

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

TATIANA WANNMACHER LEPPER

**MÉTODOS DE RASTREAMENTO NA PREVENÇÃO DO
CÂNCER BUCAL**

Porto Alegre, 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**MÉTODOS DE RASTREAMENTO NA PREVENÇÃO DO
CÂNCER BUCAL**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Patologia Bucal, da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Aluna: Tatiana Wannmacher Lepper

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

LEPPER, TATIANA WANNMACHER
MÉTODOS DE RASTREAMENTO NA PREVENÇÃO DO CÂNCER
BUCAL / TATIANA WANNMACHER LEPPER. -- 2018.
68 f.
Orientador: PANTELIS VARVAKI RADOS.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2018.

1. CÂNCER BUCAL. 2. PREVENÇÃO. 3. CITOPATOLOGIA. 4.
AZUL DE TOLUIDINA. I. RADOS, PANTELIS VARVAKI, orient.
II. Título.

Dedicatória

Dedico aos meus filhos Júlia, Arthur e Miguel.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha família (Mãe, Pai, Irmão, Filhos e Kris). Agradeço aos meus pais, Cláudia e Sérgio, graças ao acolhimento, motivação e ajuda com a rotina em as todas manhãs, tardes e até noites que pude realizar e concluir mais esta etapa de minha formação. Foi com a inspiração de minha mãe, que também como educadora, obtive a disciplina e empenho de me conduzir a tal feito. Agradeço aos meus irmãos, Gui e Ico, que como irmãos sempre estiveram ao meu lado. Agradeço aos meus filhos Júlia, Arthur e Miguel e ao Kris, pela paciência de esperarem por vários finais de semana, além de muitas noites, a mãe estudar, escrever, estudar, escrever, estudar e escrever e que vibraram com a conclusão desta etapa.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Pantelis, pela excelente parceria científica que construímos nestes 2 anos, por todos os ensinamentos, por todas as críticas a minha forma de escrever, as quais me fizeram crescer imensamente. O agradeço por me apresentar verdadeiramente ao mundo da Patologia e Estomatologia, em especial a Citopatologia, que graças aos seus conhecimentos e vontade de ensinar me tornou até mesmo uma Cirurgiã melhor.

Agradeço as outras professoras, Márcia, Laura e Fernanda pelo imenso carinho ao me acolherem de volta a UFRGS. As agradeço por me permitirem contribuir no CEO da Patologia com uma das atividades que mais amo que é o ato cirúrgico juntamente aos alunos, e, assim, poder contribuir um pouquinho com aquilo que já é minha rotina há anos e ao mesmo tempo poder aprender cada dia mais com a interação Estomato-Patologia.

Agradeço a todos pacientes que passaram por mim nesta caminhada, pois sem eles este estudo não seria possível.

Agradeço aos colegas e muitos amigos que fiz neste decorrer, como a Bianca, Stephanie, João Paulo, Arthur, Bibi, Felipe, Bel, Paloma, Ingrid, Juju, Taiane, Dudu e todos do Laboratório que sempre estiveram junto neste aprendizado. Agradeço em especial a Natália e minha IC Renata pela ajuda incondicional que me deram durante todo o estudo. Foi com a união destas forças que tudo foi se construindo.

Agradeço a minha companheira de trabalho e de bloco cirúrgico, Luciana (Lu), que mesmo neste último ano intenso que tivemos, me aconselhou e “segurou as pontas” quando eu precisei estar ausente para me dedicar ao Mestrado.

Por fim, agradeço a vida, por me permitir estar nesta Instituição a qual admiro tanto e assim pude ter a minha formação nela, cercada de pessoas especiais que compreenderam esse meu ritmo de vida um tanto quanto diferente e me proporcionaram riquíssimos momentos de aprendizagem.

Sumário

1. Resumo	-----	06
2. Introdução	-----	08
3. Objetivos	-----	12
4. Artigo 1	-----	13
<i>Testes diagnósticos para detecção precoce do câncer bucal: revisão sistemática.</i>		
5. Artigo 2	-----	33
<i>Auxiliary methods for the oral cancer screening</i>		
6. Considerações Finais	-----	51
7. Referências Bibliográficas	-----	54
8. Anexos	-----	60
8.1. Comitê de Ética	-----	59
8.2. TCLE	-----	60
8.3. Ficha Entrevista Anamnese	-----	61
8.4. Ficha Exame Clínico	-----	63
8.5. Procolo Papanicolau	-----	64

1. RESUMO

O câncer bucal representa um problema importante de saúde pública no país. Aproximadamente 94% de todas as lesões malignas orais são carcinoma espinocelular (CEC). O sítio mais comumente acometido pelo CEC é a língua, geralmente as superfícies laterais, posterior e ventral. O assoalho de boca é o segundo sítio mais acometido. O prognóstico dos cânceres da mucosa bucal depende seu diagnóstico precoce. A detecção de lesões potencialmente malignas contribui para o rastreio do câncer bucal. Logo, avaliações preventivas devem ser realizadas principalmente em indivíduos do grupo de risco a fim de reduzindo a morbidade e mortalidade destes pacientes. O objetivo foi avaliar os estudos existentes na literatura relacionados aos métodos auxiliares de diagnóstico azul de toluidina, lugol, citopatologia, teste salivar, exame clínico e autoexame em mucosa bucal de adultos de ambos os sexos expostos a fatores de risco para o câncer bucal e avaliar o uso de métodos de diagnósticos que melhorem a detecção precoce do carcinoma espinocelular. Como resultado o azul de toluidina pode ser utilizada para a demarcação da área de biópsia, contribuindo para o rastreamento de lesões potencialmente malignas acompanhado de o histopatológico. A análise citopatológica através dos valores do número de células parabasais e relação N / C podem ser padrões de avaliação para o desenvolvimento de alterações na mucosa bucal nos indivíduos expostos. Os métodos auxiliares avaliados neste estudo podem tornar mais efetiva a triagem de lesões com diferentes potenciais de malignidade, ajudando a melhorar a detecção precoce do CEC.

Palavras Chaves: câncer bucal, citologia, azul de toluidina.

INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a cada ano 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer, a maioria em países de baixa e média renda. As neoplasias orais malignas acometem milhares de pessoas em todo o mundo. No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer de boca para 2018, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é de 14,7 mil, sendo 11,2 mil homens e 3,5 mil mulheres.

Aproximadamente 94% de todas as lesões malignas orais são carcinoma espinocelular (CEC). O risco de câncer intra bucal aumenta com o aumento da idade, especialmente para homens e sua causa é multifatorial. Nenhum agente ou fator (carcinógeno) etiológico único tem sido claramente definido ou aceito, porém tantos fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar atuando e é provável que mais de um fator em conjunto. Os fatores extrínsecos incluem agentes externos, tais como tabaco, álcool e luz solar. Os fatores intrínsecos incluem estados sistêmicos ou generalizados, tais como desnutrição e fatores genéticos (NEVILLE et al, 2009).

O sítio mais comumente acometido pelo CEC é a língua, geralmente as superfícies laterais posterior e ventral. O assoalho de boca é o segundo sítio mais acometido, seguindo em ordem decrescente de frequência o palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (NEVILLE et al, 2009).

O carcinoma de células escamosas tem uma apresentação clínica variada, incluindo as seguintes: exofítica (papilar ou verruciforme), endofítica (invasiva ou ulcerada), leucoplásica (mancha branca), eritroplásica (mancha vermelha) ou leucoeritroplásica (combinação de áreas brancas e avermelhadas) (NEVILLE et al, 2009).

Vários carcinomas espinocelulares têm sido documentados em associação ou tem sido precedido por lesões pre cancerosas, como a leucoplasia e/ou eritroplasia. Contabilizando 96% de todos os cânceres orais, o CEC é geralmente precedido por lesões epiteliais displásicas, clinicamente vista como leucoplasias (OMAR, 2015). A transformação maligna, que é bastante

imprevisível, desenvolve em 1–40% das leucoplasias em 5 anos. Lesões displásicas na forma de eritroplasia carregam um risco de 90% de conversão maligna. Essas lesões são frequentemente biopsiadas cirurgicamente e na maioria dos casos, várias biópsias de acompanhamento são indicadas (OMAR, 2015).

O prognóstico dos cânceres da mucosa bucal depende seu diagnóstico precoce. A detecção de lesões potencialmente malignas contribui para o rastreio do câncer bucal. Logo, avaliações preventivas devem ser realizadas principalmente em indivíduos do grupo de risco a fim de reduzindo a morbidade e mortalidade destes pacientes (INCA, 2015).

Sabe-se que o exame clínico visual é ainda o principal método de diagnóstico bucal. A biópsia, quando necessária, acompanhada da análise histopatológica, no manejo de lesões bucais é a conduta considerada o padrão ouro para diagnóstico definitivo (SCIUBBA, 2001). Porém, a morbidade e as complicações pós-operatórias além do aspecto subjetivo da escolha do local a ser biopsiado, a qualidade e o tamanho do espécime removido pelo cirurgião e os critérios microscópicos utilizados pelo patologista são aspectos críticos deste tipo de análise. Além disso, a detecção precoce depende muito da capacidade do clínico de discriminar alterações às vezes sutis associada a lesões pré-malignas e condições inflamatórias que representam a maioria das anormalidades da mucosa. Isso pode ser um desafio, mesmo entre especialistas experientes. Desta forma, métodos de diagnósticos precoce do câncer bucal mais simples podem ser de grande valia na rotina clínica do cirurgião-dentista (MACAULAY et al, 2012).

Muitos meios diagnósticos visam melhorar a eficiência desta detecção precoce: esfregaço e escovação associados a várias técnicas de citologia, corantes vitais, fluorescência, microscopia confocal, tomografia, espectroscopia, testes genéticos e quimioluminescência. Entretanto, estes testes ainda não fizeram evidência de precisão suficiente para excluir ou confirmar um diagnóstico de benignidade ou malignidade (REYCHLER et al, 2010).

A amplificação de imagens está sendo utilizada para auxiliar no exame clínico. A captura de imagens intra bucais detecta lesões em locais de difícil visualização e demonstra detalhes sobre as

superfícies, sutilezas das cores, dos contornos e dos limites das alterações (CALANDRO, 2009) e a quimioluminescência através de diferentes tons de luz pode refletir alterações metabólicas e estruturais que o tecido exposto possa estar sofrendo (MORO et al, 2010). A imagem de autofluorescência de campo alargado (AFI) surgiu como uma técnica para melhorar a capacidade do clínico de detectar neoplasia oral. AFI ilumina vários centímetros de tecido com luz ultravioleta ou azul, produzindo fluorescência visível de vários componentes teciduais, predominantemente colágeno estromal e alterações teciduais associada ao desenvolvimento neoplásico, como a perda da integridade do colágeno e espessamento do epitélio pode levar a uma diminuição na intensidade de fluorescência observada (PIERCE et al, 2012).

Outros métodos de diagnóstico precoce do câncer bucal que vem sido descritos na literatura são os corantes vitais, como Lugol e o Azul de Toluidina. A coloração por Lugol é amplamente utilizada para detecção precoce do câncer do colo do útero. O princípio básico é que o iodo se liga ao glicogênio e sabe-se que em lesões displásicas este componente encontra-se diminuído ou até mesmo ausente, portanto, tais células não se coram ou coram-se fracamente pelo Lugol (PETRUZZI, 2010). Já a coloração por azul de toluidina também pode ser utilizada como um método adjunto para o diagnóstico de lesões epiteliais. Diversos estudos têm reportado bons resultados quanto à sensibilidade que varia de 72% a 100% e especificidade de 45% a 92% para detecção de lesões suspeitas de malignidade (ALLEGRA, 2009; EPSTEIN, 2007; ZHANG, 2005). O azul de toluidina foi primeiramente utilizada para detectar precocemente alterações na mucosa do aparelho reprodutor feminino e epitélio conjuntivo ocular. Este corante tem afinidade por ácidos nucleicos celulares que estão presentes em maior quantidade nas células alteradas. Dessa forma, essas células absorvem maior quantidade do corante e geram manchas azul-escuras intensas, o que é interpretado como regiões com maior probabilidade de possuírem displasia epitelial (LEJOY et al, 2016).

Uma técnica simples, não invasiva e de baixo custo é a citologia exfoliativa. Esta técnica pode obter uma amostra de células epiteliais de lesões potencialmente malignas que podem ser submetidas a exame microscópico ou molecular para avaliar sinais de mudança maligna (WEIGUM et al, 2010). A citopatologia também tem sido considerada na literatura como eficaz para realizar o monitoramento dos indivíduos de risco (CANÇADO et al., 2001). Análises utilizando padrões citomorfométricos através da coloração por Papanicolau podem contribuir para identificar biomarcadores para detecção precoce de doenças precursoras no processo de malignização e observar diferentes padrões de maturação em células bucais expostas a carcinógenos, como as leucoplasias e carcinomas espinocelulares (BURZLAFF et al, 2007).

Outro método que vem sendo estudado são os biomarcadores salivares, uma vez que fluidos corporais podem transportar proteína, DNA e espécies de RNA que permitem a detecção de alterações celulares relacionado ao câncer. Fluidos corporais, como sangue ou saliva, representam uma importante fonte para triagem de doenças e diagnóstico por ter como vantagens a acessibilidade, ser um procedimento não invasivo, o baixo custo e amostragem múltipla para assim acompanhamento do desenvolvimento da doença (SARTINI et al, 2012).

Desta forma, metodologias conjuntas para identificar indivíduos que tenham maior probabilidade de desenvolver lesões com risco de malignização pode melhorar a efetividade do processo de rastreamento (ROSIN et al, 2000). Estudos para avaliar métodos de prevenção para o câncer da boca em grupos expostos aos fatores de risco como também a elaboração de um protocolo clínico de monitoramento e de identificação de lesões potencialmente malignas e malignas são necessários.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os estudos existentes na literatura relacionados aos métodos auxiliares de diagnóstico azul de toluidina, lugol, citopatologia, teste salivar, exame clínico e autoexame em mucosa bucal de adultos de ambos os sexos expostos a fatores de risco para o câncer bucal.

Avaliar o uso de métodos de diagnósticos que melhorem a detecção precoce do carcinoma espinocelular.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a efetividade do teste de azul de toluidina na mucosa bucal de indivíduos de risco para o câncer bucal;

Avaliar o teste da citopatologia bucal com a coloração de Papanicolau em indivíduos de risco para o câncer bucal;

Avaliar as alterações histológicas e citopatológicas nas eventuais áreas positivas ao teste de azul de toluidina em mucosa bucal de indivíduos de risco para o câncer bucal;

Comparar a avaliação clínica com as fotografias da mucosa bucal de pacientes de risco para o câncer de boca;

Buscar eventuais correlações entre os testes utilizados.

REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

- Artigo 1 -

4. Artigo 1 - Testes diagnósticos para detecção precoce do câncer bucal: uma revisão sistemática.

Previsão de submissão em Systematic Reviews Journal (qualis B1).

Resumo

O câncer bucal representa um problema importante de saúde pública no país, estando entre os 10 cânceres mais frequentes na população. Avaliações bucais periódicas preventivas devem ser realizadas em toda a população, uma vez que o prognóstico para neoplasias em estágios iniciais de desenvolvimento é melhor do que para as mais avançadas, reduzindo a morbidade como também a mortalidade destes indivíduos. Esta revisão sistemática teve como objetivo avaliar os estudos existentes na literatura relacionados aos métodos auxiliares de diagnóstico azul de toluidina, lugol, citopatologia, marcadores salivares, exame clínico e autoexame em mucosa bucal de adultos de ambos os sexos expostos a fatores de risco (álcool e fumo) para o câncer bucal. A estratégia de busca foi realizada por uma pesquisa nas bases de dados Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs e Bireme) e Scientific Eletronic Library Online (Scielo) por publicações relevantes realizadas até 2017. Na busca foram encontraram no total 94 artigos e após seguidos os níveis de seleção 12 artigos foram mantidos para leitura completa. A busca pelo aprimoramento de tecnologias podem ser caminhos promissores para o desenvolvimento futuro de métodos não invasivos e mais eficazes. Estudos com tamanho amostral maior e realizados de forma multicêntrica são necessários para a análise e formulação de um protocolo clínico sensível e específico para o diagnóstico precoce do câncer bucal.

Palavras chaves: câncer bucal, revisão sistemática, métodos auxiliares, azul de toluidina, citopatologia.

Introdução

O câncer bucal representa um problema importante de saúde pública no país, estando entre os 10 cânceres mais frequentes na população (MATEUS et al, 2008, HENRIQUE et al, 2007). De acordo com INCA estão previstos 15.490 novos casos de câncer de boca para 2017 no Brasil. Sua distribuição acometerá, possivelmente, 11.140 para homens e 4.350 para mulheres. Destes novos casos 5.401 venham a óbito.

O perfil epidemiológico de acometimento do câncer de boca é bem definido: homens são mais afetados do que mulheres, idade superior a 50 anos e pertencentes a classes sociais menos favorecida. A maior incidência ao sexo masculino pode-se justificar pelo fato de que eles estão mais frequentemente expostos aos fatores de risco tais como o tabaco e o consumo excessivo de álcool ou a interação entre ambos, que exibe forte efeito multiplicativo sobre o risco (WARNAKULASURIYA et al, 2009). A quantidade consumida e o tempo de exposição a estes dois fatores exibem, comumente, gradiente crescente de risco para o desenvolvimento do câncer. (INCA, 2017)

Esta neoplasia maligna é causada por uma combinação de fatores intrínsecos como condições sistêmicas e hereditariedade e fatores extrínsecos dentre estes a exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta (no caso específico do câncer de lábio inferior) (JOHNSON et al., 2005). A carcinogênese bucal se caracteriza desde modificações celulares prévias, as quais inicialmente podem não ser clinicamente detectáveis até alterações teciduais visíveis. (BARNES et al; 2005).

Avaliações bucais periódicas preventivas devem ser realizadas em toda a população, principalmente em indivíduos que compõem o grupo de risco (INCA, 2017). Tal ação é justificada pelo fato de que o prognóstico para neoplasias em estágios iniciais de desenvolvimento (tamanho do

tumor reduzido, sem comprometimento de linfonodos cervicais e sem metástases regionais) é melhor do que para as mais avançadas, reduzindo a morbidade como também a mortalidade destes pacientes (INCA, 2017). Apesar da detecção dos tumores de boca através do exame clínico da cavidade bucal ser possível, aproximadamente 90% das neoplasias malignas dessa região são detectadas em estágios avançados da doença (estádios III e IV) e apenas 7% estão na fase de carcinoma in situ (HENRIQUE et al, 2007; MATEUS et al, 2008).

Sabe-se que o exame clínico visual é o principal e mais tradicional método de diagnóstico bucal. Os critérios clínicos para suspeita de lesões potencialmente malignas e neoplasias incluem: alterações de textura e perda da integridade da superfície, cor, tamanho, indefinição dos limites ou mobilidade de estruturas intra ou extra bucais (SCIUBBA, 2001). Entretanto, a avaliação clínica pode nem sempre ser suficiente para garantir o diagnóstico precoce das lesões bucais, levando à necessidade da utilização de métodos auxiliares de exame. (LISIEUX et al, 2011).

Tecnologias visando diagnóstico por meio da amplificação de imagens e melhor iluminação estão sendo utilizados para auxiliar no exame clínico, entre elas temos a tomografia de coerência óptica, a quimioluminescência, autofluorescência e captura de imagens. Como aspectos positivos têm-se ser um exame rápido, eficaz e indolor ao paciente (OLIVEIRA, 2007). A video-oroescopia e a captura de imagens intra bucais detectam lesões em locais de difícil visualização, ou por serem muito pequenas ou pouco espessas (imperceptíveis a olho nu), além disso, demonstram maiores detalhes sobre as superfícies, sutilezas das cores, tons e nuances e precisão na observação dos contornos e dos limites das alterações (CALANDRO, 2009). Por sua vez a quimioluminescência através de diferentes tons de luz pode refletir alterações metabólicas e estruturais que o tecido exposto possa estar sofrendo (MORO et al, 2010).

Levando em consideração a baixa morbidade de métodos de diagnóstico, tem-se estudado biomarcadores salivares que sejam capazes de identificar pacientes de alto risco que podem evoluir para o câncer bucal (PRESTON et al, 2012).

O teste com o azul de toluidina e a citopatologia através da coloração pelo papanicolau são formas de rastreio importantes em estratégias de prevenção para o câncer de boca. Sua utilização tem o potencial de favorecer a discriminação entre indivíduos com maior risco para o desenvolvimento desta forma de neoplasia. (LISIEUX et al, 2011; SEGURA et al., 2015).

O azul de toluidina é um corante catiônico metacromático do grupo de tiazinas que marca seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais (radicais carboxílicos, sulfatos e fosfatos), apresentando afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA presente no citoplasma, os quais fixam o corante e coram-se profundamente (LISIEUX et al, 2011). A intensidade da coloração pelo azul de toluidina está na dependência do grau de comprometimento da superfície epitelial. Em lesões benignas observamos uma coloração tênue e nas displasias epiteliais e nos carcinomas a coloração é mais evidente devido à forte afinidade do corante por estas áreas. O teste com o azul de toluidina é indicado na detecção de displasias epiteliais, carcinomas *in situ* ou precocemente invasivos e no rastreamento de lesões bucais em grupos populacionais expostos aos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal (LISIEUX et al, 2011).

Além destes métodos auxiliares de exames, a citopatologia tem sido sugerida na literatura como eficaz para realizar o rastreamento ou monitoramento dos indivíduos sem lesões e com lesões potencialmente malignas, a fim de promover a detecção precoce de alterações iniciais e/ou prevenir o desenvolvimento de lesões com risco de malignização (OGDEN et al., 1992; CANÇADO et al., 2001; HAYAMA et al., 2005).

Desta forma, é de grande valia a realização de uma revisão sistemática da literatura, analisando os estudos que avaliam a sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos auxiliares de diagnóstico precoce do câncer bucal em grupos expostos aos fatores de risco bem como a sugestão de um protocolo clínico para monitoramento e identificação de alterações histológicas e/ou citológicas antes do aparecimento das lesões malignas clinicamente.

Materiais e Métodos

Esta revisão sistemática tem como objetivo geral avaliar os estudos existentes na literatura relacionados aos métodos auxiliares de diagnóstico azul de toluidina, lugol, citopatologia, teste salivar, exame clínico e autoexame em mucosa bucal de adultos de ambos os sexos expostos a fatores de risco (álcool e fumo) para o câncer bucal.

Questão de Pesquisa (Questão PICO)

PACIENTES: maiores de 18 anos de ambos os sexos expostos aos fatores de risco para o câncer bucal.

INTERVENÇÃO: métodos de rastreamento para o câncer bucal (azul de toluidina, lugol, exame clínico, autoexame, teste salivar, imagens ópticas e citologia).

COMPARAÇÃO: método de rastreamento e histopatológico por biópsia.

DESFECHO: câncer bucal

Pergunta de Pesquisa

Em adultos de ambos os sexos expostos aos fatores de risco para o câncer bucal, qual método de rastreamento apresenta maior acurácia para o diagnóstico precoce?

Critérios de Seleção

Critérios de Inclusão

a) Estudos que avaliem a acurácia através dos testes de diagnóstico de sensibilidade e especificidade dos métodos de rastreamentos azul de toluidina, lugol, citopatologia, teste salivar, imagens ópticas, exame clínico e autoexame;

b) Estudos com indivíduos expostos a fatores de risco ao câncer bucal, sendo eles o fumo e o álcool;

- c) Estudos com indivíduos que apresentem ou não ao exame clínico lesões intra bucais;
- d) Estudos com indivíduos maiores de 18 anos de ambos os sexos.

Critérios de Exclusão

- a) Estudos que não quantifiquem através de porcentagem os valores de sensibilidade e especificidade dos métodos de rastreio para o câncer bucal;
- b) Estudos que não tenham como desfecho câncer bucal ou displasia epitelial;
- c) Estudos realizados em animais ou in vitro;
- d) Estudos de outro idioma que não o idioma inglês e português.

Protocolo e Registro da Revisão Sistemática

O protocolo desta revisão sistemática foi elaborado e previamente realizado o seu registro no Registro Prospectivo de Revisões Sistemáticas (PROSPERO), obtendo como número CRD42018080078.

Estratégia de Busca

A estratégia de busca foi realizada por uma pesquisa nas bases de dados Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs e Bireme) e Scientific Electronic Library Online (Scielo) por publicações relevantes realizadas até 2017 seguindo os critérios de seleção previamente elucidados.

Os bancos de dados foram pesquisados utilizando os seguintes descritores para as seguintes bases de dados:

Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed

Foi pesquisado seguindo os descritores apresentados no Medical Subject Headings (MeSH) e incluíram: “Oral Cancer” OR “mouth neoplasm” AND “early detection of cancer” OR “diagnosis” AND “sensitivity test” OR “specificity test” OR “accuracy” AND “cytological techniques” OR “physical examination” OR “tolonium chloride” OR “optical imaging” OR “lugol's iodine” OR “saliva” OR “mouth self-examination”.

Scientific Eletronic Library Online (SciELO)

Foi pesquisado seguindo os descritores disponibilizados pelo Scielo e incluíram: “Câncer” AND “Oral” AND “testes”.

Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs e Bireme)

Foi pesquisado seguindo os descritores apresentados no Descritores de Ciência da Saúde (Decs) e incluíram: “cancer oral” OR “neoplasia bucal” AND “diagnóstico precoce” OR “detecção precoce” AND “sensibilidade e especificidade” OR “teste de especificidade” OR “teste de sensibilidade” AND “citologia” OR “exame físico” OR “azul de toluidina” OR “imagens ópticas” OR “lugol” OR “teste salivar” OR “autoexame”.

A estratégia de busca final realizada no Pubmed, Scielo e Bireme/Lilacs encontra-se apresentada a seguir:

* *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed*

((("mouth neoplasms"[MeSH Terms] OR ("mouth"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "mouth neoplasms"[All Fields] OR ("oral"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "oral cancer"[All Fields]) OR ("mouth neoplasms"[MeSH Terms] OR ("mouth"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "mouth neoplasms"[All Fields] OR ("mouth"[All Fields] AND

"neoplasm"[All Fields] OR "mouth neoplasm"[All Fields]) AND ("early detection of cancer"[MeSH Terms] OR ("early"[All Fields] AND "detection"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "early detection of cancer"[All Fields]) AND (((("sensitivity and specificity"[MeSH Terms] OR ("sensitivity"[All Fields] AND "specificity"[All Fields]) OR "sensitivity and specificity"[All Fields] OR "sensitivity"[All Fields]) AND ("research design"[MeSH Terms] OR ("research"[All Fields] AND "design"[All Fields]) OR "research design"[All Fields] OR "test"[All Fields])) OR (("sensitivity and specificity"[MeSH Terms] OR ("sensitivity"[All Fields] AND "specificity"[All Fields]) OR "sensitivity and specificity"[All Fields] OR "specificity"[All Fields]) AND ("research design"[MeSH Terms] OR ("research"[All Fields] AND "design"[All Fields]) OR "research design"[All Fields] OR "test"[All Fields]))) OR accuracy[All Fields]) AND (((((((("cytological techniques"[MeSH Terms] OR ("cytological"[All Fields] AND "techniques"[All Fields]) OR "cytological techniques"[All Fields]) OR ("physical examination"[MeSH Terms] OR ("physical"[All Fields] AND "examination"[All Fields]) OR "physical examination"[All Fields]) OR ("tolonium chloride"[MeSH Terms] OR ("tolonium"[All Fields] AND "chloride"[All Fields]) OR "tolonium chloride"[All Fields])) OR ("optical imaging"[MeSH Terms] OR ("optical"[All Fields] AND "imaging"[All Fields]) OR "optical imaging"[All Fields])) OR ("Lugol's solution"[Supplementary Concept] OR "Lugol's solution"[All Fields] OR "lugol's iodine"[All Fields])) OR ("saliva"[MeSH Terms] OR "saliva"[All Fields])) OR (("mouth"[MeSH Terms] OR "mouth"[All Fields]) AND ("self-examination"[MeSH Terms] OR "self-examination"[All Fields] OR ("self"[All Fields] AND "examination"[All Fields]) OR "self examination"[All Fields]))))

* *Scientific Eletronic Library Online (SciELO)*

cancer [Todos os índices] and oral [Todos os índices] and testes [Todos os índices]

* *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs)*

(tw:(cancer oral)) OR (tw:(neoplasia bucal)) AND (tw:(diagnostico precoce)) OR (tw:(detecção precoce)) AND (tw:(sensibilidade e especificidade)) OR (tw:(teste de sensibilidade)) OR (tw:(teste de especificidade)) AND (tw:(azul de toluidina)) OR (tw:(citologia)) OR (tw:(lugol)) OR (tw:(teste salivar)) OR (tw:(exame fisico)) OR (tw:(autoexame)) OR (tw:(imagens ópticas)) AND (instance:"regional")

Seleção dos Estudos

Os estudos foram selecionados através de 3 níveis de seleção:

Nível 1

Nesta etapa foi realizada uma primeira seleção baseada nos títulos dos estudos encontrados na busca inicial. Os mesmos foram avaliados de acordo com a presença das palavras-chaves relacionadas ao interesse da pesquisa conforme a questão PICO por dois revisores independentes (T.W.L. e N.B.D.).

Nível 2

Nesta etapa foi realizada a seleção baseada nos resumos dos estudos previamente selecionados no Nível 1. A avaliação do resumo foi mediante os critérios de inclusão e exclusão por dois revisores independentes (T.W.L. e N.B.D.).

Nível 3

Os estudos que passaram pela etapa anterior foram avaliados na íntegra, a partir da leitura completa do artigo. Os 2 avaliadores foram cegados das seguintes informações: nomes de autores, instituição e periódico. A avaliação dos artigos foi mediante os critérios de inclusão e exclusão mencionados.

Extração dos Dados

Para cada estudo incluído, os seguintes dados, quando disponíveis, foram extraído em um formulário padrão: nome dos autores, ano de publicação, país, média de idade dos participantes, grupo de estudo, número da amostra, método de rastreamento ou teste diagnóstico, desfecho do estudo, valores dos testes de sensibilidade, especificidade e acurácia.

Resultados

As buscas nas bases de dados encontraram no total 94 artigos. Após a exclusão de 2 artigos duplicados, foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão em todas as referências. Doze artigos foram selecionados para a leitura completa e extração dos dados, conforme pode ser visualizado no fluxograma da Figura 1 e na Tabela 1 a qual mostra como

foi realizado este processo de seleção.

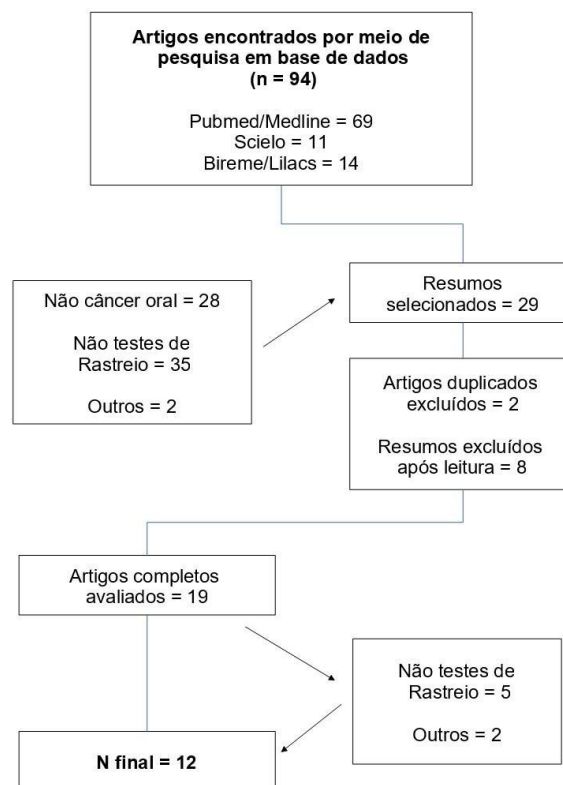


Figura 1. Fluxograma mostrando os resultados do processo de busca.

Tabela 1 - Busca e seleção dos estudos através dos níveis estabelecidos previamente na estratégia de busca no protocolo da revisão sistemática.

	PUBMED/MEDLINE	SCIELO	BIREME/LILACS	TOTAL
N Inicial	69	11	14	94
Seleção por Títulos				
Não câncer	12	2	1	15
Não bucal	11	1	1	13
Não rastreio	12	5	2	19
Não técnicas	16	-	-	16
Não Inglês/ Português	0	-	1	1
Revisões da Literatura		1		1
Final N	18	2	9	29
Seleção por Resumo				
Não câncer	0	-	-	0
Não bucal	0	-	-	0
Não rastreio	3	1	-	4
Não técnicas	1	-	-	1
Não Inglês/ Português	1	-	-	1
Revisões da Literatura	1	-	-	0
Final N	12	1	9	19
Seleção por Artigo				
Não câncer	-	-	-	0
Não bucal	-	-	1	1
Não rastreio	-	-	-	0
Não técnicas	-	-	1	1
Não Inglês/ Português	-	-	1	1
Revisões da Literatura	1	-	-	1
Não Teste de Acurácia	3	1	-	4
Duplicados	1	-	1	2
Final N	7	0	5	12

Os estudos foram encontrados com maior frequência nos países Estados Unidos, Alemanha, Índia e Brasil, aparecendo 2 estudos em cada um destes países. A média de idade dos participantes foi de 56 anos de ambos os sexos e o tamanho da amostra variou de 60 a 473 indivíduos entre os grupos testes e controles. A maior parte dos artigos tinha como grupo de estudo indivíduos com lesões suspeitas em cavidade bucal ou lesões potencialmente malignas como a leucoplasia e a eritroplasia, totalizando 8 dos 12 artigos, enquanto o outro grupo de estudo encontrado foi o carcinoma espinocelular.. O desfecho câncer de boca foi o mais prevalente entre os

estudos, sendo encontrado em 11 dos 12 artigos selecionados, conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 – Extração de dados após seleção dos artigos para leitura completa quanto a amostra, grupos de estudo e desfecho.

Autor/Ano da publicação	País	Número da Amostra	Grupo de Estudo	Desfecho
Navone et al, 2006	Itália	473	Lesões potencialmente malignas	Câncer Bucal
Yoon et al, 2007	Estados Unidos	145	Leucoplasia e eritroplasia	Câncer Bucal
Henrique et al, 2007	Brasil	100	Lesões em cavidade bucal	Câncer Bucal
Koch et al, 2011	Alemanha	135	Carcinoma espinocelular ou lesões suspeitas de CEC	Câncer Bucal
Awan et al, 2012	Inglaterra	92	Leucoplasia e eritroplasia	Displasia Epitelial
Fontes et al, 2013	Brasil	172	Lesões suspeitas em cavidade bucal	Câncer Bucal
Kammerer et al, 2013	Alemanha	70	Lesões suspeitas em cavidade bucal e Câncer Bucal	Câncer Bucal
Wang et al, 2013	China	60	Carcinoma espinocelular	Câncer Bucal
Chaudhry et al, 2016	Índia	100	Leucoplasia	Câncer Bucal
Shibahara et al, 2014	Japão	121	Carcinoma espinocelular ou leucoplasia	Câncer Bucal
Pereira et al, 2016	Estados Unidos	300	Carcinoma espinocelular	Câncer Bucal
Kaur et al, 2016	Índia	100	Lesões suspeitas em cavidade bucal	Câncer Bucal

Os métodos de diagnósticos presentes nestes estudos encontram-se detalhados na Tabela 3, apresentando como o mais encontrado a citopatologia esfoliativa e o azul de toluidina seguidamente. A citopatologia foi pesquisada como método de rastreio para o diagnóstico precoce do câncer de boca em 5 estudos, porém com diferentes tipos de análises após a coloração por Papanicolau. As análises presentes nestes estudos foram a citometria de DNA e classificação dos raspados (Classe I, II, III ou IV). Os valores de sensibilidade destes dois testes de diagnóstico variou de 23 a 94% e de 56 a 80% respectivamente. Já a especificidade variou de 32 a 100% e 56 a 82% respectivamente. Os outros testes, como marcadores salivares e imagens ópticas variaram de 74 a 94% a sensibilidade e 41 a 96% a especificidade.

Tabela 3 - Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia de cada estudo de acordo com o método de diagnóstico estudado.

Autor/Ano de publicação	Métodos de Diagnóstico	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
Navone et al, 2006	Citologia convencional X Citologia em liquid-based	85,7% X 95,1%	95,9% X 99%	--
Yoon et al, 2007	Expressão de pChk2 em Imuno-histoquímica	85,2%	74,2%	78,2%
Henrique et al, 2007	Azul de toluidina e Citologia	80,9 e 23,8%	32,7% e 82,7%	--
Koch et al, 2011	Citologia	88,5%	86,4%	--
Awan et al, 2012	Azul de toluidina	56,1%	56,9%	--
Fontes et al, 2013	Citologia	84%	100%	85,5%
Kammerer et al, 2013	Citometria de imagem de DNA em citologia	76%	100%	--
Wang et al, 2013	Biomarcadores salivares associados (Choline, Betaine, Pípecolinic acid, L-carnitine)	100%	96,7%	99,7%
Chaudhry et al, 2016	Quimioluminescência	84,84%	41,7%	70%
Shibahara et al, 2014	Endoscopia de banda estreita	92,3%	88,2%	--
Pereira et al, 2016	Biomarcador salivar CD44	74%	95%	--
Kaur et al, 2016	Citometria de imagem de DNA em citologia	92%	100%	96%

A maior parte dos estudos não apresentava o valor da acurácia do método de diagnóstico estudado, no entanto nos estudos em que esteve presente a citopatologia obteve acurácia de 85,5 e 96% e os biomarcadores salivares quando associados de 99,7%. Não foi encontrado na busca nenhum estudo de acurácia para o câncer bucal relacionado ao método de diagnóstico exame clínico, embora ele estivesse presente em todos os estudos na metodologia fazendo parte da seleção dos grupos de estudo (lesões suspeitas em cavidade bucal, lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular). Também não foi encontrado estudo relacionado a acurácia do método de diagnóstico Lugol. Todos os artigos consideraram o exame histopatológico com coloração em HE como padrão ouro final para o cálculo das medidas de sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos estudados.

Discussão

De acordo com os estudos analisados, observa-se a validade das diferentes metodologias empregadas, entretanto todos mostram algum grau de incerteza.

De acordo com estudo de Henrique et al, 2007 observa-se que o exame de maior sensibilidade foi o teste de azul de toluidina, com o índice de 80,9%, pois detectou os indivíduos sem câncer. Já a o exame de maior especificidade foi a citologia do raspado da lesão, com índice de 82,7% para a observação de células malignas. Considerando o emprego do azul de toluidina em leucoplasias com o intuito de detectar as lesões com displasia epitelial, Awan et al, 2012 constataram sua baixa especificidade (56,9%) e sensibilidade (56,1%). Já Chaudhry et al, 2016 concluíram em seu estudo que o azul de toluidina foi eficaz na identificação dos graus mais graves de displasia e discriminou as lesões de alto e baixo risco, apresentando especificidade de 88,23%. Os estudos anteriores utilizaram em média 50 indivíduos de forma transversal, estes são fatores que dificultam a ampliação da aplicabilidade mais segura para estes testes.

Koch et al, 2011 sugerem em seu estudo que a citopatologia tem uma precisão limitada para o diagnóstico precoce do carcinoma espinocelular com menos de 20mm de diâmetro, mas acredita que a citopatologia pode ser utilizada como uma ferramenta adicional no diagnóstico do câncer bucal. No estudo de Fontes et al, 2012 os resultados indicaram que o diagnóstico citopatológico teve boa concordância com o diagnóstico histopatológico, apresentando alta sensibilidade e especificidade e concluíram que a citopatologia pode ser usada como teste diagnóstico de células malignas.

Outros métodos de diagnóstico, menos frequentes, para o rastreamento do câncer bucal também foram encontrados na busca, como o marcador pChk2 utilizado na imuno-histoquímica. O estudo de Pereira et al, 2016 mostrou uma maior marcação de pChk2 em lesões leucoplásicas e/ou eritroplásicas que posteriormente houve transformação maligna em carcinoma espinocelular. Com isto, Pereira et al, 2016 concluem que o pChk2 pode ser um promissor biomarcador imuno-

histoquímico capaz de discriminar essas lesões com maior potencial de transformação maligna, independentemente da evidencia de atipia no epitélio oral.

Uma vez que o exame clínico sozinho não consegue distinguir entre lesões displásicas e não displásicas, testes como a quimioluminescência tem surgido a fim de auxiliar a distinguir qual leucoplasia teria maior potencial de malignidade. Chaudhry et al, 2016 relataram em seu estudo que a quimioluminescência identificou com precisão leucoplasias homogêneas e não homogêneas. No entanto, mostrou um número maior de falsos positivos e foi capaz de detectar principalmente displasia leve.

Estudos relacionados a marcadores salivares foram encontrados com diversos tipos de biomarcadores, como CD44, Choline, Betaine, Pipecolinic acid, L-carnitine. Wang et al, 2013 relatam que a associação de alguns biomarcadores podem produzir uma acurácia maior no rastreio do câncer bucal quando comparados de forma isolada.

Possivelmente a união de mais de um método de diagnóstico possa aumentar a acurácia para a detecção precoce do câncer de boca e estudos sobre o mesmo ainda se fazem necessário a fim de auxiliar na formulação de um protocolo clínico eficaz e aplicável em toda população.

Conclusão

O rastreio de lesões pontencialmente malignas e a detecção precoce do câncer bucal têm o potencial de reduzir o morbidade e mortalidade desta doença.

Nesta revisão sistemática o azul de toluidina e citopatologia apresentaram valores de sensibilidade e especificidade importantes na detecção de pacientes portadores de lesões com potencial de malignização e assim podem ser métodos auxiliares no diagnóstico precoce do câncer bucal.

A busca pelo aprimoramento de tecnologias através dos marcadores salivares e das imagens ópticas, como a quimioluminescência, podem ser caminhos promissores para o desenvolvimento futuro de métodos não invasivos e eficazes para diagnosticar de forma precoce o câncer bucal.

Estudos com tamanho amostral maior e realizados de forma multicêntrica são necessários para a análise e para a formulação de um protocolo clínico sensível e específico para o diagnóstico precoce do câncer bucal. No entanto, sugerimos que a união de métodos de diagnóstico como o azul de toluidina e a citopatologia por serem exames de fácil manipulação e de baixo custo possam ser de uso viável na rotina do Cirurgião Dentista.

Referências

1. Awan, K. H., Yang, Y. H., Morgan, P. R., & Warnakulasuriya, S. (2012). Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity – a clinical and histological assessment, (October 2011). <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01935.x>
2. Barnes, I.; Eveson, J.W.; Reichart, P., et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press, p. 177-179, 2005.
3. Calandro, T.I.I., Conde D.C., Campos I.T., Dias E.P. A utilização da videoroscopia na investigação de lesões orais. Rev. Bras. Odontol., v. 66, n. 2, p.170-6, jul./dez. 2009.
4. Cancado, R.P., Yurgel, I.S., Sant'ana Filho, M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. Oral Oncol., v. 37, n. 5, p. 446-454, 2001
5. Chaudhry, A., Manjunath, M., Ashwatappa, D., & Krishna, S. (2016). Comparison of chemiluminescence and toluidine blue in the diagnosis of dysplasia in leukoplakia: a cross-sectional study, 132–140.

6. Fontes, K. B. F. D. C., Cunha, K. S. G., Rodrigues, F. R., Silva, L. E. Da, & Dias, E. P. (2013). Concordance between cytopathology and incisional biopsy in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Brazilian Oral Research*, 27(2), 122–7.
7. Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology ;specimem adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Oral Med and Pathol*, v. 10, p. 115-122, 2005.
8. Henrique, G., Ramos, A., & Oliveira, B. V. De. (2007). Artigo Original Avaliação da citologia e do teste do azul de toluidina no diagnóstico dos tumores malignos da mucosa oral, (3), 27–29.
9. Instituto Nacional do Cancer (INCA), 2017. Regioes Anatomicas e Prognosticos do Cancer de Boca. Disponivel em: <http://www2.inca.gov.br> acesso em 28.04.2017.
10. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, Macdonald D.G., Bouquot J.E., Slootweg P.J. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumors: World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC press, p. 168-75, 2005.
11. Kämmerer, P. W., Koch, F. P., Santoro, M., Babaryka, G., Biesterfeld, S., Brieger, J., & Kunkel, M. (2013). Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy. *Oral Oncology*, 49(5), 420–426.
12. Kaur, M., & Handa, U. (2016). Evaluation of Brush Cytology and DNA Image Cytometry for the Detection of Cancer of the Oral Cavity, 44(3), 201–205. <http://doi.org/10.1002/dc>
13. Koch, F. P., Kunkel, M., Biesterfeld, S., & Wagner, W. (2011). Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study. *Clinical Oral Investigations*, 15(5), 763–769.

14. Lisieux, T., Calandro, L., & Dias, E. P. (2011). Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais, 196–199.
15. Mateus, F.O; Bozzetti, M.C. *Cancer Bucal no Brasil: revisão de literatura*. Lume UFRGS, 2008.
16. Moro, A., Nardo, F. Di, Boniello, R., Marianetti, T. M., ... Pelo, S. (2010). Autofluorescence and Early Detection of Mucosal Lesions in Patients at Risk for Oral Cancer, *21*(July 2015), 1899–1903.
17. Navone, R., Burlo, P., Pich, A., Pentenero, M., Broccoletti, R., Marsico, A., & Gandolfo, S. (2007). The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma, 356–360. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2006.00402.x>
18. Ogden, G.R, Cowpe J.G, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. *Acta Cytol*, v. 36, p. 706-710, 1992.
19. Oliveira, B. V. et al. Uso do colposcopio (estomatoscopio) para exame de lesões da cavidade oral. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoco*, v. 36, n. 2, p. 83-6, 2007.
20. Pereira, H. M.L., Reis, I. M., Reategui, E. P., Gordon, C., Saint-victor, S., Duncan, R., ... Franzmann, E. J. (2016). Risk Stratification System for Oral Cancer Screening, 445–456. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0200>
21. Preston G. R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-Lopez L, Macia-Colon G, Jaffe A, Berdasco M, Ili-Gangas C, Brebi-Mieville P, Fu Y, Engstrom C, Irizarri R, Esteller M, Westra W, Kock W, Califano J, S. D. (2012). NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissue and saliva. *Cancer Prev Res*, *4*(7), 1061–1072. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0006.NID2>
22. Sciubba, JJ. Oral cancer and its detection: history-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc* 2001;132(Suppl):12S–5S.

23. Segura, I. G., Secchi, D., Carrica, A., Barelo, R., Arbelo, D., Brunotto, M., & Zarate, A. M. (2015). Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques, 178–184.
24. Shibahara, T., Yamamoto, N., Yakushiji, T., Nomura, T., Sekine, R., Muramatsu, K., & Ohata, H. (2014). Narrow-band Imaging System with Magnifying Endoscopy for Early Oral Cancer. *Bull Tokyo Dent Coll*, 55(2), 87–94.
25. Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>
26. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 45 (2009) 309–316.
27. Yoon, A. J., Shen, J., Santella, R. M., Zegarelli, D. J., Chen, R., & Weinstein, I. B. (2007). Short Communication Activated Checkpoint Kinase 2 Expression and Risk for Oral Squamous Cell Carcinoma, 16(December), 2768–2773. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0659>

PESQUISA CIENTÍFICA

- Artigo 2 -

5. Artigo 2 - Auxiliary methods for the oral cancer screening

Submitted in International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Qualis A1 e Impact factor 2.164)

Abstract

Histologically, about 95% of malignant neoplasms are oral squamous cell carcinomas (JOHNSON et al., 2005) and still approximately 90% of malignant neoplasms of this region are detected in advanced stages of the disease (stages III and IV) and only 7% are in the phase of carcinoma in situ (HENRIQUE et al, 2007; MATHEUS et al, 2008; LISIEUX et al, 2011). Thus, a preventive approach is needed for oral cancer to include screening methods capable of early detection of this disease to reduce morbidity and mortality rates. The aim of the present study was to evaluate the use of the methods that improve the early diagnosis of OSCC. The sample was divided in Control Group (CG), Exposed Group (EG), Leukoplakia Group (LG) and Oral Squamous Cell Carcinoma Group (OSCCG). The photographic examination not showed difference in the leukoplakia or OSCC suspected lesion when compared to clinical examination. In the cases which the toluidine blue was positive, the result microscopic examination was epithelial dysplasia or OSCC. In the lesions where the toluidine blue was negative, the histopathology was hyperkeratosis and/or epithelial hyperplasia. Cytopathologic examination showed increased values of parabasal cells in OSCCG and EG, increased values of anucleated cells in the LG and decreased of the nucleus-to-cytoplasm ratio (N/C) in the OSCCG when compared others groups. The auxiliary methods evaluated in this study may increase the effect to screening lesions with different potential of malignancy, helping to improve early detection of OSCC.

Keyword: oral cancer, cytopathologic, toluidine blue.

Introduction

According to WHO (World Health Organization) there are an estimated 529,000 new cases of cancers of the oral cavity and pharynx each year, and more than 300,000 deaths for these pathology. Histologically, about 95% of malignant neoplasms are oral squamous cell carcinomas (OSCC). The etiology of this disease is a combination of extrinsic factors among these the exposure to tobacco and alcohol and intrinsic factors such as systemic conditions and heredity (JOHNSON et al., 2005). Oral carcinogenesis is characterized from cellular modifications, which initially may not be clinically detectable until visible tissue changes. (BARNES et al; 2005).

Visual clinical examination is the tool important of oral diagnosis (SCIUBBA, 2001). However still approximately 90% of malignant neoplasms of this region are detected in advanced stages of the disease (stages III and IV) and only 7% are in the phase of carcinoma in situ (HENRIQUE et al, 2007; MATHEUS et al, 2008; LISIEUX et al, 2011). Thus, a preventive approach is needed for oral cancer to include screening methods capable of early detection of this disease to reduce morbidity and mortality rates.

Toluidine blue dye, cytopathology and photographs analysis can be used as additional methods for the diagnosis in OSCC and potentially malignant disorders (AWAN et al, 2012, FONTES et al, 2013).

Toluidine blue dye (TBD) is a cationic metachromatic that selectively binds in vivo to acidic tissue components of DNA and RNA and also may be retained in intracellular spaces of the dysplastic epithelium. Its use in vivo is based on the fact that dysplastic cells contain quantitatively more nucleic acids than normal tissues. (AWAN et al, 2012).

The cytopathology is a promising tool for evaluating events associated with carcinogenesis, since it can be applied prior to a clinically detected lesion and obtained systematically in comparison to histological samples. A previous study using this method in combination with the

Papanicolaou staining detected changes in the epithelial maturation of leucoplakia oral mucosal cells exposed to carcinogens. (SILVA et al, 2017).

The amplification of images is being used to aid in clinical examination. Intraoral image capture detects lesions in difficult locations and demonstrates details about surfaces, subtleties of color, contours, and boundaries of changes (CALANDRO, 2009).

The aim of the present study was to evaluate the use of the methods that improve the early diagnosis of OSCC.

Materials e Methods

This is a cross-sectional, experimental and analytical study approved by the Research Committee of the Dentistry School and by the CEP of UFRGS under the number CAEEE 71681817.3.0000.5347 prior to the beginning of its execution. The individuals in this study were selected from the Dentistry School of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Inclusion criteria was female and male patients older than 18 years of age.

The sample was divided in the following groups:

(1) Control Group (CG): constituted by individuals who never smoked and did not consume up to 30g of alcohol for day.

(2) Exposed Group (EG): individuals who smoke at least 20 cigarettes with a filter for day for at least one year or more than 10 cigarettes with a filter for more than 10 years associated or not with alcohol consumption above 30g for day. (Self Health, WHO, 2010).

(3) Leukoplakia Group (LG): constituted by individuals who present clinically suspected lesions such as leukoplakia, erythroplakias or leukoeritroplakia.

(4) Oral Squamous Cell Carcinoma Group (OSCCG): constituted by individuals who present clinically suspected oral cancer.

At the first visit, the aims of the study were explained and after agreeing to participate, signed the Informed Consent Term. Patients who did not agree to participate in the study had their care guaranteed. Then, an interview was conducted and a questionnaire with habits and sociodemographic information was applied, followed by extraoral and intra-oral clinical examination.

Clinical Examination

The patient was examined in the dental chair by two independent specialist (T.W.L. and N.B.D.). The inspection was performed with using light from the reflector, odontoscope, tongue depressor and gauze for help into remove saliva and tongue traction. The examination sites sequence was: lips, oral mucous, alveolar ridges and gengive, hard and soft palate, tongue and floor of mouth. Patient was classified in the follow study groups CG, EG, LG or OSCCG confirmed after histopathological examination. This evaluation was register in a database in regarding a presence or absence of lesions.

Photographic Register

The individuals of the CG and EG had the sites (hard palate, bilateral oral mucous, bilateral border of tongue and floor of the mouth), according Figure 1; individuals who presented lesions have this lesion photographed with the CanonR EOS Digital Rebel 10.1 megapixel camera, EF 100 mm macro lens, MacroR Ring flash, f: 20 and 32, iso: 100 and 200 and exposure time 1 / 125s and 1: 250s. The photographs were taken during the initial clinical examination and after staining with toluidine blue. These images were stored in a database, blinded identification number for each individual. All the photography was evaluated for two independent specialist professionals (P.V.R. and M.G.O.).

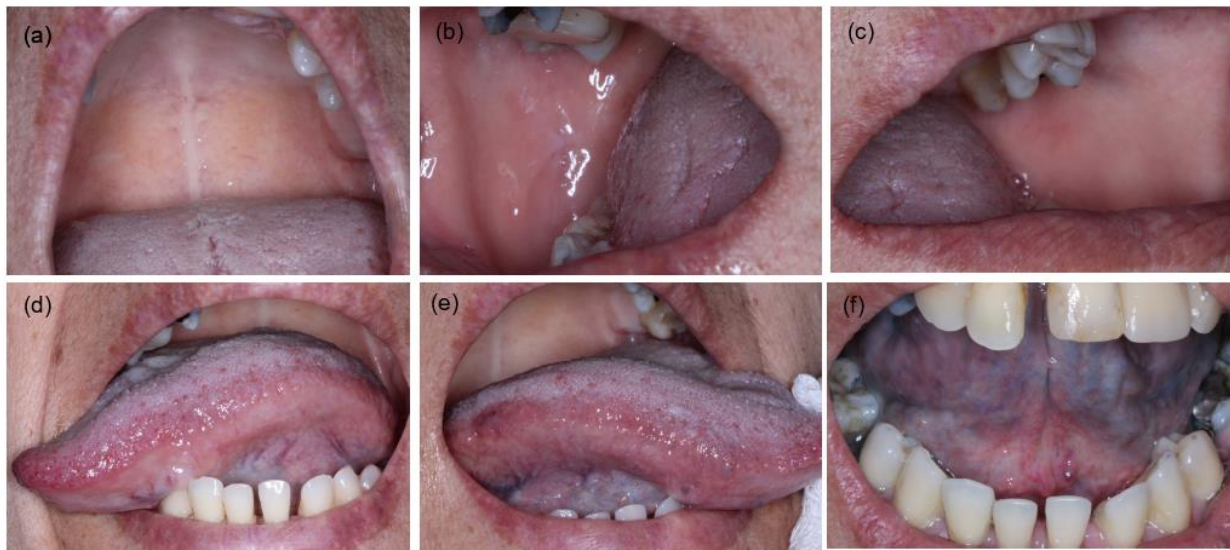


Figure 1 – Clinical photographs of the oral cavity performed during the photographic register stage of individuals from the control and exposed groups. (a) hard palate (b) mucosa jugal right side (c) jugal mucosa left side (d) tongue board left side (e) tongue board right side (f) floor of the mouth.

Toluidine Blue Test

After the initial photographic register, the toluidine blue test was performed. The application was performed with a cotton swab soaked in 1% acetic acid for 1 minute; application with cotton swab soaked in 1% toluidine blue for 1 minute; again the swab application soaked in acetic acid to remove excess toluidine blue. In CG and EG the test was performed in border of the tongue and floor of the mouth, in the LG and OSCCG was applied on the lesion. New photograph was taken to document the staining or not of the oral sites by toluidine blue. The staining was considered positive or negative according to LISIEUX, 2011.

Cytopathological Smears Collection

The smears were microscopic analyzed by the Papanicolaou test following the protocol proposed by Carvalho et al, 2002 observing the first 100 distended and non-overlapping epithelial cells under a binocular microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan, model CX41RF) at a 400 magnification. The analysis cytopathological was performed qualitative, quantitative and cytomorphic. .

Analysis Quantitative Cytopathological: The different cell types were classified into anucleated, superficial with nuclei, intermediate and parabasal.

Analysis Qualitative Cytopathological: The classification used follows the criteria described by Papanicolau and Traut (1943), described as Class 0 - Invalid sample (Insufficient or inadequate material for analysis); Class I - Normal Smear (the cells observed have a normal pattern throughout the smear); Class II - Normal Swab with Inflammation (the cells observed have normal pattern throughout the smear, but the presence of inflammatory); Class III - Suspected Swab - Dysplastic Changes (presence of cellular changes in at least two fields of the smear, described as discrete nuclear hyperchromasia, a slight increase in nuclear size and possible occurrence of cellular multinucleation); Class IV - Suggestive smear of Malinant Neoplasm - In Situ Carcinoma (presence of cellular changes in two or more fields that was a considerable number of atypical cells per smear, characterized by the presence of immature malignant cells, cells with bulky nuclei may be observed, multinucleation may be observed and the cytoplasm may contain vacuoles); Class V - Malignant Smear - Invasive Carcinoma (presence of cellular changes compatible with malignant neoplasia)

Analysis Cytomorphic: This performed according to Shaila et al 2016, that is, the same glass slide used to assess maturation pattern was used to measure 50 non-overlapping and well-distended cells. Images were captured using the Cell Sens software coupled to a digital optical

microscope. The Image J software was used to measure cellular diameter, nuclear diameter, and nuclear/cytoplasmic ratio. Cellular and nuclear diameters were measured drawing a line with a digital cursor from one axis to the other along both X and Y axes. Mean values of X and Y were considered as the final diameters.

Biopsy and Histopathological Examination

Individuals who exhibit lesions were submitted to a biopsy under local anesthesia. The obtained material was oriented with paper, fixed in neutral formalin buffered to 10% and processed by the routine to microscopy examination for inclusion in paraffin and staining hematoxylin and eosin (HE). The microscopy evaluation was performed by 2 independent examiners previously calibrated with KAPPA index > 80%. The histopathological diagnostic criteria was based in WHO, 2017.

Results

Sociodemographic and lesions characteristics are shown in Table 1. A total of 26 participants were included in the study, 15 male (57.7%) and 11 female (42.3%). A mean age was 55.9 years, detailed information of each group was in Table 1. In regarding of the sites, border of the tongue was more prevalent in leukoplakias, follow of oral mucous, palate, floor of the mouth, lower lip and gengive; in OSCCG border of the tongue was more affected than floor of the mouth. The data found for clinical examination, photographic register and toluidine blue test was in Table 2.

Table 1 - Sociodemographic data, habits and lesions characteristics of the CG, EG, LG and OSCCG.

	Control Group (n= 8)		Exposed Group (n= 2)		Leucoplakia Group (n=12)		OSCC Group (n=3)	
Age (mean \pmSD)	60.7 (\pm 4.7) years		49 (\pm 14.1) years		54.8 (\pm 12.7) years		59.3 (\pm 15.6) years	
Gender	Male	4 (50%)	Male	1 (50%)	Male	7 (53.8%)	Male	3 (100%)
	Female	4 (50%)	Female	1 (50%)	Female	6 (46.2%)	Female	0 (0%)
Frequency of smokers	--		100 %		61.5%		Ex-smokers	2 (66%)
Alcoholic Consumption	--		100 %		61.5%		2 (66%)	
Lesion Site	--		--		Border of tongue	3 (23%)	Border of tongue	1 (33.3%)
					Buccal mucosa	2 (15.4%)	tongue	2 (66.6%)
					Palate	2 (15.4%)	Floor of the Mouth	
					Floor of the Mouth	2 (15.4%)	Mouth	
					Lower lip	2 (15.4%)		
					Gum	2 (15.4%)		
Histopathological Diagnosis	--		--		Epithelial Dysplasia	1 (9%)	OSCC	3 (100%)
					Hyperkeratosis	7 (63.6%)		
					Hyperkeratosis and Epithelial Hyperplasia	3 (27.2%)		
					*2 cases with histopathological diagnosis			

Table 2 - Data for clinical examination, photographic register and blue toluidine test in the CG, EG, LG and OSCCG groups.

	Clinical Examination	Photographic Register	Toluidine Blue Test	Histopathological Examination
Control Group (8)	Positive- 0 Negative - 8	Positive – 0 Negative - 8	Positive – 0 Negative - 8	
Exposed Group (2)	Positive - 0 Negative - 2	Positive – 0 Negative - 2	Positive – 0 Negative - 2	
Leukoplakia Group (12)	Positive - 12 Negative - 0	Positive– 12 Negative - 0	Positive– 1 Negative - 11	Non - displastic - 11 Displastic - 1
OSCCG (3)	Positive - 3 Negative - 0	Positive – 3 Negative - 0	Positive– 3 Negative - 0	OSCCG - 3

The photographic examination not showed difference in the leukoplakia or OSCC suspected lesion when compared to clinical examination. However, was observed others lesion which were not observed in the clinical examination, as candidiasis and nicotinic stomatitis in the palate.

The photographic examination after application toluidine blue dye reveal different results when compared with photographic examination initial. The clinical performance of toluidine blue revealed sharp margin demarcation, according Figure 2.

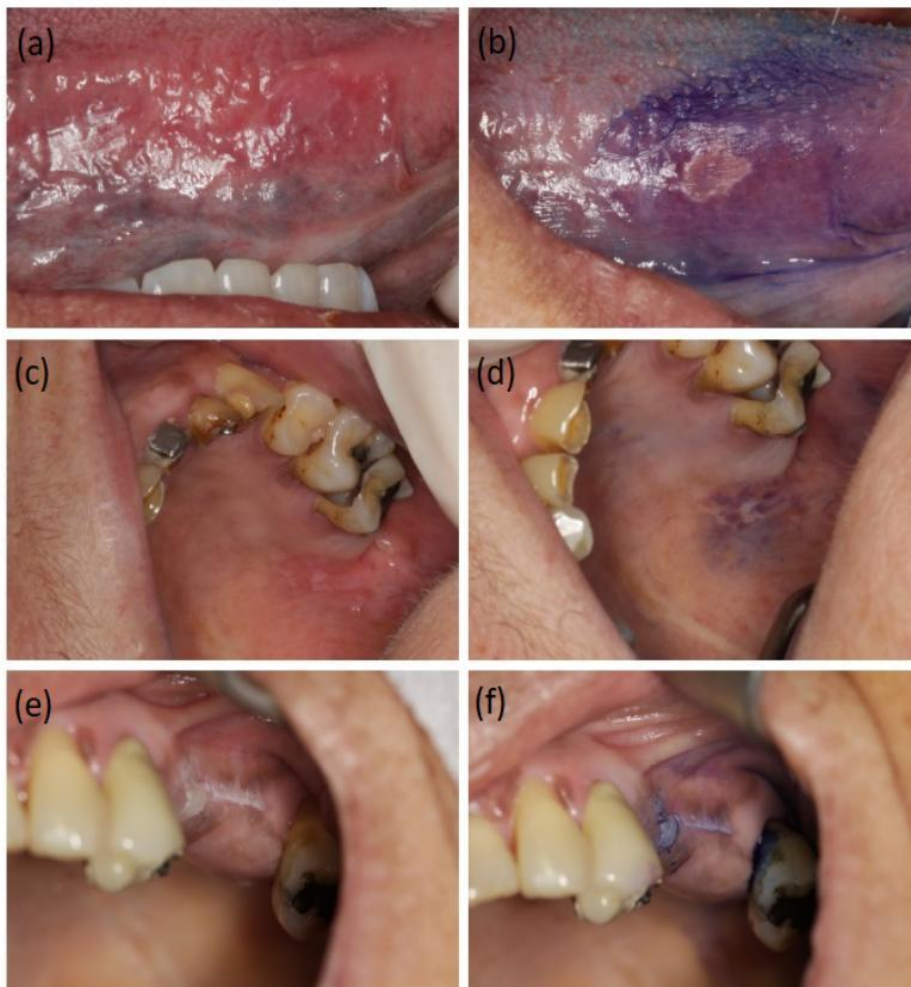


Figure 2 - Clinical photographs of the oral cavity performed during the photographic registration stage after the application of the blue toluidine dye in the leukoplasia group. (a) right side tongue with leukoplakic stain (b) right side tongue with demarcation of lesion borders by toluidine blue (c) soft palate with leucoplakic plaque (d) soft palate with demarcation of lesion borders by blue of toluidine (e) gageve with irregular leukoplakic plaque (f) gingiva with light pigmentation and demarcation of lesion borders by toluidine blue.

In the cases which the toluidine blue was positive, the result microscopic examination was epithelial dysplasia or OSCC. In the lesions where the toluidine blue was negative, the histopathology was hyperkeratosis and/or epithelial hyperplasia, according figure 3.

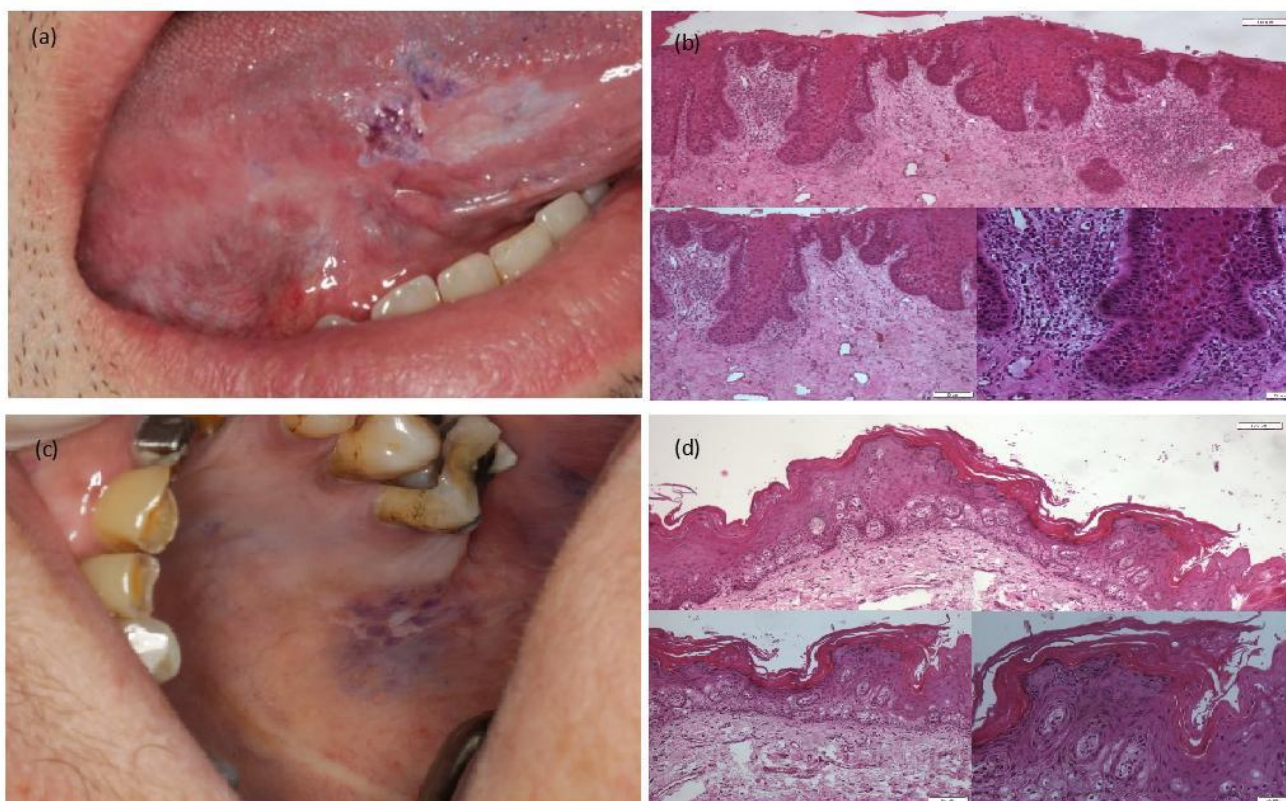
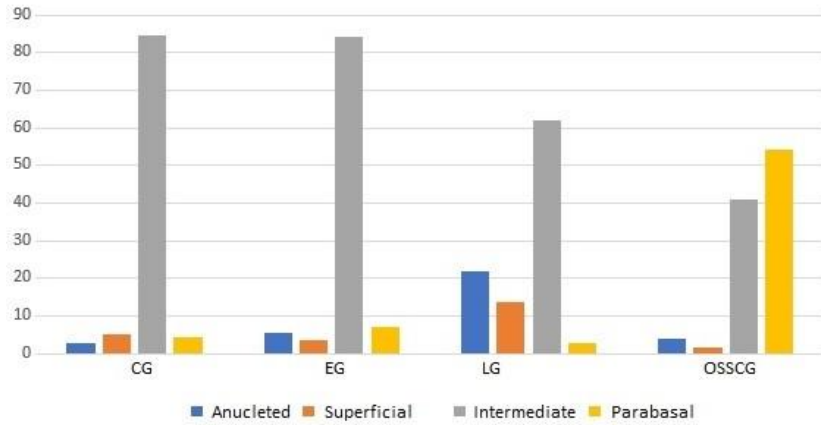
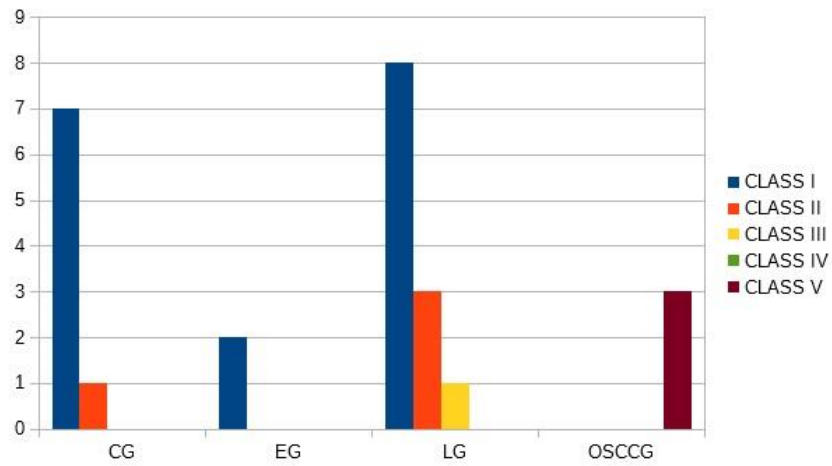


Figure 3 – (a) Clinical photograph border of tongue with leukoplakic lesion pigmented by toluidine blue (TBD positive) and (b) histopathological appearance of pleomorphism and cellular atypia, hyperchromatism, mitoses and structural alteration of the epithelium with diagnosis of epithelial dysplasia. (c) Clinical photograph of soft palate with leukoplakic plaque and demarcation of lesion borders by toluidine blue (TBD negative) and (d) histopathological appearance of hyperkeratosis and epithelial hyperplasia.

Cytopathologic examination considering, maturation pattern, showed increased values of parabasal cells in OSCCG and EG when compared with the CG. In the LG obtained increased values of anucleated cells when compared in the other groups, according Graphic 1. In the qualitative analysis was observed more prevalence of the class I in the control, exposed and leukoplakia group and high value of the class V for the group OSCC, according Graphic 2. The cytomorphometric analysis showed decreased of the nucleus-to-cytoplasm ratio (N/C) in the OSCCG (Table 3) when compared others groups.



Graphic 1 - Cytopathologic examination considering a maturation pattern.



Graphic 2 - Analysis Qualitative Cytopathological

Table 3 - Results of the cytomorphometric analysis .

	Cellular Diameter (μm)	Nuclear Diameter (μm)	Nuclear/Cytoplasmic Ratio (μm)
Control Group (8)	25.6	2.9	0,11
Exposed Group (2)	26	3.2	0,12
Leukoplakia Group (12)	22.3	2.7	0,12
OSCC Group (3)	18.3	4.1	0.22

One case was observed the malignant transformation of dysplasia into OSCC during this study. In the case the toluidine blue dye showed degree of pigmentation near. Cytopathologic examination reveal increased the number parabasal cells, decreased anucleated and superficial cells and cytomorphometric analyses showed decreased of the nucleus-to-cytoplasm ratio, according figure 4.

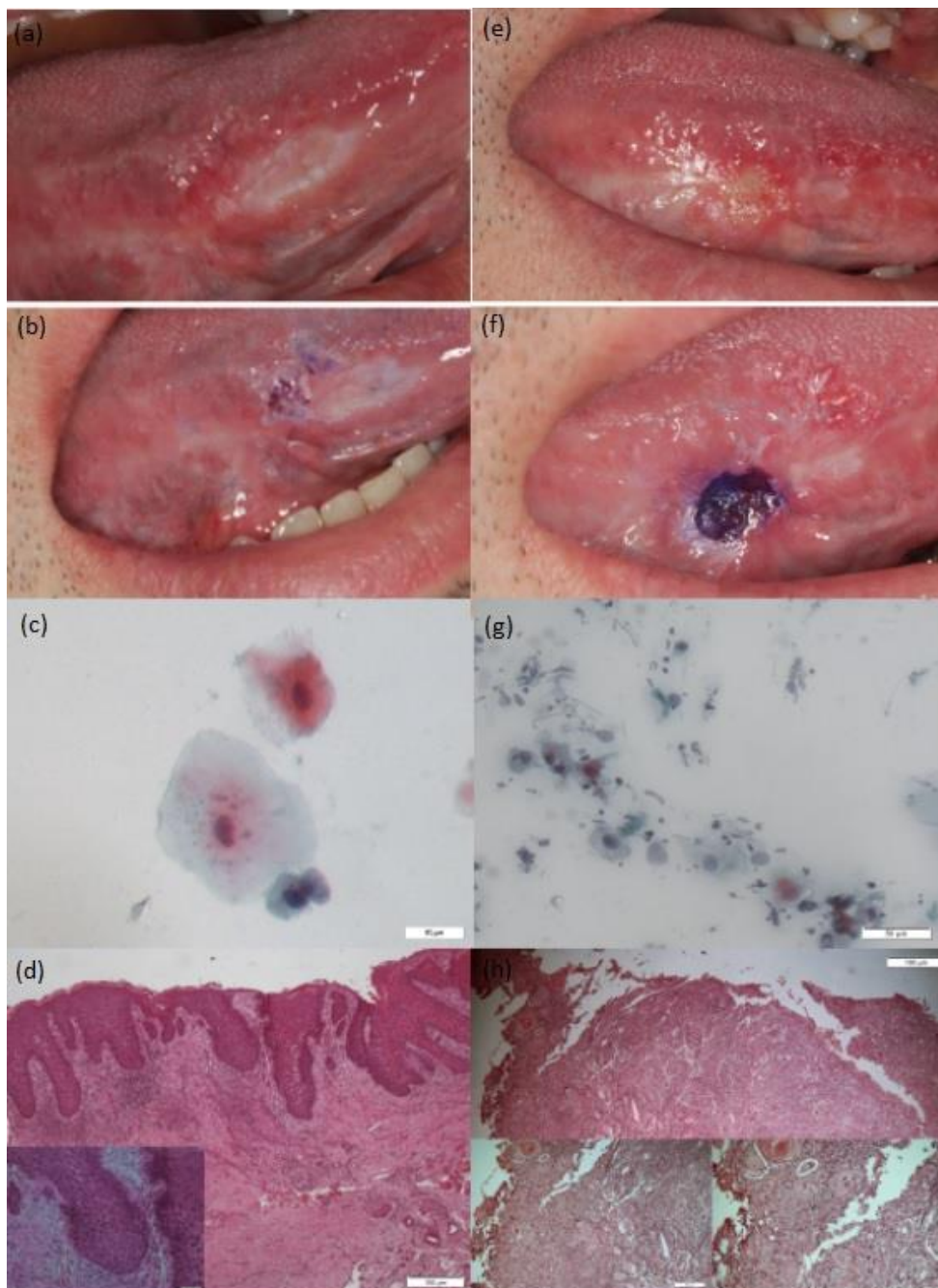


Figure 4 – Case was observed the malignant transformation of dysplasia into OSCC. (a) clinical photographic of lecoplastic lesion on border of the tongue. (b) pigmentation of the lesion by toluidine blue. (c) Smear on the lesion and cytological staining by Papanicolaou, showing basal and intermediate cells. (d) histological aspect showing a dysplastic pattern of the epithelium. (e) Clinical photographic of ulcerated lesion on border of the tongue. (f) pigmentation of the lesion by toluidine blue. (g) smear of lesion stained by Papanicolaou showing plomorphic cells with predominance of basal cells. (h) histological aspect showing malignant neoplastic cells invading the connective tissue.

Discussion

Based on the findings of this study the early diagnosis of OSCC can improve by using the described methods and their association can increase their accuracy.

Segura et al, 2015 related high prevalence (60%) in men with more than 45 years and the region most affected was border tongue in the group oral cancer. These factors corroborate with data found in this study that age mean was 59.3 years old between all the groups and most affected site was border of the tongue followed by floor of the mouth in the OSCCG. In contrast, Segura et al, 2015 showed more prevalence in the group leukoplakia for the women (86%) with the site most affected was border of the tongue while this study not found difference prevalence between gender in the LG.

Calandro et al, 2009 related that videoroscopy aids the visualization of incipient oral lesions with little thickness and small size. In the study the photographic analysis showed others lesions than no-leukoplastic that no observed before in the clinical examination. This can be explained by the presence of areas of the oral cavity with difficult visualization through clinical examination and the increase provided by lenses may present greater detail of the examined areas. However, to the leukoplasias between clinical and photographic examination did not show difference. This fact elucidates that the clinical examination in the search for potentially malignant lesions is still an examination of great importance. Another factor evaluated during the photographic examination was that the flash considered the confusion factor, cause the produced image was white difficulting the analysis.

The intensity of the coloration by the blue of toluidine was depending on the alteration degree of the epithelial surface. In non-displastic lesions was observed a tenuous coloration with predominance of the border lesion. In the epithelial dysplasia and in the OSCC the coloration and more evident due to the strong affinity of the dye with proliferative activity in these areas. Su et al, 2010 concluded in their study that using toluidine blue as an adjunctive tool for visual screening to

detect significantly more leukoplakia among high-risk individuals with habits of cigarette smoking chewing as compared with visual screening alone. In this study, the non-dysplastic leukoplakias were negatively labeled by toluidine blue inside lesion and positive on the lesion borders. However, to extrapolate that toluidine blue is a potent auxiliary method to differentiate leukoplakia between dysplastic and non-dysplastic, a larger sample is needed. Therefore, we suggest that toluidine blue may be an important means for the demarcation of the biopsy area, because the borders making more visible with your application as well as OSCC and leukoplakia, facilitating the choice of biopsy site.

The analysis of quantitative cytopathology showed the increased values of parabasal cells of the OSCCG and of the anucleated cells in the LG when compared with the CG, corroborating with Silva et al, 2017 and Burzlaff et al, 2007 that related higher percentage of anucleated cells in the leukoplakias and the higher percentage of the cells of the deeper layers in malignant samples. The increase of the anucleated cells in the leukoplakia can be explained by the higher keratinization of the tissue. The gradual decrease in the number of intermediate cells in the EG, LG and OSCCG may be of the necessary cellular due a balance between the layers of the epithelium, because at the expense of in the OSCCG there was an increase of the number of basal cells; in the LG of the anucleated cells and EG of the superficial cells when compared to the control group.

The qualitative cytopathology analysis not presented difference between control, exposed and leukoplakia group. One limitation of this evaluate is that the leukoplakia smears were classified in class I (normal tissue), but the diagnosis histopathological was hyperkeratosis, because the sample was not presented cell alterations as hyperchromatism and/or binucleated cells, mitosis. Segura et al reported that both leukoplakia and oral cancer group observed prevalence of 90% in the class II.

Cytomorphometry showed that nuclear area (NA) and cytoplasmic area (CA) was similar in the control and exposed groups. It this can be explicated of the greater number of intermediate cells when compared with the other groups. However the group OSCC showed decreased nucleus-

cytoplasm area ratio (NA/CA) that can be explicated of increased of the number parabasal cells. Weigum et al, 2010 analyzed 52 brush cytology for cytomorphometry and showed that a nuclear area was significantly increased in dysplastic and invasive OSCC versus healthy control epithelium.

The case reported during this study of transformation of dysplasia in early-stage OSCC elucidated that the use of toluidine blue assisted in the demarcation of biopsy areas and that a alteration of cytopathologic patterns is compatible with altered disease status. The use of these methods in association is possible to improve the oral cancer screening with the identification in oral mucous changes and monitoring at risk patients and potentially malignant lesions.

Conclusion

The auxiliary methods evaluated in this study can make more effective the screening lesions with different potential of malignancy, helping to improve early detection of OSCC. However, visual examination is still an important clinical tool for the prevention of oral cancer.

This study suggest that toluidine blue can be more utilized for the demarcation of the biopsy area, contributing for the screening of premalignant lesions together with the histopathological.

The cytopathology analyses through the values of the number parabasal cells and ratio N/C can be evaluation standards for the development of alteration on the mucosa oral in the exposed individuals, since higher percentage of the parabasal cells can increased the chance of occurring epithelial alteration suggestive of premalignancy.

Referências

1. Awan KH, Yang YH, Morgan PR, Warnakulasuriya S. Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity – a clinical and histological assessment. *Oral Diseases*, 2012;

2. Barnes L.; Eveson, J.W.; Reichart, P., et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press, p. 177-179, 2005;
3. Burzlaff, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*, v. 18, n. 6, p. 367-375, 2007;
4. Calandro, T.I.I., Conde D.C., Campos I.T., Dias E.P. A utilização da videoroscopia na investigação de lesões orais. *Rev. Bras. Odontol.*, v. 66, n. 2, p.170-6, jul./dez. 2009.
5. Carvalho G. *Citologia Oral*. Rio de Janeiro: Editora Revinter Ltda; 2002.
6. Fontes, K. B. F. D. C., Cunha, K. S. G., Rodrigues, F. R., Silva, L. E. Da, & Dias, E. P. (2013). Concordance between cytopathology and incisional biopsy in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Brazilian Oral Research*, 27(2), 122 - 7.
7. Henrique, G., Ramos, A., & Oliveira, B. V. De. (2007). Artigo Original Avaliação da citologia e do teste do azul de toluidina no diagnóstico dos tumores malignos da mucosa oral, (3), 27 - 29.
8. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, Macdonald D.G., Bouquot J.E., Slootweg P.J. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumors: World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC press, p. 168-75, 2005.
9. Lisieux, T., Calandro, L., & Dias, E. P. (2011). Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais, 196 - 199.
10. Mateus, F.O; Bozzetti, M.C. *Cancer Bucal no Brasil: revisão de literatura*. Lume UFRGS, 2008.
11. Papanicolau, G.N. and Traut, H.F. (1943) *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. The Commonwealth Fund, New York.

12. Sciubba, JJ. Oral cancer and its detection: history-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc* 2001;132(Suppl):12S – 5S.
13. Segura, I. G., Secchi, D., Carrica, A., Barello, R., Arbelo, D., Brunotto, M., & Zarate, A. M. (2015). Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques, 178 – 184.
14. Shaila, M., Shetty, P., & Pai, P. (2016). A new approach to exfoliative cytology: A comparative cytomorphometric study. *Indian Journal of Cancer*, 53(1), 193.
15. da Silva, A. D., Daroit, N. B., Cardoso, F. B., Laureano, N. K., Maraschin, B. J., Bündrich, L., Rados, P. V. (2018). Epithelial oral mucosal cells: Do they behave differently when exposed to oral carcinogens? *Cytopathology*, 29(1), 49 – 57.
16. Su, W. W.-Y., Yen, A. M.-F., Chiu, S. Y.-H., & Chen, T. H.-H. (2010). A community-based RCT for oral cancer screening with toluidine blue. *Journal of Dental Research*, 89(9), 933 – 7.
17. Weigum, S. E., Floriano, P. N., Redding, S. W., Yeh, C., Stephen, D., McGuff, H. S., ... Mcdevitt, J. T. (2011). *Cytology*, 3(4), 518 – 528.
18. World Health Organization, 2017. Classification head and neck tumours.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por tecnologias que auxiliem no diagnóstico de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular em estágios iniciais é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de prevenção para diagnóstico precoce do câncer bucal.

Os estudos existentes na literatura, como pudemos observar na revisão sistemática realizada, versam sobre variados métodos de diagnóstico, como biomarcadores salivares, corantes teciduais (azul de toluidina), imagens ópticas e citopatologia. No entanto, nenhum método demonstrou ainda maior efetividade do que o exame clínico seguido da biópsia e o exame histopatológico como padrão definitivo para o diagnóstico das lesões displásicas ou carcinoma espinocelular.

Os biomarcadores salivares, as imagens ópticas e o azul de toluidina demonstraram ser métodos promissores para estudos longitudinais sobre a sua eficácia e padrão de monitoramento de lesões com potencial de malignização. Entretanto, não foi verificado ainda um padrão confiável para estabelecimento de um protocolo clínico capaz de detectar as lesões com maior risco de malignização ou até mesmo malignas. Através do estudo do artigo 2 podemos sugerir que o azul de toluidina pode ser utilizado como um método auxiliar em conjunto com o ato cirúrgico de biópsia, pois o mesmo possibilita melhor demarcação das margens da lesão, facilitando a eleição da área de biópsia. Fato que corrobora com Awan et al, 2012 que constataram baixa especificidade e sensibilidade do azul de toluidina em leucoplasias com o intuito de detectar as lesões com displasia epitelial e não displásicas. No entanto, assim como no estudo de Chaudhry et al, 2016 que concluíram que o azul de toluidina foi eficaz na identificação dos graus mais graves de displasia, no artigo 2 foi constatado que o azul de toluidina foi eficaz na marcação dos carcinomas espinocelulares, pois nestes casos a marcação do azul de toluidina foi considerada intensa.

Dentre as lesões potencialmente malignas (leucoplasias e/ou eritroplasias) a distinção clínica entre as lesões que são displásicas e não displásicas tem um papel importante para o controle dos indivíduos pertencentes ao grupo de risco. Uma vez que métodos de diagnóstico menos invasivos que auxiliem na diferenciação destas duas entidades podem contribuir para a menor morbidade do teste e maior adesão destes indivíduos aos exames de controle e acompanhamento periódico.

Tanto na revisão sistemática (artigo 1) quanto no estudo clínico transversal (artigo 2) a citopatologia aparece como um método que pode contribuir no rastreamento de lesões malignas. Na revisão sistemática a citopatologia apresentou sensibilidade e especificidades altas, com valores de 80 à 100%. No nosso estudo clínico transversal através do raspado sobre as lesões foi possível verificar que quanto maior o potencial de malignização da lesão, maior o número de células parabasais presentes. Além disso, a razão núcleo citoplasma também demonstrou ser menor no carcinoma e nas displasias do que nas leucoplasias não displásicas. Tal fato pode sinalizar um padrão citopatológico para formulação de um protocolo de acompanhamento para as leucoplasias.

Sugerimos que estudos longitudinais, com grande amostragem e de forma multicêntrica a respeito da acurácia da citopatologia através dos padrões quantitativos (número de células anucleadas, superficiais, intermediárias e parabasais), qualitativos (classificação do raspado em I, II, III e IV) e da citomorfometria podem contribuir para a formulação de um protocolo clínico de monitoramento dos indivíduos de risco. Sugerimos o azul de toluidina para uso na demarcação da área de eleição da biópsia quando necessário o exame histopatológico para o diagnóstico definitivo. Porém, o exame clínico através de exames periódicos permanece sendo soberano para o rastreamento do câncer bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS

1. Allegra E., Lombardo N., Puzzo L., Garozzo A. The usefulness of toluidine staining as a diagnostic tool for precancerous and cancerous oropharyngeal and oral cavity lesions. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* v.29, P.187–190, 2009.
2. Awan, K. H., Yang, Y. H., Morgan, P. R., & Warnakulasuriya, S. (2012). Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity – a clinical and histological assessment, (October 2011).
3. Barnes, I.; Eveson, J.W.; Reichart, P., et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press, p. 177-179, 2005.
4. Burzlaff, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*, v. 18, n. 6, p. 367-375, 2007;
5. Calandro, T.I.L., Conde D.C., Campos I.T., Dias E.P. A utilização da videoscopia na investigação de lesões orais. *Rev. Bras. Odontol.*, v. 66, n. 2, p.170-6, jul./dez. 2009.
6. Cancado, R.P., Yurgel, I.S., Sant'ana Filho, M. Evaluation of Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa. Effect of Smoking. *Oral Oncol.*, v. 37, n. 5, p. 446-454, 2001
7. Carvalho G. *Citologia Oral*. Rio de Janeiro: Editora Revinter Ltda; 2002.
8. Chaudhry, A., Manjunath, M., Ashwatappa, D., & Krishna, S. (2016). Comparison of chemiluminescence and toluidine blue in the diagnosis of dysplasia in leukoplakia: a cross-sectional study, 132–140.
9. Epstein J.B., Sciubba J., Silverman S. JR., Sroussi H.Y. Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: Continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck* V. 29, P.948–958, 2007.

10. Fontes, K. B. F. D. C., Cunha, K. S. G., Rodrigues, F. R., Silva, L. E. Da, & Dias, E. P. (2013). Concordance between cytopathology and incisional biopsy in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Brazilian Oral Research*, 27(2), 122–7.
11. Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology ;specimem adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Oral Med and Pathol*, v. 10, p. 115-122, 2005.
12. Henrique, G., Ramos, A., & Oliveira, B. V. De. (2007). Artigo Original Avaliação da citologia e do teste do azul de toluidina no diagnóstico dos tumores malignos da mucosa oral, (3), 27–29.
13. Instituto Nacional do Cancer (INCA), 2017. Regioes Anatomicas e Prognosticos do Cancer de Boca. Disponivel em: <http://www2.inca.gov.br> acesso em 28.04.2017.
14. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, Macdonald D.G., Bouquot J.E., Slootweg P.J. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumors: World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC press, p. 168-75, 2005.
15. Kämmerer, P. W., Koch, F. P., Santoro, M., Babaryka, G., Biesterfeld, S., Brieger, J., & Kunkel, M. (2013). Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy. *Oral Oncology*, 49(5), 420–426.
16. Kaur, M., & Handa, U. (2016). Evaluation of Brush Cytology and DNA Image Cytometry for the Detection of Cancer of the Oral Cavity, 44(3), 201–205. <http://doi.org/10.1002/dc>
17. Koch, F. P., Kunkel, M., Biesterfeld, S., & Wagner, W. (2011). Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study. *Clinical Oral Investigations*, 15(5), 763–769.

19. Lisieux, T., Calandro, L., & Dias, E. P. (2011). Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais, 196–199.
20. MacAulay, C., Poh, C. F., Guillaud, M., Michele Williams, P., Laronde, D. M., Zhang, L., & Rosin, M. P. (2012). High throughput image cytometry for detection of suspicious lesions in the oral cavity. *Journal of Biomedical Optics*, 17(8), 860041–8600411.
21. Mateus, F.O; Bozzetti, M.C. Cancer Bucal no Brasil: revisão de literatura. Lume UFRGS, 2008.
22. Moro, A., Nardo, F. Di, Boniello, R., Marianetti, T. M., ... Pelo, S. (2010). Autofluorescence and Early Detection of Mucosal Lesions in Patients at Risk for Oral Cancer, 21(July 2015), 1899–1903.
23. Navone, R., Burlo, P., Pich, A., Pentenero, M., Broccoletti, R., Marsico, A., & Gandolfo, S. (2007). The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma, 356–360.
24. Neville, B.W. et al. Patologia Oral e Maxilofacial, 3^a ed Elsevier: Rio de Janeiro, 2009.
25. Ogden, G.R, Cowpe J.G, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. *Acta Cytol*, v. 36, p. 706-710, 1992.
26. Oliveira, B. V. et al. Uso do colposcopio (estomatoscopio) para exame de lesões da cavidade oral. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoco*, v. 36, n. 2, p. 83-6, 2007.
27. Omar, E. (2015). Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma - a systematic review. *Head and Face Medicine*, 11(1).
28. Papanicolau, G.N. and Traut, H.F. (1943) Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear. The Commonwealth Fund, New York.
29. Pereira, H. M.L., Reis, I. M., Reategui, E. P., Gordon, C., Saint-victor, S., Duncan, R., ... Franzmann, E. J. (2016). Risk Stratification System for Oral Cancer Screening, 445–456.

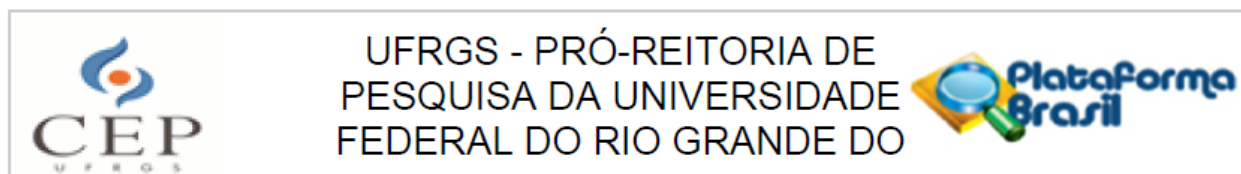
30. Preston G. R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-Lopez L, Macia-Colon G, Jaffe A, Berdasco M, Ili-Gangas C, Brebi-Mieville P, Fu Y, Engstrom C, Irizarri R, Esteller M, Westra W, Kock W, Califano J, S. D. (2012). NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissue and saliva. *Cancer Prev Res*, 4(7), 1061–1072.
31. Reychler, H., & Weynand, B. (2010). Dépistage et diagnostic des lésions précancéreuses de la muqueuse orale. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*, 111(4), 203–207.
32. Rosin, M.P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*, v. 6, n. 2, p. 357-62, 2000.
33. Sartini, D., Pozzi, V., Renzi, E., Morganti, S., Rocchetti, R., Rubini, C., ... Emanuelli, M. (2012). Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: Basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease. *Biological Chemistry*, 393(6), 505–511. <http://doi.org/10.1515/hsz-2012-0112>
34. Sciubba, JJ. Oral cancer and its detection: history-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc* 2001;132(Suppl):12S–5S.
35. Segura, I. G., Secchi, D., Carrica, A., Barello, R., Arbelo, D., Brunotto, M., & Zarate, A. M. (2015). Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques, 178–184.
36. Shaila, M., Shetty, P., & Pai, P. (2016). A new approach to exfoliative cytology: A comparative cytomorphometric study. *Indian Journal of Cancer*, 53(1), 193.
37. Shibahara, T., Yamamoto, N., Yakushiji, T., Nomura, T., Sekine, R., Muramatsu, K., & Ohata, H. (2014). Narrow-band Imaging System with Magnifying Endoscopy for Early Oral Cancer. *Bull Tokyo Dent Coll*, 55(2), 87–94.

38. da Silva, A. D., Daroit, N. B., Cardoso, F. B., Laureano, N. K., Maraschin, B. J., Bündrich, L., Rados, P. V. (2018). Epithelial oral mucosal cells: Do they behave differently when exposed to oral carcinogens? *Cytopathology*, 29(1), 49–57. <http://doi.org/10.1111/cyt.12468>
39. Su, W. W.-Y., Yen, A. M.-F., Chiu, S. Y.-H., & Chen, T. H.-H. (2010). A community-based RCT for oral cancer screening with toluidine blue. *Journal of Dental Research*, 89(9), 933–7.
40. Weigum, S. E., Floriano, P. N., Redding, S. W., Yeh, C., Stephen, D., Mcguff, H. S., ... Mcdevitt, J. T. (2011). *Cytology*, 3(4), 518 – 528.
41. Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>
42. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 45 (2009) 309–316.
43. World Health Organization, 2017. Classification head and neck tumours.
44. Yoon, A. J., Shen, J., Santella, R. M., Zegarelli, D. J., Chen, R., & Weinstein, I. B. (2007). Short Communication Activated Checkpoint Kinase 2 Expression and Risk for Oral Squamous Cell Carcinoma, *16*(December), 2768 – 2773. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0659>
45. Zhang, Y., Chen, R., Xu, L., Ning, Y., Xie, S., & Zhang, G.-J. (2015). Silicon Nanowire Biosensor for Highly Sensitive and Multiplexed Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma Biomarkers in Saliva. *Analytical Sciences*, 31(February), 73 – 78.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Parecer de Aprovação no Comitê de Ética - Artigo 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal

Pesquisador: Pantelis Varvaki Rados

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 71681817.3.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.421.109

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Dezembro de 2017

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo Avaliar a aplicabilidade clínica de testes de rastreio em pacientes de risco para o câncer bucal.

Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá sua boca fotografada, células coletadas de sua boca com uma escova e se tiver lesão em boca, esta será corada com corantes em azul. Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes da coleta das células bucais, em que a região poderá ficar sensível, dolorida. As áreas coradas com o azul de toluidina poderão ficar coradas por algumas horas, porém a mesma coloração desaparecerá por completo posteriormente. 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, _____ (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.

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

Telefone: _____

O pesquisador responsável por este estudo é Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e a aluna reponsável: Tatiana Wannmacher Lepper, telefone para contato: (51)33083629 do professor responsável.

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 será aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone: 51.33083629

8.3. Ficha Entrevista - Anamnese

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

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

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

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

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

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

1.10. Você estudou até:

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

6 () superior incompleto 7 () superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

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

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

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

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

2.4. Você usa algum produto para bochecho

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

2.5. Com que frequência

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

2.6. Quando iniciou o uso?

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

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

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

3. Fatores comportamentais

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

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos_____

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

3.5 Quantos cigarros por dia_____

3.6 Por quantos anos_____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar_____

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

nunca

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

4() nunca

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

5() outros_____

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

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

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

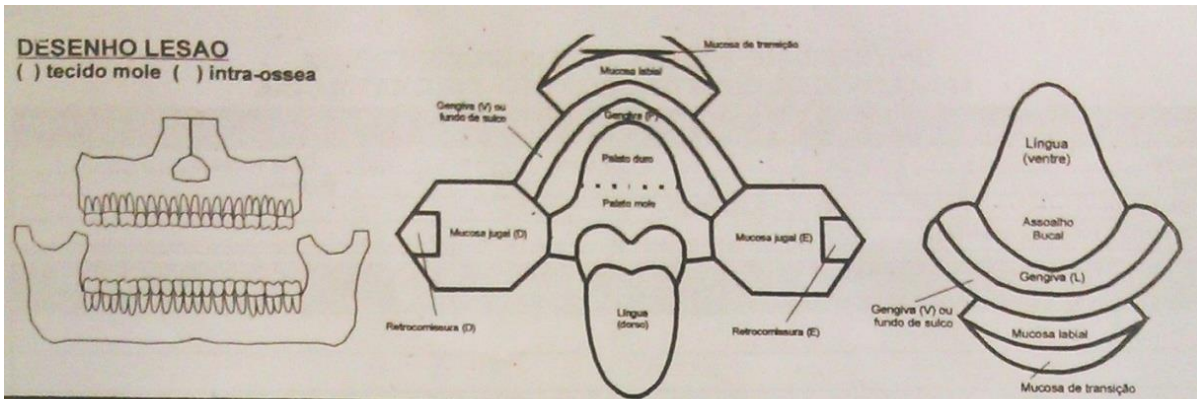
4.4. Artrite () () ()

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

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

4.7. Qual ?_____

8.3. Ficha de Exame Clínico



Descrição da lesão / lesões

Lesão	L1	L2	L3
Tamanho (cm)			
Lesão fundamental			
Cor			
Consistência			
Duração			
Tratamento prévio			
Diagnóstico clínico			
Conduta			

Descrição da lesão / lesões

Lesão	L4	L5	L6
Tamanho (cm)			
Lesão fundamental			
Cor			
Consistência			
Duração			
Tratamento prévio			
Diagnóstico clínico			
Conduta			

Exames Complementares/Observações

Data	Descrição (Exame e resultado)

8.5. Técnica de Papanicolau Modificado*

- Alcool absoluto por 15 segundos (quatro vezes)
- Agua destilada por 15 segundos
- Hematoxilina de Harris com 0,5g de Acido Acetico Glacial durante 1 minuto
- Descansar em papel absorvente
- Levar em agua corrente e remover somente quando esta tiver aspecto limpido
- Carbonato de Litio** durante 15 segundos
- Alcool por 15 segundos (aplicar quatro vezes)
- Orange G6 durante 1 minuto com Acido Fosfotungstico (0,15g/l)
- Descansar em papel absorvente
- Alcool por 15 segundos (por duas vezes)
- Policromo*** durante 3 minutos
- Descansar em papel absorvente
- Alcool por 15 segundos (por tres vezes)
- Descansar em papel absorvente
- Xilol por 5 minutos (2x) seguido por Montagem com Balsamo do Canada

*Técnica preconizada por Papanicolaou, 1941 e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clinicas de Porto Alegre, utilizada pelo Laboratório de Patologia da UFRGS. ** O carbonato de litio e utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solucao é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de agua destilada.

** Composição: 200ml de corante EA36 e 600ml de corante EA65 (proporcao 3:1).