

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FELIPE RACHI LUDVIG

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM LEUCOPLASIAS BUCAIS

Porto Alegre

2019

FELIPE RACHI LUDVIG

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM LEUCOPLASIAS BUCAIS

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 a obtenção do título de cirurgião-dentista.

Orientador: Prof.^a Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2019

FELIPE RACHI LUDVIG

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM LEUCOPLASIAS BUCAIS

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 a obtenção do título de cirurgião-dentista.

Orientador: Prof.^a Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre, 10 de julho de 2019

Márcia Gaiger de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laura de Campos Hildebrand

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fernanda Visioli

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe Carla, minha maior incentivadora que acreditou em mim desde o início, fazendo com que nunca desistisse nos momentos mais difíceis. Dedico essa conquista a ela.

Ao meu padrasto Fernando e meu irmão Leonardo que sempre estiveram à disposição para ajudar de todas as formas nesta longa caminhada.

Ao meu pai Jorge e meu irmão Mateus, que torcem pela minha felicidade.

A minha namorada Natalí, por ser a pessoa na qual compartilho meu dia-a-dia, meus sonhos e angústias, sempre me apoiando nas minhas decisões.

Aos meus tios Carlos e Ana Cristina, meus primos Carlos Henrique e Rochele, que me acolheram por período para que eu pudesse realizar um curso preparatório para o vestibular

Aos meus colegas de faculdade, pela força, companheirismo e união de todos na luta deste sonho. A vivência com eles me fez tornar uma pessoa muito melhor.

Aos meus amigos de longa data, que me acompanham desde início na busca por esse objetivo e que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, auxiliaram nessa conquista.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Fernanda Visioli por todos os ensinamentos, pela dedicação, calma e tranquilidade na orientação do meu trabalho de conclusão, tornando a realizá-lo de forma prazerosa.

A todos professores e alunos da pós-graduação do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pela oportunidade, confiança, aprendizado e respeito no meu trabalho como bolsista do local.

A esta escola, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos professores da Faculdade de Odontologia e preceptores dos estágios pelos ensinamentos durante esse período acadêmico.

RESUMO

É importante detectar os indivíduos com maior risco de desenvolver câncer de boca para que estratégias de prevenção possam ser implementadas. A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais comum da cavidade bucal e sua transformação maligna é associada com a perda de heterozigosidade (LOH) na região 9p21. Os estudos realizados sobre LOH em leucoplasia até o momento utilizaram DNA extraído de amostras de biópsias. No entanto, seria importante a utilização da citopatologia para a obtenção de DNA, visto que esta é uma forma de coleta não invasiva e inócua, que permite várias coletas ao longo do tempo. No entanto, é preciso primeiramente, verificar se o DNA obtido pela citopatologia é comparável ao DNA obtido pelos métodos já utilizados na literatura. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a frequência de LOH de indivíduos com leucoplasia bucal, a partir da citopatologia e do tecido obtido pela biópsia. Para tanto, 22 indivíduos foram incluídos no estudo após assinatura do TCLE. De cada indivíduo foi obtida uma amostra citológica realizando o esfregaço na superfície da lesão, uma amostra de sangue periférico para obtenção de DNA controle e foi realizada a biópsia da lesão. O DNA da amostra citológica e do sangue foi extraído a partir de cartões FTA. Foram realizados cortes histológicos dos blocos de parafina, e os tecidos epitelial e conjuntivo foram microdissectados. O DNA das amostras teciduais foi extraído utilizando-se o DNAm mini Kit. Foi realizada a reação de PCR dos DNAs com o marcador de microssatélite da região 9p21 IFNA. A seguir os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese capilar e os dados analisados. A LOH foi observada em 6 amostras, confirmado pelos dois métodos. A distribuição dos eventos de LOH foi observada em amostras não displásicas (n=4) e displásicas (n=2). A maior parte de LOH detectada foi em pacientes não fumantes (n=4). A análise do microssatélite IFNA nas amostras por citopatologia revelou 45,4% de LOH, enquanto que a análise nas amostras biopsiadas revelou 27,3% de LOH. Das 22 amostras no total, observamos concordância apenas em 15 casos (68,2%). A análise pelo teste de qui-quadrado confirmou que não há associação estatística entre as análises realizadas. Portanto, os dois métodos de coleta para análise de LOH não são comparáveis.

Palavras-chave: Leucoplasia. Transformação Maligna. Perda de Heterozigosidade. Citopatologia. Biópsia.

ABSTRACT

It is important to detect individuals at higher risk of developing oral cancer so prevention strategies can be implemented. Leukoplakia is the most common potentially malignant lesion of the oral cavity and its malignant transformation is associated with loss of heterozygosity (LOH) in the 9p21 locus. Studies of LOH in leukoplakia have so far used DNA extracted from biopsy specimens. However, it would be important to use cytopathology to obtain DNA, since this is a non-invasive and innocuous collection method that allows several collections over time. However, it is necessary first to verify if the DNA obtained by cytopathology is comparable to the DNA obtained by the methods already used in the literature. Therefore, the objective of this study is to evaluate the frequency of LOH in individuals with oral leukoplakia, from cytopathology and tissue obtained by biopsy. For this, 22 individuals were included in the study after signing the TCLE. From each individual, a cytological sample was obtained by scraping the lesion surface, a peripheral blood sample to obtain control DNA and the biopsy of the lesion was performed. DNA from the cytological sample and blood was extracted from FTA cards. Histological sections of paraffin blocks were made, and the epithelial and connective tissues were microdissected. The DNA from the tissue samples was extracted using DNAmimi Kit. PCR reaction of the DNAs with the microsatellite marker of the 9p21 IFNA region was performed. Next, the PCR products were submitted to capillary electrophoresis and the data analyzed. The LOH was observed in 6 samples, confirmed by both methods. The LOH events were observed in non-dysplastic (n=4) and dysplastic (n = 2) lesions. Most of the LOH detected was in nonsmoking patients (n = 4). Analysis of the microsatellite IFNA in the samples by cytopathology showed 45.4% of LOH, whereas the analysis in the biopsied samples revealed 27.3% of LOH. Of the 22 samples in total, we observed agreement only in 15 cases (68.2%). The chi-square test confirmed that there was no statistical association between the analyzes performed. Therefore, the two methods of sample collection for LOH analysis assessed are not comparable.

keywords: Leukoplakia. Malignant Transformation. Loss of Heterozygosity. Cytology. Biopsy.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	7
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	METODOLOGIA.....	13
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	13
3.2	AMOSTRA.....	13
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS.....	13
3.4	COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO.....	14
3.5	MICRODISSECÇÃO.....	14
3.6	EXTRAÇÃO DNA.....	14
3.7	AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	15
3.8	ANÁLISE DOS DADOS.....	16
3.9	ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS E BENEFÍCIOS.....	17
3.10	MANIPULAÇÃO E DESCARTE DAS AMOSTRAS.....	17
3.11	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	17
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	18
5	RESULTADOS.....	19
6	DISCUSSÃO.....	25
7	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXOS.....	33
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	33
	ANEXO B - Técnica de coloração Cristal Violeta 0,5%.....	35
	ANEXO C - Parecer COMPESQ – Faculdade de Odontologia UFRGS.....	36
	ANEXO D - Parecer Plataforma Brasil.....	37

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O carcinoma espinocelular representa 95% 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), sendo mantidas taxas de sobrevivência em torno de 50% em 5 anos (ANTUNES *et al.*, 2001; BIAZEVIC *et al.*, 2006). Em função disso, o câncer de boca pode ser considerado um problema de saúde pública, requerendo a implementação de estratégias de combate mais eficazes.

A carcinogênese na cavidade bucal é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal muitas vezes é precedido por uma lesão potencialmente maligna. Uma lesão potencialmente maligna consiste em um tecido alterado onde o câncer ocorre mais frequentemente em comparação a sua contraparte normal (MAO, 1997; REIBEL, 2003).

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5% (BANÓCZY; RIGÓ, 1991; DELILBASI *et al.*, 2003; JAHANBANI, 2003; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003; SCHEPMAN; SMEELE; VAN DER WAAL, 1996). Segundo Carrard *et al.* (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, hiperqueratose (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 hiperparaceratose 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 Barnes *et al.* (2005), na displasia epitelial podem-se observar as seguintes alterações:

- a) aumento do número de figuras de mitoses (algumas atípicas);
- b) presença de mitoses na metade superficial do epitélio;
- c) aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- d) nucléolos volumosos;
- e) duplicação da camada basal;
- f) estratificação epitelial irregular;
- g) ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa;
- h) papilas epiteliais em forma de gota;
- i) perda da polaridade das células da camada basal;
- j) perda de aderência intercelular;
- k) hiperchromatismo nuclear;

l) pleomorfismo celular.

Estima-se que a taxa anual de transformação maligna de leucoplasias seja de 1% (VAN DER WAAL, 2009). Apesar do enorme progresso no campo da biologia celular e molecular, não há um marcador ou um conjunto de marcadores que permitam de forma confiável prever a transformação maligna de uma 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 de possibilitar a utilização de medidas preventivas, como o abandono do uso de substâncias carcinogênicas e outros recursos quimiopreventivos.

A busca contínua pela descoberta de marcadores moleculares que possam identificar lesões com maior risco de progressão para malignidade está cada vez mais em evidência. Uma revisão com lesões epiteliais orais potencialmente malignas avaliou nos estudos o desenvolvimento de marcadores, o potencial deles assim como a confiabilidade de antever a transformação (NIKITAKIS *et al.*, 2018).

Existe uma série de biomarcadores citados na literatura com objetivo de avaliar com precisão o risco de progressão das leucoplasias bucais para o câncer. Villa *et al.* (2019) em uma revisão sistemática avaliaram 25 estudos a respeito de biomarcadores que incluíram desde marcadores inflamatórios ou oxidativos, fatores de crescimento, canais iônicos, fatores reguladores genéticos e celulares e biomarcadores epigenéticos. Entre os biomarcadores, destacaram-se reguladores da Podoplanina (proteína do tipo mucina, marcador específico do vaso linfático) e da p27 (proteína que regula o ciclo celular) por serem possíveis preditores independentes para transformação maligna. O que mostra a relevância na busca de identificar marcadores preditivos confiáveis para melhor compreender as alterações dessas lesões.

Atualmente a citopatologia em boca é utilizada como recurso de rastreamento de indivíduos em maior risco para câncer bucal (GEDOZ *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2004). A fim de aumentar a acurácia deste exame, são utilizadas técnicas quantitativas, como por exemplo, a quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados no raspado citológico com o emprego da coloração de Papanicolaou. 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 (ROSIN *et al.*, 2000). A avaliação das lesões para a perda de heterozigidade (LOH) têm sido utilizada e já mostrou associação com a transformação maligna. 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 *et al.* (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 loci alélicos frequentemente perdidos no câncer de cabeça e pescoço. 87 lesões cancerizáveis com diferentes achados histopatológicos pareadas com amostras normais foram analisadas. A maior frequência de LOH em leucoplasias com hiperplasia ou hiperqueratose ocorreu em 9p21 (20%), seguido por 3p14 (16%) e 17p13 (11%). Este achado indica que LOH nestas regiões é um evento precoce na progressão tumoral. Displasias epiteliais, consideradas um passo intermediário na evolução histopatológica para o câncer, mostraram LOH adicionais em 11q13 (29%), 13q21 (32%) e 14q31 (23%). Como esperado, houve também um aumento na frequência de perdas em 9p21 e 3p14 da etapa de leucoplasia sem displasia para leucoplasia com displasia.

O estudo realizado por Rosin *et al.* (2000) teve por objetivo avaliar a perda de heterozigidade (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.

Os estudos realizados sobre LOH em leucoplasia até o momento utilizaram DNA extraído de amostras teciduais de biópsias. No entanto, para avaliar o acúmulo de LOH em diferentes loci ao longo do tempo, de forma a detectar a progressão da carcinogênese, seria importante a utilização da citopatologia para a obtenção de DNA. Visto que a citopatologia é uma forma de coleta não invasiva e inócua, que permite várias coletas ao longo do tempo. No entanto, é preciso primeiramente verificar se o DNA obtido pela citopatologia é comparável ao DNA obtido pelos métodos já utilizados na literatura, pois apenas as células mais superficiais são coletadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência de perda de heterozigosidade de indivíduos com leucoplasia bucal, a partir da citopatologia e do tecido obtido pela biópsia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a frequência de perda de heterozigosidade com a progressiva severidade da alteração epitelial diagnosticada na leucoplasia;
- b) Comparar a frequência de perda de heterozigosidade de leucoplasias bucais a partir da análise de DNA obtido por citopatologia e por biópsia;

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este é um estudo transversal, observacional e analítico.

3.2 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).

A amostra foi constituída por pacientes do gênero masculino ou feminino, acima de 18 anos, que apresentam clinicamente leucoplasias bucais, sendo posteriormente subdivididos em grupos de acordo com a ausência ou presença de displasia epitelial no material histopatológico examinado.

Os critérios de inclusão deste estudo são: idade superior a 18 anos, ausência de lesão bucal clinicamente visível, com exceção da leucoplasia. O cálculo amostral é 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% (CALIFANO et al., 1996), dessa forma a amostra foi constituída de 22 pacientes. Na primeira consulta, foram explicados os objetivos do estudo e, os participantes que concordaram em fazer parte, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A). Os pacientes que não concordarem em participar do estudo tiveram seu atendimento garantido. Em seguida foi realizado o exame físico extra-oral e intra-oral.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Os participantes foram submetidos à realização de exame citológico da região onde está localizada a leucoplasia. Previamente à realização dos raspados, todos os pacientes foram orientados a retirar suas próteses removíveis (se existentes) e a bochechar água filtrada durante 1 minuto. A escova citológica foi colocada em um frasco do tipo eppendorf de 2mL, contendo como solução

tamponada fosfato salina (PBS). Os tubos foram individualmente colocados no vortex (Phoenix, AP – 56, Araraquara – Brasil) em velocidade máxima, após 15 segundos a escova foi removida. Em seguida, o tubo é centrifugado a 1500g por 10 minutos, o excesso de PBS é removido e o pellet de células é congelado a -20C para posterior extração de DNA (BREMNER *et al.*, 2005).

A seguir foi realizado o procedimento de rotina da Clínica Odontológica, procedendo a biópsia das lesões sob anestesia local, após a coleta de material citológico. O material obtido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10% e, processado pela técnica de rotina do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina (H&E). As leucoplasias foram diagnosticadas histopatologicamente de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (BARNES *et al.*, 2005). A coleta citopatológica prévia não influencia na qualidade da biópsia para o diagnóstico histopatológico.

3.4 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).

3.5 MICRODISSECÇÃO

A partir de lâminas com cortes histológicos de 8µm de espessura coradas com Cristal de Violeta 0,5% (ANEXO B), o epitélio e tecido conjuntivo das amostras biopsiadas foram microdissectadas de forma manual com auxílio de lupa e agulha ou através do Microdissector Laser PALM MicroBeam ZEISS. As amostras do tecido epitelial e conjuntivo foram coletadas em dois tubos separadamente distintos, onde o tecido conjuntivo microdissecado foi utilizado como fonte de DNA controle.

3.6 EXTRAÇÃO DNA

O isolamento de DNA das amostras teciduais foi realizado com o kit QIAamp DNA mini Kit (QiagenGmbH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções dos fabricantes. Enquanto que o isolamento do DNA das amostras citológicas e de DNA do sangue periférico foi realizado com o reagente FTA (Whatman International Ltd, Abingdon, Cambridge, UK). A concentração do DNA foi medida com espectrofotômetro.

3.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

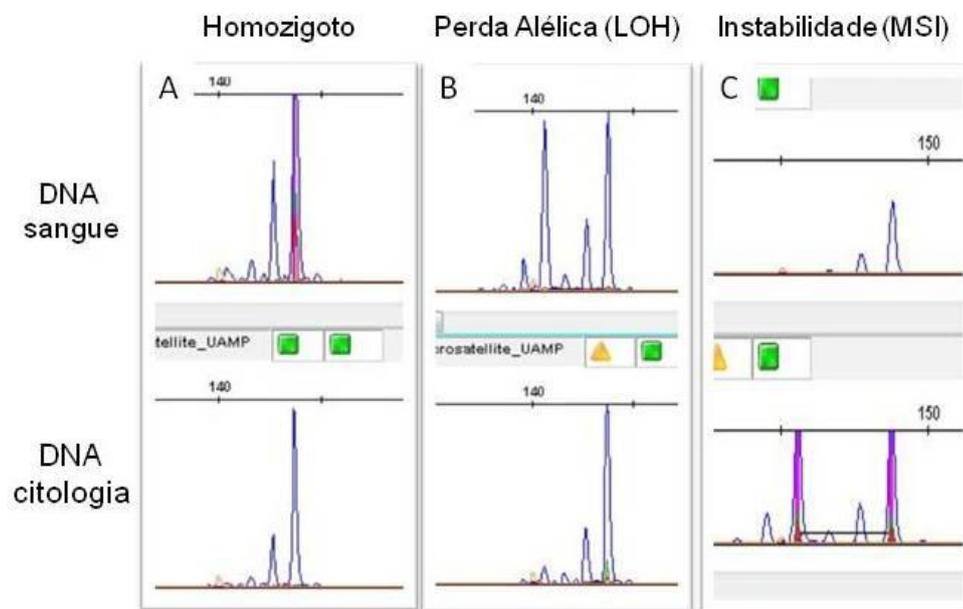
A perda alélica foi analisada utilizando-se o marcador de microssatélite localizado no cromossomo 9p21 (IFNA). Este marcador foi selecionado por ser frequentemente relacionado à perda alélica em câncer de cabeça e pescoço e em lesões cancerizáveis da mucosa bucal (CALIFANO *et al.*, 1996; EPSTEIN *et al.*, 2003; ROSIN *et al.*, 2000; ROSIN *et al.*, 2002; SPAFFORD *et al.*, 2001; SHUMWAY *et al.*, 2008; TSUI *et al.*, 2008).

As reações de PCR foram realizadas num volume total de 20µL contendo 10ng de DNA, primer, solução tampão, oligonucleotídeos e enzima Taq DNA Polimerase. A amplificação de cada grupo de primers consistiu em 30 a 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento entre 50-60°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Em seguida foi realizada a análise dos fragmentos por eletroforese capilar com ABI Genetic Prism 3500 e os dados analisados através do software GeneScan Analysis 3.7. A eletroforese capilar foi realizada na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A 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 controle/ altura do pico do alelo 2 da amostra de controle) / (altura do pico do alelo 1 da amostra epitelial / altura do pico do alelo 2 na amostra epitelial). As amostras em que a razão entre os valores dos alelos do controle e epitelial (lesão) foram menores ou igual a 0,5, ou maiores ou igual a 2, foram denominadas LOH. Os valores encontrados entre 0,5 e 2,0 foram considerados como casos de retenção dos alelos, ou seja, sem mutação nesse locus. Instabilidade de microssatélite (MSI)

foi definida como a presença de novos tamanhos de fragmentos na amostra de interesse, que estavam ausentes no DNA controle. Assim, a MSI se caracteriza por mutações causadas pela inserção de sequências de DNA no lócus estudado. Quando apenas 1 pico estava presente esta amostra foi considerada como homozigota, sendo considerada uma amostra não informativa (Figura 1).

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



Fonte: o autor

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados do presente estudo foram tabelados, analisados e determinadas as frequências absolutas e relativas. A concordância entre os resultados obtidos das amostras citológicas e das amostras de tecido biopsiado foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, sendo considerado um nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$).

3.9 ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Os procedimentos no presente estudo incluem exames clínicos e métodos de coleta de células bucais que são inócuos e não-invasivos, e de coleta de sangue que é invasivo, mas inócuo por utilizar apenas materiais estéreis não oferecendo nenhum risco aos pacientes.

Os benefícios para os participantes no presente estudo foram os seguintes:

- a) diagnóstico histopatológico;
- b) informações sobre higiene e autocuidado bucais;
- c) encaminhamento para o tratamento de outras patologias bucais e condições clínicas de acordo com as possibilidades de atendimento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.10 MANIPULAÇÃO E DESCARTE DAS AMOSTRAS

Todos os procedimentos envolvendo material biológico foram realizados com o uso de equipamentos de proteção individual (avental, máscara, luvas). Materiais tóxicos foram manipulados em capela de exaustão e o descarte de resíduos químicos foi feito via o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para a sua correta eliminação. Durante o transcorrer, bem como ao final dos experimentos, os materiais biológicos utilizados ou não para esta pesquisa foram descartados em sacos plásticos brancos com identificação de material biológico ou caixas para perfuro-cortantes e recolhidos por empresa contratada pela UFRGS para coleta deste tipo de resíduos.

3.11 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O conjunto dos experimentos deste projeto foi realizado no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia (ANEXO C) e pela Plataforma Brasil (ANEXO D) previamente ao início de sua execução. Fizeram parte do estudo todos os indivíduos convidados que concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os dados coletados foram protegidos por confidencialidade. Após os dados serem digitados no banco de dados, os participantes foram referidos apenas por um código de referência.

5 RESULTADOS

Ao total 22 leucoplasias foram analisadas, sendo 12 casos em mulheres (54,6%) e 10 casos em homens (45,4%). A média de idade foi de 59,3, variando de 25 a 77 anos de idade, sendo 95,5% com idade acima dos 40 anos. A maioria dos pacientes era fumante (59%), com consumo médio de 28,8 packyears. A análise microscópica revelou que 63,6% das lesões foram diagnosticadas como hiperplasia epitelial ou hiperqueratose, 31,8% apresentaram displasia epitelial e 4,6% queilite actínica. As localizações das leucoplasias foram: lábio inferior, palato duro, palato mole, assoalho bucal, dorso de língua, ventre de língua, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e rebordo alveolar, sendo 14 casos (63,6%) em locais considerados de alto risco (Tabela 1).

Os casos de LOH, confirmado tanto a partir do DNA obtido pela biópsia quanto pela citopatologia, foram 6 (27,3%). A distribuição dos eventos de LOH foi observada nos casos de displasia epitelial (n=2), hiperplasia epitelial com hiperortoceratose (n=3) e hiperortoceratose (n=1). A maior parte de LOH detectada foi em pacientes não fumantes (n=4). Não observamos relação com o consumo de bebida alcoólica, pois a distribuição de LOH ficou dividida em 2 casos de pacientes etilistas, 2 ex-etilistas e 2 que não possuem o hábito. Os sítios de acometimento das lesões que houve LOH foram: palato duro (n=1), rebordo alveolar/gengiva (n=2), mucosa jugal (n=1), ventre de língua (n=1) e borda de língua (n=1), consistindo apenas 2 casos em sítios de alto risco (Tabela 2).

A análise do microssatélite IFNA nas amostras por citopatologia revelou 45,4% de LOH, enquanto que a análise nas amostras biopsiadas revelou 27,3% de LOH. Das 22 amostras no total, observamos concordância apenas em 15 casos (68,2%) entre os resultados da citopatologia e das biópsias. A análise pelo teste de qui-quadrado confirmou que não há associação estatística entre as análises realizadas. Em relação aos 7 casos em que houve divergência, observamos que enquanto os resultados na citopatologia revelaram LOH (n=4), instabilidade (n=2) e homozigose (n=1), as amostras desses casos obtidas pelas biópsias revelaram apenas retenção (Quadro 1).

Dos 22 indivíduos estudados, 20 estão em acompanhamento por 31,6 meses em média (\pm 34,35). Durante esse período apenas 1 lesão progrediu para

carcinoma espinocelular, sendo que esta estava localizada em borda de língua e apresentou LOH tanto na análise feita a partir da biópsia quanto por citologia.

Tabela 1 – Dados demográficos, de exposição e histopatológicos das amostras estudadas (continua)

Características	Grupo Leucoplasia n=22
Sexo	
<i>Feminino</i>	12 (54,6%)
<i>Masculino</i>	10 (45,4%)
<i>Média de Idade (± Desvio Padrão)</i>	59,3 (±13)
<i>Exposição Fumo</i>	59% 13,6% Ex-fumante
<i>Média Packyears (± Desvio Padrão)</i>	28,8 (±16,4)
<i>Exposição Álcool Etílico</i>	36,4% 13,6% Ex-consumidor
<i>Localização das lesões</i>	
Assoalho Bucal	4 (18,1%)
Lábio Inferior	2 (9,1%)
Palato Mole	3 (13,6%)
Palato Duro	1 (4,6%)
Dorso de Língua	2 (9,1%)
Ventre de Língua	3 (13,6%)
Gengiva / Rebordo alveolar	4 (18,1%)
Mucosa Jugal	1 (4,6%)
Bordo de Língua	2 (9,1%)

Tabela 1 – Dados demográficos, de exposição e histopatológicos das amostras estudadas (conclusão)

Características	Grupo Leucoplasia n=22
<i>Diagnóstico Histopatológico</i>	
Hiperkeratose	7 (31,8%)
Hiperplasia Epitelial e Hiperkeratose	7 (31,8%)
Displasia Epitelial	7 (31,8%)
Queilite Actínica	1 (4,6%)

Fonte: o autor

Tabela 2 – Dados clínico-patológicos e moleculares das amostras

(continua)

Caso	Gênero	Idade	Fumo	Álcool	Localização da lesão	Diagnóstico histopatológico	Citopatologia	Biópsia
#1	Masculino	69	Fumante	Etilista	Palato Mole	Hiperplasia epitelial e Hiperortoceratose	Retenção	Retenção
#2	Masculino	53	Fumante	Ex-etilista	Palato Duro	Hiperplasia epitelial com hiperortoceratose	LOH	LOH
#3	Masculino	77	Não fumante	Não etilista	Dorso de Língua	Displasia Epitelial	MSI	Retenção
#4	Feminino	76	Não fumante	Etilista	Assoalho Bucal	Displasia Epitelial	MSI	Retenção
#5	Feminino	74	Fumante	Etilista	Rebordo Alveolar	Hiperortoceratose	Homozigose	Retenção
#6	Feminino	76	Fumante	Não etilista	Rebordo Alveolar	Hiperplasia epitelial e hiperortoceratose	Retenção	Retenção
#7	Masculino	25	Fumante	Etilista	Assoalho Bucal	Hiperparaceratose	LOH	Retenção
#8	Feminino	60	Fumante	Não etilista	Assoalho Bucal	Hiperortoceratose	LOH	Retenção
#9	Feminino	60	Ex-Fumante	Etilista	Rebordo Alveolar	Hiperortoceratose	LOH	LOH
#10	Masculino	48	Fumante	Etilista	Palato Mole	Hiperparaceratose	LOH	Retenção
#11	Feminino	64	Fumante	Etilista	Palato Mole	Hiperortoceratose	Retenção	Retenção
#12	Masculino	70	Fumante	Ex-Etilista	Lábio Inferior	Displasia Epitelial	Retenção	Retenção

Tabela 2 – Dados clínico-patológicos e moleculares das amostras

Caso	Gênero	Idade	Fumo	Álcool	Localização da lesão	Diagnóstico histopatológico	(conclusão)	
							Citopatologia	Biópsia
#13	Feminino	60	Ex fumante	Etilista	Dorso de Língua	Hiperplasia epitelial e Hiperparaceratose	Retenção	Retenção
#14	Feminino	62	Não fumante	Ex-Etilista	Ventre de Língua	Displasia Epitelial	LOH	LOH
#15	Feminino	59	Fumante	Etilista	Assoalho Bucal	Hiperparaceratose	LOH	Retenção
#16	Feminino	48	Não fumante	Não Etilista	Mucosa Jugal	Hiperplasia epitelial e Hiperortoceratose	LOH	LOH
#17	Feminino	41	Fumante	Não Etilista	Ventre de Língua	Displasia Epitelial	Retenção	Retenção
#18	Masculino	62	Ex fumante	Ex etilista	Ventre de Língua	Displasia epitelial	Retenção	Retenção
#19	Masculino	48	Não fumante	Etilista	Borda de Língua	Displasia epitelial	LOH	LOH
#20	Masculino	42	Fumante	Não etilista	Borda de Língua	Hiperplasia epitelial e hiperparaceratose	Retenção	Retenção
#21	Masculino	61	Fumante	Não etilista	Lábio Inferior	Queilite Actínica	Retenção	Retenção
#22	Feminino	67	Não fumante	Não etilista	Gengiva	Hiperplasia epitelial e hiperceratose	LOH	LOH

Fonte: o autor

Quadro 1 – Quadro de contingência da análise de microssatélite das amostras obtidas por biópsia ou por citologia.

		Citologia				Total
		Retenção	¹ LOH	² MSI	Homozigose	
Biópsia	Retenção	9	4	1	2	16
	LOH	0	6	0	0	6
	MSI	0	0	0	0	0
	Homozigose	0	0	0	0	0
Total		9	10	1	2	22

¹LOH = Perda de Heterozigosidade

²MSI = Instabilidade

Qui-quadrado $p = 0,3131$.

Fonte: o autor

6 DISCUSSÃO

A prevalência mundial das lesões potencialmente malignas é de 4,47% e a leucoplasia oral é uma das lesões mais comuns (4,11%) (MELLO *et al.*, 2018). Uma revisão sistemática recente, indicou que a taxa de transformação maligna varia entre 0,13% e 34,0% sendo que a taxa média de transformação entre todos os estudos em pacientes com leucoplasia oral foi de 14,9% (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Na busca de detectar quais lesões teriam maior potencial de transformação, a perda de heterozigosidade (LOH) representa um marcador adicional promissor como preditor de risco (CALIFANO *et al.*, 1996; ROSIN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2012) destacaram o papel preditivo da LOH em 9p, revelando uma forte associação da LOH em 9p21 com a progressão maligna. No entanto, a maior parte dessa evidência foi construída utilizando amostras teciduais provenientes de biópsias. A coleta citológica pode ser uma fonte alternativa e valiosa para obtenção de amostras de forma não invasiva, porém ainda não é claro na literatura se a análise a partir da citologia fornecerá resultados semelhantes aos obtidos a partir da biópsia. Diante destes dados, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a frequência de perda de heterozigosidade no cromossomo 9p21 de indivíduos com leucoplasia bucal, comparando duas fontes de amostras: a citopatologia e a amostra parafinada obtida pela biópsia.

Analisando as 22 amostras deste estudo, detectamos que 6 (27,3%) apresentaram LOH, confirmadas tanto pela citologia quanto pela biópsia. Dois estudos com metodologia semelhante exibiram valores aproximados, Bremmer *et al.* (2009) em sua pesquisa observaram que a LOH estava presente em 7 (28%) de 25 casos e no estudo realizado por Graveland *et al.* (2013) 11 (26,2%) de 42 amostras revelaram LOH no cromossomo 9p. Bremmer *et al.* (2009) observou concordância em 80% das amostras enquanto que Graveland *et al.* (2013) obteve concordância em apenas 55% das amostras citológicas e teciduais. Das 22 amostras que avaliamos, obtemos concordância em 15 casos (68,2%), valor intermediário aos encontrados previamente na literatura. Nestes estudos todas as amostras que tinham LOH por citopatologia a LOH também foi correspondente nas amostras biopsiadas (BREMNER *et al.*, 2009; GRAVELAND *et al.*, 2013), já nossos resultados mostram que 10 amostras que sofreram perda de heterozigosidade na citopatologia, em 6 delas a perda foi equivalente nas amostras biopsiadas. Os tipos de divergência

que observamos foram de LOH, MSI e homozigose nas amostras citológicas enquanto que na análise da biópsia foi observada apenas retenção, porém nem a MSI quanto a homozigose foram avaliados nos estudos acima citados, pois a comparação ocorreu somente se a LOH estava presente ou não na citopatologia e no tecido biopsiado. Considerando a amostra tecidual da biópsia como padrão, indicaram a especificidade que foi de 100% em ambos os estudos e sensibilidade analítica de 80% (BREMER *et al.*, 2009) e 45% (GRAVELAND *et al.*, 2013), enquanto que a sensibilidade do nosso estudo é de 100% a especificidade é de apenas 43,75%.

Em nossos resultados obtivemos discordância de 7 amostras entre os resultados da citopatologia e das biópsias. É importante considerar que as células obtidas pelas duas formas de coleta diferem, enquanto que a citologia é capaz de extrair apenas as células mais superficiais da lesão, na análise pelo corte histológico da biópsia toda a extensão do epitélio é utilizada para análise. Além disso, na coleta por citologia pode haver contaminação com outras fontes de DNA, como da saliva por exemplo. Sabendo que usualmente esses pacientes apresentam um campo de cancerização, é possível que células descamadas de outros sítios da mucosa e presentes na saliva possam ter gerado resultados com mais dano do que na análise tecidual. Bremmer *et al.* (2009) observaram LOH na região de 9p em amostras citológicas de mucosa jugal clinicamente normal de um paciente com leucoplasia localizada no palato. Outro estudo quantificou a perda de heterozigosidade no carcinoma espinocelular e descreveu que pelo menos 1/3 (10 de 28) dos pacientes apresentaram alterações genéticas na mucosa clinicamente normal adjacentes ao tumor, utilizando marcadores de microssatélites, dentre eles do cromossomo 9p (TABOR *et al.*, 2001). Através desses estudos percebemos que pode haver LOH além do sítio da lesão, em mucosa clinicamente normal devido ao campo de cancerização.

Outro fator que pode ter contribuído para a discrepância encontrada é o fato de que na maioria destes casos (5 de 7) a biópsia foi do tipo incisional, enquanto que o esfregaço citológico foi realizado em toda a extensão da lesão. Já foi comprovado previamente na literatura que as leucoplasias podem apresentar alterações morfológicas e moleculares heterogêneas em diferentes locais da lesão. Gomes *et al.* (2015) avaliaram diferentes marcadores de microssatélites em biópsias obtidas de diferentes sítios da mesma leucoplasia e, em 5 de 6 casos foi detectado

padrão distinto de LOH nos dois sítios estudados.

Não observamos associação entre LOH com a graduação histológica, porém este foi um achado em estudos anteriores. Graveland *et al.* (2013) observou perdas alélicas mais frequentes em leucoplasias com displasia moderada ou severa em 7 de 20 casos. Rosin *et al.* (2000) constatou nos casos que não houve progressão maligna perda de 9p em apenas 3% de hiperplasias enquanto que nas displasias foi de 46%, já nos casos que progrediram a perda alélica foi de 50% nas hiperplasias e 83% nas amostras displásicas. Possivelmente, não observamos essa relação devido ao tamanho amostral pequeno em nosso estudo.

O padrão específico de LOH nas leucoplasias foi estudado quanto ao risco de progressão maligna, portanto acompanhamos os casos ao longo do tempo, sendo que nosso seguimento foi de 31,6 meses, período menor se comparado à literatura existente. Em apenas um caso a lesão progrediu para carcinoma espinocelular sendo que este apresentou LOH em 9p, tanto na análise por citologia quanto por biópsia. Rosin *et al.* (2000) acompanharam 116 casos em um tempo médio de 43,5 meses e 29 sofreram progressão maligna (22 com perda em 9p). Zhang *et al.* (2012) seguiu no tempo médio de 44,6 meses, 296 pacientes e 41 apresentaram transformação maligna (37 com LOH em 9p). Em um estudo mais recente que acompanhou 445 casos, 60 tiveram progressão maligna e o tempo de acompanhamento médio foi de 55,4 meses com LOH em 9p definido como risco moderado para progressão (ROCK *et al.*, 2018). Além do grande número de amostras e um maior tempo de acompanhamento, outra diferença dos estudos citados em relação ao nosso é que não houve a análise citopatológica das amostras, somente dos tecidos biopsiados. Já em comparação com outro trabalho que observou a citopatologia das amostras e biópsia, o tempo médio de acompanhamento também foi menor (20,3 meses) dos 43 pacientes, e 6 progrediram para carcinoma espinocelular (5 com perda alélica em 9p) (GRAVELAND *et al.*, 2013).

Em relação ao hábito tabagista, 4 de 6 amostras que apresentaram LOH foram em pacientes não fumantes. La Oliva *et al.* (2019) compararam alterações moleculares em indivíduos com leucoplasias e com câncer oral, fumantes e não fumantes, e apesar de LOH em 9p21 ser um achado frequente, não observou diferenças significativas entre os dois grupos. A literatura mostra que pacientes não fumantes com leucoplasia são duas vezes mais propensos a progressão maligna do

que pacientes fumantes (ROCK *et al.*, 2018). Outro dado interessante analisado no mesmo estudo foi que em pacientes não fumantes com displasia epitelial, a transformação maligna ocorreu mais rapidamente do que em pacientes com displasia associado ao tabagismo. Dois pacientes não fumantes de nosso estudo apresentaram displasia epitelial e um deles foi justamente o caso em que houve progressão maligna. A partir disto, devemos levar em consideração que pacientes não fumantes com leucoplasia precisam ser monitorados rigorosamente devido ao alto risco de progressão maligna.

Finalmente, é importante considerar as semelhanças das características das lesões que estudamos em relação à literatura prévia. A média de idade do nosso trabalho foi de 59,3 anos, semelhante à média observada previamente. Nos dois grupos estudados por Rosin *et al.* (2000) a média foi de 55 e 58 anos. A média do grupo pesquisado por Graveland *et al.* (2013) foi de 61 anos e Rock *et al.* (2018) a média foi de 58,8 anos. Fumo e álcool são hábitos essenciais a serem abordados, já que são os principais fatores etiológicos das lesões malignas, a maior parte da nossa amostra era fumante e o hábito etilista não era predominante, assim como nos estudos de Rosin *et al.* (2000), Zhang *et al.* (2012) e Rock *et al.* (2018). Ao observarmos a localização das lesões, em três estudos a língua foi o sítio mais acometido pelas lesões (GRAVELAND *et al.*, 2013; ROCK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2012), em nosso trabalho a maior parte das lesões estavam em assoalho bucal (18,1%) e gengiva/rebordo alveolar (18,1%), mas se considerarmos a língua como um todo, ou seja, os três sítios em que foram encontradas as lesões (dorso, ventre e bordo), a língua é a localização mais comum (31,8%) em nosso estudo. Essas paridades com a literatura existente mostram que nossa amostra, embora pequena, seja representativa.

7 CONCLUSÃO

A frequência de LOH foi de 45,4% nas amostras citológicas e 27,3% nas amostras de biópsia das leucoplasias estudadas. A concordância entre os métodos foi de 68,2%. Portanto, os dois métodos de coleta para análise de LOH não são comparáveis. Não foi detectada associação entre LOH e a presença ou ausência de displasia epitelial. O único caso de transformação maligna em nossa amostra apresentou LOH tanto na análise citológica quanto pela biópsia, confirmando o potencial deste biomarcador em determinar o risco de progressão tumoral.

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, n. 4, p. 345-350, June 2001.
- BANÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. **Commun Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 265-267, Oct. 1991.
- BARNES, L. *et al.* Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. **IARC Press**, v. 3, n. 9, p. 177-179, 2005. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/patgen/bb9/index.php>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- BREMMER, J. F. *et al.* A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. **Laboratory Investigation**, Evans, v. 85, n. 12, p. 1481–1488, Aug. 2005.
- BREMER *et al.* Screening for oral precancer with noninvasive genetic cytology. **Cancer Prev Res.**, Philadelphia, v. 2, n. 2, p. 128-133, Feb. 2009.
- BIAZEVIC, M. G. *et al.* Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2105-2114, Oct. 2006.
- CALIFANO, J. *et al.* Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. **Cancer Res**, Baltimore v. 56, n. 11, p. 2488-2492, June 1996.
- 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 n. 2, p. 171–179, Mar. 2010.
- DELILBASI, C. *et al.* Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. **Turk J Med.**, Ancara, v. 33, n. 1, p. 39-42, Jan. 2003.
- EPSTEIN, J. B. *et al.* Increased allelic loss in toluidine blue–positive oral premalignant lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, New York, v. 95, n. 1, p. 45-50, Jan. 2003.
- 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, n. 4, p. 231-238, Aug. 2007.
- GOMES, C. C. *et al.* Inter- and intra-lesional molecular heterogeneity of oral leukoplakia. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 178-181, Feb. 2015.
- GRAVELAND, A. P. *et al.* Molecular screening of oral precancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 1129-1135, Dec. 2013.

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

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, n. 4, p. 518-539, Oct. 1978.

LA OLIVA, J. *et al.* Oral premalignant lesions of smokers and non-smokers show similar carcinogenic pathways and outcomes. A clinicopathological and molecular comparative analysis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, p. 1-22, Apr. 2019. DOI: 10.1111/jop.12864. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31006144>. Acesso em: 01 jul. 2019.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol Med Today**, Cambridge, v. 3, n.10, p. 442-448, Oct. 1997.

MELLO, F. W. *et al.* Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 47, n. 7, p. 633-640, June 2018.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and precancerous lesion. **CA Cancer J Clin**, New York, v. 52, n. 4 p. 195-215, Sept./Oct. 2002.

NIKITAKIS, N. G. *et al.* Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 125, n. 6, p. 650-669, June 2018.

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

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v. 14, n. 1 p. 47-62, Jan. 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, n. 2, p. 357-62, Feb. 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, n. 22, p. 6447-6450, Nov. 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, n. 3, p. 261–266, Apr. 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, n. 6, p. 619–625, Sept. 2003.

SCHEPMAN, K. P.; 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. 32, n. 6, p. 416-419, Nov.1996.

SHUMWAY, B. S. *et al.* Effects of a Topically Applied Bioadhesive Berry Gel on Loss of Heterozygosity Indices in Premalignant Oral Lesions. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v.14, n. 8, p. 2421-2430, Apr. 2008.

TABOR M. P. *et al.* Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v. 7, n. 6, p. 1523-1532, June 2001.

TSUI, I. F. L. *et al.* Multiple Aberrations of Chromosome 3p Detected in Oral Premalignant Lesions. **Cancer Prev. Res**, Philadelphia v. 6, n. 1, p. 424-429, Nov. 2008.

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, n. 4/5, p. 317–323, Apr./May 2009.

VILLA, A. *et al.* World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia. **Oral Dis**, Houndmills, v. 25, n. 1, p. 64-78, May 2019.

WALDRON, C. A.; SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, Atlanta, v. 36, n. 4, p.1386-1392, Oct. 1975.

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

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 45, n. 3, p. 155-166, Mar. 2016.

ZHANG, L. *et al.* Loss of Heterozygosity (LOH) profiles – validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prev. Res.**, Philadelphia, v. 5, n. 9, p 1081–1089, Sept. 2012.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante,

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

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

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

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

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

Nome Completo: _____

Telefone: _____

Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

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

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

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

ANEXO B - TÉCNICA DE COLORAÇÃO CRISTAL VIOLETA 0,5%

TÉCNICA DE COLORAÇÃO CRISTAL VIOLETA 0,5%

- Após corte histológico colocar as lâminas por 20 minutos na estufa a 65°C
- Xilol por 5 minutos (duas vezes)
- Álcool Absoluto por 2 minutos
- Álcool 70° por 2 minutos
- Cristal de Violeta por 30 segundos
- Álcool 70° por 1 minuto
- Álcool Absoluto por 1 minuto

ANEXO C - Parecer COMPESQ – Faculdade de Odontologia UFRGS

Projetos

<https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/ComissaoUnidade/forms/>.

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Fernanda Visioli

Projeto Nº: 23574

Título: ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINOGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CANCER BUCAL

COMISSAO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

Avaliar a frequência de perda de heterozigosidade, a atividade proliferativa celular e o padrão de descamação dos diferentes tipos celulares 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. Serão incluídos 27 pacientes, número baseado em cálculo de amostra, em cada um dos 4 grupos experimentais. Os pacientes serão obtidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Será realizada coleta citológica de células do bordo da língua e do assoalho de boca. Pacientes com leucoplasia e carcinoma receberão biopsia para confirmação do diagnóstico. A análise de perda de heterozigosidade será feita a partir de uma coleta de sangue. O projeto apresenta-se bem descrito e com metodologias apropriadas. Antes de ser enviado para o Comitê de Ética, o cronograma deve ser adequado inserindo-se ano e mês de cada fase do estudo.

ANEXO D - Parecer Plataforma Brasil

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-REITORIA DE PESQUISA -	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL		
Pesquisador: Fernanda Visoli		
Área Temática:		
Versão: 3		
CAAE: 06949612.7.0000.5347		
Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul		
Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 261.037		
Data da Relatoria: 04/04/2013		
Apresentação do Projeto:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Objetivo da Pesquisa:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.		
Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro Bairro: Farcopilha CEP: 96.240-000 UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)3308-3728 Fax: (51)3306-4085 E-mail: arica@propesq.ufrgs.br		
Página 01 de 02		



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 261.031

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 02 de Maio de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Bruno Cassel Neto
Vice-Pró-Reitor de Pesquisas
PROPESQ/UFRS

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Foz de São João CEP: 91.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3306-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br