nuclear (pixels).

Área Nuclear (px)



Fonte: Pacientes atendidos durante a Campanha de Combate ao Câncer de Novo Hamburgo/RS. 2000.

Considerando a relação núcleo/citoplasma, não foram verificadas diferenças significativas entre o grupo de células com mais de 3 AgNORs/núcleo e o grupo com 3 ou menos AgNORs/núcleo em nenhum dos três sítios bucais estudados.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A amostra selecionada neste estudo constituída por homens acima de 40 anos, teve por finalidade representar o grupo de maior prevalência em relação ao câncer bucal, considerando os dados epidemiológicos citados na literatura (CONLEY e SADOYAMA, 1973; BOYLE e MacFARLANE,1990; PINHOLT, RINDOM e PINDBORG,1997; INCA 2001).

A citopatologia foi a técnica de eleição para a obtenção das amostras deste estudo, devido à simplicidade e rapidez na coleta de células da mucosa bucal. Sendo a possibilidade da coleta de células alteradas através deste método fundamentada no processo de maturação celular do epitélio conforme CAHN (1965) e FOLSOM *et al.* (1972).

A busca de alterações quantitativas prévias à lesão bucal aparente em esfregaços de pacientes fumantes é justificada pela ação carcinogênica e genotóxica do tabaco (INKZE *et al.*, 1982; HOFFMANN E WYNDER, 1986).

A constatação de SPEIGHT e MORGAN (1993), de que diversas etapas relacionadas a alterações de comportamento e morfologia celular antecedem a ocorrência do câncer bucal, justifica a hipótese deste estudo sobre a avaliação da mucosa bucal sem lesão aparente com a finalidade de surpreender alterações celulares antes da ocorrência de manifestação clínica.

Em nosso estudo foram avaliados esfregaços de soalho bucal, vermelhão do lábio inferior e borda da língua, pelo fato de estes três sítios conforme JORDAN E DALEY (1997) corresponderem às regiões anatômicas bucais de maior prevalência de câncer.

A confiabilidade do resultado em citopatologia através da utilização de técnicas qualitativas – classificação de Papanicolaou - para avaliação do grau de normalidade de esfregaços bucais, é questionada por Walker (1962) e Sandler (1964) porque dependem do treinamento do examinador em avaliar a morfologia celular e diagnosticar as alterações celulares compatíveis com malignidade.

Outro fator que diminuiu a confiabilidade da citopatologia em mucosa bucal, foi a sua utilização como um método de diagnóstico em substituição à biópsia e exame histopatológico (SANDLER *et al.*, 1960; SANDLER, 1964; BERNSTEIN E MILLER, 1978). Esta forma de emprego da citopatologia gerou resultados com altos índices de falsos negativos ou positivos (SANDLER *et al.*, 1960, SANDLER, 1964). SANDLER *et al.* (1960) afirmam que a biópsia e exame histopatológico são os procedimentos de rotina para o diagnóstico de lesões bucais.

Concordamos com SANDLER *et al.* (1960) e BERNSTEIN E MILLER (1978) quando afirmam que a citopatologia é um método auxiliar no controle de alterações celulares prévias ao aparecimento clínico da lesão. Tal opinião é sustentada através dos resultados obtidos em nosso estudo que comprovam variação significativa da relação núcleo/citoplasma ($p=0,016$) e número de AgNORs ($p=0,045$) entre fumantes e não-fumantes.

Tais resultados concordam com os achados de SILVA e RADOS (1997) e SOARES PINTO e RADOS (2001) sobre a utilização da citopatologia para verificação da ocorrência de alterações celulares prévias à lesão bucal clinicamente visível.

A utilização de técnicas quantitativas para a determinação do tamanho nuclear, segundo COWPE e LONGEMORE (1981), parecem minimizar a subjetividade dos resultados referentes às alterações celulares relacionadas à ocorrência de câncer bucal. Em nosso estudo foi possível constatar a validade desta opinião. A mensuração da área celular e nuclear possibilitou a verificação de alterações da relação núcleo/citoplasma em células epiteliais da mucosa da língua de pacientes fumantes com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,016$) em relação aos não-fumantes. O exame qualitativo pela técnica de Papanicolaou mostrou grau de normalidade tanto em esfregaços de fumantes quanto de não-fumantes. Apesar disto, são necessários mais estudos levando em consideração a especificidade de cada sítio anatômico bucal.

Nossos resultados complementam os dados existentes na literatura sobre as alterações celulares relacionadas aos efeitos carcinogênicos do tabaco sobre as células epiteliais da mucosa bucal (INKZE *et al.*, 1982; HOFFMANN E WYNDER, 1986). Novamente aqui é necessário enfatizar que em nosso estudo encontramos mudanças nos diferentes sítios anatômicos estudados, porém estas diferenças se fizeram significativas sob as diferentes formas de avaliação. As células epiteliais da borda da língua mostraram diferenças significativas ($p=0,016$) para a relação

núcleo/citoplasma entre fumantes e não-fumantes. Comparando ainda estes dois grupos, as células da mucosa do soalho de boca mostraram alterações significativa ($p=0,045$) do padrão de proliferação celular mediante a quantificação das AgNORs/núcleo. E nas células epiteliais da mucosa do lábio inferior foi observada correlação significativa ($p=0,033$) entre o aumento da área do núcleo e o aumento do número de AgNORs/núcleo.

Em 1964, GOLDSBY, NEWTON e STAATS já citavam a mensuração do tamanho celular e nuclear e a determinação da relação núcleo/citoplasma como os principais fatores a serem considerados na determinação da normalidade de esfregaços bucais. A limitação técnica existente em décadas passadas em relação à mensuração celular, foi superada através da elaboração de um sistema computadorizado de análise e processamento de imagens. Utilizando este sistema na mensuração nuclear e determinação da relação núcleo/citoplasma (N/C) em células de esfregaços de mucosa bucal normal de fumantes e não-fumantes em lábio, soalho bucal e língua; verificamos aumento significativo ($p=0,016$) da relação N/C nas células de esfregaços de borda de língua de pacientes fumantes. Tal resultado demonstra um comportamento específico da língua frente às injúrias ocasionadas pelo fumo em comparação aos demais sítios bucais.

ODGEN, COWPE e GREEN (1990) avaliando quantitativamente células de esfregaços da mucosa jugal normal de fumantes e não-fumantes, observaram aumento significativo da área nuclear no grupo fumante e ausência de variação significativa entre os grupos em relação à área

citoplasmática. Em relação à variação da área nuclear e citoplasmática das células de esfregaços de mucosa bucal normal de lábio, soalho bucal e borda de língua de fumantes e não-fumantes, em nosso estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para estas variáveis entre os grupos estudados em nenhum dos sítios anatômicos avaliados. As diferenças dos resultados entre os dois estudos pode ser explicada pela especificidade da resposta celular às agressões provocadas pelos agentes químicos do fumo nos diferentes sítios bucais. A avaliação estatística empregada em nosso trabalho mostrou uma tendência de aumento da área nuclear, sendo possível que uma maior amostra apresentasse diferenças estatisticamente significativas.

A partir da constatação de que em indivíduos fumantes ocorre um aumento do número de células superficiais nucleadas em lábio e borda de língua, aumento do número de células superficiais anucleadas em soalho bucal e aumento do número de células intermediárias em lábio, soalho e língua; SILVA e RADOS (1997) mencionam a exposição ao fumo como um fator capaz de modificar significativamente o processo de maturação celular normal do epitélio. O aumento da velocidade de maturação celular ou menor adesividade das células epiteliais decorrente da ação do cigarro foi sugerida por SILVA e RADOS (1997), devido à constatação do aumento do número de células intermediárias em esfregaços de fumantes nos três sítios anatômicos estudados. Nosso estudo comprovou o aumento do ritmo proliferativo da mucosa bucal em fumantes, através do aumento significativo

($p=0,045$) do número de AgNORs/núcleo observado em células do epitélio do soalho bucal.

A avaliação da proliferação celular através da quantificação das regiões organizadoras nucleolares impregnadas pela prata (AgNORs) está sedimentada na literatura (WHITAKER, 1993; COSTA, ARAÚJO e PINTO, 1999). O aumento da atividade proliferativa e o distúrbio no processo de maturação epitelial seriam indicadores iniciais das alterações malignas (GIROD *et al.*, 1998). DERENZINI (2000) relata que, dentre os marcadores de proliferação celular como o MIB1/Ki67 e PCNA, a avaliação quantitativa da distribuição das AgNORs é o único recurso para a obtenção de dados relativos ao grau de rapidez de proliferação celular (*proliferation rate*). Em nosso estudo, foram constatadas alterações relativas ao grau de proliferação celular a partir da quantificação de AgNORs/ núcleo.

Buscando verificar através do método de impregnação pela prata as diferenças relativas ao grau de proliferação celular presentes em esfregaços de mucosa bucal normal de fumantes e não-fumantes realizados em lábio, soalho bucal e língua, constatamos diferenças significativas ($p=0,045$) em relação ao número de AgNORs/núcleo entre o grupo fumante e não-fumante nas células epiteliais da mucosa do soalho de boca. Neste sítio, o grupo fumante apresentou quantidade superior de AgNORs por núcleo em comparação ao grupo não-fumante. Tal achado juntamente com a correlação entre o aumento da proliferação celular na mucosa bucal e o hábito de fumar mencionados por CANÇADO, YURGEL e SANT'ANA FILHO (2001), confirmam as afirmações citadas por Sampaio *et al* (1999) sobre a

existência de um aumento da atividade proliferativa nas células da mucosa bucal normal de fumantes.

Em esfregaços de lábio constatamos que a área nuclear é significativamente maior ($p=0,033$) em células com mais de 3AgNORs/núcleo em comparação às células com 3 ou menos AgNORs/núcleo, indicando uma correlação positiva entre tamanho nuclear e número de AgNORs/núcleo. Os resultados obtidos em borda de língua e vermelhão do lábio inferior também mostram relação direta entre aumento da área nuclear e do número de AgNORs/núcleo, porém sem comprovação estatística.

Embora a técnica de Papanicolaou tenha sido incluída neste estudo para avaliação qualitativa da normalidade dos esfregaços, foi através de um esfregaço submetido ao método de impregnação pela prata que observamos a presença de células atípicas (Figura 5). Tal achado sugere a possibilidade da realização de análise qualitativa e quantitativa de área nuclear e número de AgNORs no mesmo esfregaço citopatológico. Porém são necessários estudos que comprovem a confiabilidade da verificação qualitativa da morfologia celular em esfregaços submetidos à impregnação pela prata.

O emprego da citopatologia em mucosa bucal sem lesão clinicamente visível realizado neste estudo, reafirma os achados de SOARES PINTO, PHILIPPI e RADOS (2000) como um método auxiliar de diagnóstico eficaz na prevenção do câncer bucal. A sua utilização à

semelhança dos exames preventivos de câncer de colo de útero necessita de mais estudos.

A ocorrência de diferenças significativas de relação núcleo/citoplasma em língua e do número de AgNORs por núcleo em soalho de boca comparando-se fumantes e não-fumantes, confirma a especificidade da resposta celular de cada sítio. Embora as alterações em soalho bucal estejam associadas ao número de AgNORs por núcleo e em língua à relação núcleo/citoplasma, em ambos os casos houve modificação do padrão celular normal devido aos efeitos ocasionados pelo fumo. Em relação à variação positiva entre o aumento do número de AgNORs/núcleo e o aumento da área nuclear verificada em células epiteliais da mucosa do lábio, outros estudos envolvendo um maior amostra devem ser realizados para avaliar este achado considerando especificamente grupo fumante e não-fumante.

O paciente relativo ao grupo fumante, cujo esfregaço de soalho bucal teve resultado Classe III de Papanicolaou - suspeito, atualmente encontra-se sob controle através da realização de exames clínico e citopatológico periódicos no Setor de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia deste estudo e baseados na análise dos resultados obtidos, é possível concluir que:

1. Ocorre aumento significativo ($p=0,016$) da relação núcleo/citoplasma em células epiteliais da borda da língua de indivíduos fumantes.
2. O número de AgNORs/ núcleo é maior ($p=0,045$) em células epiteliais do soalho bucal de fumantes.
3. Existe correlação ($p=0,033$) entre o aumento da área nuclear e o aumento do número de AgNORs/núcleo em células epiteliais do vermelhão do lábio inferior.

Considerando tais aspectos, podemos concluir que as referências quantitativas de relação núcleo/citoplasma e número de AgNORs por núcleo são eficazes para o controle citopatológico de alterações celulares prévias à lesão bucal aparente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNSTEIN, M.L.; MILLER, R.L. Oral exfoliative cytology. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 96, n. 4, p. 625-629, Apr. 1978.
- BOYLE, P. et al. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review. **J. R. Soc. Med.**, London, v. 83, n. 11, p. 724-730, Nov. 1990.
- 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/estimativa2001/>>. Acesso em: 12/04/2001
- BROWN, A.M.; YOUNG, A. The effects of age and smoking on the maturation of the oral mucosa. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 14, n. 19, p. 566-569, Nov./Dec. 1970.
- CAHN, L.R. Oral exfoliative cytology. **Br. J. Oral Surg.**, Edinburgh, v. 2, p.166-170, 1964/1965.
- CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res.**, Denville, v. 56, n. 11, p.2488-2492, June 1996.
- CANÇADO, R.P.; YURGEL, L.S.; SANT'ANA FILHO, M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 446-454, July 2001.
- CHOI, S.Y.; KAHYO, H. Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. **Int. J. Epidemiol.**, London, v. 20, n. 4, p. 878-885, Dec. 1991.
- CONLEY, J.; SADOYAMA, J.A. Squamous cell cancer of the buccal mucosa. A review of 90 cases. **Arch. Otolaryngol.**, Chicago, v. 97, n. 4, p. 330-333, Apr. 1973.
- COSTA, A.L.L. et al. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, n. 10, p. 438-441, Nov. 1999. University Press, 1991. p. 165-187.

COWPE, J.G.; LONGMORE, R.B. Nuclear area and Feulgen DNA content of normal buccal mucosal smears. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 10, n. 2, p. 81-86, Apr. 1981.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J. Pathol.**, London, v. 158, n. 3, p. 185-188, July 1989.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 117-120, Apr. 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, New York, v. 32, p. 149-192, 1991.

FOLSOM, T.C. et al. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. **Oral Surg. Oral med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 33, n. 1, p. 61-74, Jan. 1972.

GIROD, S.C. et al. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, n. 4, p. 252-260, Aug. 1998.

GOLDSBY, J.W.; NEWTON, G.L.; STAATS, O.J. Nuclear and cellular size variations in clinically normal exfoliated buccal mucosal cells. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 8, n. 1, p. 80-84, Jan./Feb. 1964.

HERNANDEZ-VERDUN, D. (Ed.). The nucleolar organizer regions. **Biol. Cell.**, Paris, v. 49, n. 3, p. 191-202, 1983.

HOFFMANN, D.; WYNDER, E.L. Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, n. 74, p. 145-165, 1986.

INCZE, J. et al. Premalignant changes in normal appearing epithelium in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. **Am. J. Surg.**, New York, v. 144, n. 4, p. 401-405, Oct. 1982.

JORDAN, R.C.K.; DALEY, T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 63, n. 7, p. 517-525, July/Aug. 1997.

LEWIN, F. et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. **Cancer**, New York, v. 82, n. 7, p. 1367-1375, Apr. 1998.

LÖFROTH, G. Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 222, n. 2, p. 73-80, Feb. 1989.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 79, n. 3, p. 321-329, Mar. 1995.

MACCLUSKEY, M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 409-414, July 1999.

MONTGOMERY, P.W. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. **J. Dent. Res.**, St. Louis, v. 30, n. 1, p. 12-18, Feb. 1951.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 53-55, Feb. 1990.

OLIVEIRA, M.G. de; LAUXEN, I. da S.; SANT'ANA FILHO, M. O que são Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) e qual a utilidade da técnica de AgNOR. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 14, n. 28, p. 129-139, Dez 1999.

PAPANICOLAOU, G.N. Some improved methods for staining vaginal smears. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 26, n. 8, p. 1200-1205, May 1941.

PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H.F. **Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear**. New York: Commonwealth Fund., 1943. 46 p.

PINHOLT, E.M.; RINDUM, J.; PINDBORG, J.J. Oral cancer: a retrospective study of 100 Danish cases. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 35, n. 2, p. 77-80, Apr. 1997.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 5-14, Jan. 1986.

SAMPAIO, H.C. et al. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 43, n. 2, p. 117-120, Mar./Apr. 1999.

SANDLER, H.C. Reliability of oral exfoliative cytology for detection of oral cancer. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 68, n. 4, p. 489-499, Apr. 1964.

SANDLER, H.C. et al. Exfoliative cytology for detection of early mouth cancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 13, n. 8, p. 994-1009, Aug. 1960.

SCULLY, C. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. **Br. Dent. J.**, London, v. 173, n. 2, p. 53-59, July 1992.

SILVA, M. da C.A.; RADOS, P.V. Citopatologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 38, n. 2, p. 3-10, dez. 1997.

SILVERMAN, S.; BECKS, H.; FARBER, S.M. The diagnostic value of intraoral cytology. **J. Dental Res.**, St. Louis, v. 37, n. 2, p. 195-205, Apr. 1958.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 121-126, Apr. 2000.

SOARES PINTO, T.A.; PHILIPPI, C.K.; RADOS, P.V. Avaliação citopatológica das alterações celulares prévias à lesão bucal visível. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 14, p. 85, 2000. Suplemento.

SPEIGHT, P.M.; MORGAN, P.R. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. **Community Dent. Health**, Houndsmills, v. 10, p. 31-41, June 1993. Supplement 1.

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**, New York, v. 79, n. 11, p. 2200-2208, June 1997.

WALKER, R.O. The oral mucosa as an index of health with special reference to cytology. **Br. J. Clin. Pract.**, London, v. 16, p. 699-704, Nov. 1962.

WHITAKER, S.B. et al. Giant cell lesions of the jaws: evaluation of nucleolar organizer regions in lesions of varying behavior. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, n. 9, p. 402-405, Oct. 1993.

ANEXOS

ANEXO I

Aprovação do Projeto na Comissão Científica e Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS

O presente projeto intitulado ***Quantificação do Número de AgNORs em Células Descamadas da Mucosa Bucal e sua Relação com o Tamanho do Núcleo em Indivíduos Fumantes***, elaborado sob a orientação do Prof.Dr. Pantelis Varvaki Rados como parte dos requisitos obrigatórios do curso de Mestrado em Patologia Bucal, foi apresentado e aprovado junto à disciplina de Seminário de Dissertação em 13 de dezembro de 1999.

Os critérios relativos à ética em saúde considerando a metodologia de coleta das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº 196/96 CNS).

ANEXO II

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

CONSENTIMENTO INFORMADO

A boca está revestida por tecidos que em alguns casos podem apresentar alterações não visíveis ao olho humano. Isso acontece porque as doenças iniciam nas células que compõem estes tecidos, as quais só podem ser vistas através de um aparelho chamado microscópio. A importância de analisarmos as células – seu tamanho, sua forma e seus componentes – nos casos em que não suspeitamos de doença, é para podermos conhecer como as células saudáveis se comportam. A partir disso, poderemos detectar quando as células não estão normais e assim seremos capazes de diagnosticar doenças, como por exemplo, o câncer bucal em seu estágio inicial.

Para podermos conhecer essas células precisamos de amostras de tecidos da boca. Essas amostras são coletadas através de raspagem com espátula de madeira. Tal procedimento de coleta é absolutamente indolor e não traz nenhum dano ao paciente.

Com base nestas informações solicitamos sua colaboração em participar deste estudo ***Quantificação do Número de AgNORs em Células Descamadas da Mucosa Bucal e sua Relação com o Tamanho do Núcleo em Indivíduos Fumantes***, uma vez que o Sr.(a) corresponde aos critérios estabelecidos para a avaliação das células que descamam da mucosa bucal.

Como esta pesquisa busca estudar a existência de mudanças no padrão de descamação celular da mucosa da boca, todos os pacientes que mostrarem variação celular diferente do padrão normal serão chamados e submetidos a novas avaliações clínicas e/ou laboratoriais.

Atenciosamente,

C.D. Tatiana Andrea Soares Pinto (Tel. 3316-5023)
Prof.Dr. Pantelis Varvaki Rados (Tel. 3316-5011)

ANEXO III

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

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,
idade ___ anos, sexo _____, residente na cidade de
_____, endereço _____
_____,
telefone () _____, declaro ter sido informado e aceito em
participar como paciente do trabalho de pesquisa científica sobre
**Quantificação do Número de AgNORs em Células Descamadas da
Mucosa Bucal e sua Relação com o Tamanho do Núcleo em Indivíduos
Fumantes** a realizar-se na Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação do Prof.Dr. Pantelis Varvaki
Rados.

Porto Alegre, _____ de _____ 200__.

CPF/ CIC do paciente

Assinatura do paciente

ANEXO IV

Modelo de Ficha para Cadastramento dos Pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE ODONTOLOGIA

REQUISIÇÃO PARA EXAME CITOPATOLÓGICO

Dados do Paciente

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Sexo: M F Raça: B N

Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Telefone: () _____

Doenças Sistêmicas: Diabetes Anemia Cardiovascular Hipertensão _____

Medicamentos: _____

Hábitos:

•Café N S, quantidade de xícaras por dia _____

•Chimarrão N S, quantidade de cuias por dia _____

•Cigarro N S, quantidade de cigarros por dia _____

•Álcool N S, tipo _____ quantidade de doses por dia _____

CADASTRO DOS LAUDOS CITOPATOLÓGICOS

Nº do registro _____

Sítio Anatômico: _____

Laudo Citopatológico: _____

Nº do registro _____

Sítio Anatômico: _____

Laudo Citopatológico: _____

Nº do registro _____

Sítio Anatômico: _____

Laudo Citopatológico: _____

Examinado por: _____

ANEXO V

Técnica de Impregnação pela Prata das AgNORs*

A técnica citoquímica de AgNOR foi elaborada a partir da técnica descrita por PLOTON *et al.* (1986) e consiste nos seguintes passos:

- Fixação em Álcool 96%
- Desidratação com Álcool Etílico Absoluto
- Pós-fixação em uma mistura de Álcool Etílico – Ácido Acético (solução 3:1) por 5 minutos
- Lavagem em água destilada
- Impregnação pela prata – gotejar a solução coloidal sobre as lâminas colocadas em câmara úmida fechada e levar à estufa por 20 minutos à 45°C. A solução coloidal da prata deve ser preparada imediatamente na hora da utilização a partir da dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de Ácido Fórmico 1%, misturando numa proporção de 1:2 com solução aquosa de Nitrato de Prata 50%.
- Duas lavagem em água destilada aquecida à 45°C, com a finalidade de facilitar a remoção da gelatina.
- Reidratação em 3 banhos de Álcool Etílico Absoluto
- Clareamento em Xilol
- Montagem em Permont (Fischer ChemAlert®).

*Técnica adaptada por Isabel Lauxen e Márcia Oliveira para utilização em esfregaços de 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 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Fone: (051) 3316-5023. E-mail: ppgodo@ufrgs.br e marciaago@ccs.ufsm.br)

ANEXO VI

Técnica de Papanicolaou Modificada*

- a) Álcool Absoluto 15 segundos;
- b) Álcool Absoluto 15 segundos;
- c) Álcool Absoluto 15 segundos;
- d) Álcool Absoluto 15 segundos;
- e) Água Destilada 15 segundos;
- f) Hematoxilina de Harris, com 0,5g de Ácido Acético Glacial – 60 segundos;
- g) Descansar em papel absorvente;
- h) Lavar em água corrente até que esta permaneça límpida;
- i) Carbonato de Lítio^{**} 0,25% durante 15 segundos;
- j) Álcool 15 segundos;
- k) Álcool 15 segundos;
- l) Álcool 15 segundos;
- m) Álcool 15 segundos;
- n) Orange G6 durante 60 segundos, com Ácido Fosfotúngstico (0,15g/l);
- o) Descansar em papel absorvente;
- p) Álcool 15 segundos;
- q) Álcool 15 segundos;
- r) Policromo^{***} durante 3 minutos;
- s) Descansar em papel absorvente;
- t) Álcool 15 segundos;
- u) Álcool 15 segundos;
- v) Álcool 15 segundos;
- w) Descansar em papel absorvente;
- x) Xilol durante 5 minutos;
- y) Xilol durante 5 minutos;
- z) Montagem com Bálsamo do Canadá.

*Técnica preconizada por PAPANICOLAOU (1941) e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Sendo esta técnica também utilizada pelo Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

** O Carbonato de lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada. Trocar a solução no momento em que ocorrer turvamento.

*** Composição do Policromo: 200ml corante EA36 e 600ml corante EA65 (proporção 3:1)

ANEXO VII

Crêterios para Análise Morfológica dos Esfregaços Obtidos pelo Método de Papanicolaou

Os cr terios utilizados para análise da morfologia celular seguiram os mesmos citados por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943) como indicativos de malignidade. Sendo estes:

- presença de núcleos aumentados
- aumento da relação núcleo/citoplasma
- hipercromatismo nuclear
- alterações no padrão de distribuição da cromatina nuclear
- espessamento acentuado e irregular da membrana nuclear íntegra
- nucléolos múltiplos e proeminentes
- pleomorfismo nuclear
- mitoses atípicas

ANEXO VIII

Crêterios para Classifica o dos Esfregaços Obtidos pelo Método de Papanicolaou

A classifica o utilizada segue os cr terios descritos por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943), descritos abaixo:

- Classe 0 – Amostra inválida

Material insuficiente ou inadequado para análise.

- Classe I – Esfregaço normal

As células observadas apresentam padrão normal em todo o esfregaço.

- Classe II – Esfregaço normal com presença de inflama o

As células observadas apresentam padrão normal em todo o esfregaço, porém verifica-se a presença de células inflamatrias em pelo menos dois campos.

- Classe III – Esfregaço suspeito – Altera es Displ sicas

Presença de altera es celulares em pelo menos dois campos do esfregaço. Tais altera es podem ser descritas como uma discreta hipercromasia nuclear, um leve aumento do tamanho nuclear e possível ocorrência de multinuclea o celular.

- Classe IV – Esfregaço sugestivo de neoplasia maligna - Carcinoma *in situ*

Presença de alterações celulares em dois ou mais campos. Há um considerável número de células atípicas por esfregaço. O carcinoma *in situ* é caracterizado pela presença de células malignas imaturas (células das camadas basal e parabasal, redondas ou ovais, com núcleo em posição central). Podem ser observadas células com núcleos volumosos e escasso citoplasma. O núcleo é difusamente hipercromático. A cromatina é irregular ou em grânulos grosseiros. Pode ser observada multinucleação. O citoplasma pode conter vacúolos. Presença de sincícios celulares com bordas celulares indistintas e arranjo celular em fila, também podem ser vistos.

- Classe V – Esfregaço maligno – Carcinoma Invasivo

Presença de alterações celulares compatíveis com neoplasia maligna. O núcleo mostra grânulos grosseiros de cromatina, espaços vazios e acentuado pleomorfismo. Há evidente aumento da relação núcleo/citoplasma. O núcleo é hipercromático. Há presença de pleomorfismo celular e mitoses atípicas.