

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

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOPATOLÓGICAS DA MUCOSA  
BUCAL CLINICAMENTE NORMAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS**

**Paula Luce Bohrer**

**Porto Alegre, Agosto de 2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOPATOLÓGICAS DA MUCOSA  
BUCAL CLINICAMENTE NORMAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Odontologia na área de Patologia Bucal

PAULA LUCE BOHRER

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, Agosto de 2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B677a

Bohrer, Paula Luce

Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente Normal exposta a carcinógenos / Paula Luce Bohrer ; Orientação de Pantelis Varvaki Rados. – Porto Alegre, 2003.  
94 f. : il.

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

1. Mucosa bucal normal 2. Citopatologia 3. Micronúcleos 4. Câncer de boca I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia II. Título

CDU 616.31

Bibliotecária: Eloisa Futuro Pfitscher

CRB 10/598

*Não somos o que deveríamos ser; não somos o que queríamos ser;  
não somos o que iremos ser; mas, graças a Deus, não somos o que éramos".*

*Martin Luther King*

Aos meus pais, Paulo e Lúcia,  
que nunca mediram esforços em detrimento da minha educação;  
ao meu avô, Flávio Luce, que sempre lutou pela prevenção em Odontologia;  
à minha avó ( *in memoriam*), Maria Thereza Feijó Luce, exemplo na área de  
educação, que infelizmente não pôde concluir seu curso de mestrado;  
à minha avó, Edith Bohrer, que desde cedo contribuiu com a minha educação,  
dedico essa dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

A todas as pessoas que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Em especial aos meus pais Paulo e Lúcia que sempre estiveram presentes, pelo apoio e carinho

Aos meus irmãos Marcelo e Mônica, pelo carinho, amizade e cuja dedicação e empenho em tudo que fazem sempre serviram de exemplo para continuar crescendo.

Ao meu grande mestre e amigo, meu avô, Flávio, pelo apoio, amizade, exemplo profissional, e principalmente pelo exemplo de vida.

Aos professores do curso de mestrado em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS; Prof. João Jorge Diniz Barbachan, Onofre Francisco de Quadros, em especial ao Prof. Manoel Sant'Ana Filho, pelo carinho, amizade e ajuda, agradeço pelo exemplo e ensinamentos na área de Patologia.

Muito especial ao meu orientador, Prof. Pantelis Varvaki Rados, também pelo exemplo e pelos ensinamentos na área de patologia, mas principalmente pela orientação, incentivo, amizade e paciência durante esses anos.

À Isa, não só pelos ensinamentos, disponibilidade carinho e ajuda na realização deste estudo, mas principalmente pela amizade durante esses anos.

À Profa. Ana Cecília Chaves, pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus colegas de mestrado, Vini, Cris, Tia, Marecha e em especial ao Paivinha, pela parceria na realização deste estudo, agradeço pela amizade durante esses dois anos.

Ao meu amigo e colega Fábio Maitto, pelo exemplo, amizade e apoio durante esses anos.

Às amigas e colegas Luhana e Márcia pela amizade e colaboração durante esses anos.

Aos amigos Diego Bassani e Mozart Lauxen, pela amizade, pelos conhecimentos e contribuição na análise estatística.

Às funcionárias do DMAE, Loiraci e Ainá que contribuíram para realização deste estudo.

Ao núcleo de assessoria em estatística da UFRGS pela contribuição na análise estatística.

Às minhas sempre amigas, Cacá, Claudinha e Lisa, agradeço pelo apoio e amizade.

Ao CNPq e CAPES por financiar parte dos meus estudos.

*Se as coisas são inatingíveis... Ora!  
Não há motivos para não querê-las...  
Que triste os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!*

*(Mario Quintana)*

---

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
Câncer bucal .....	15
Citopatologia.....	17
Micronúcleos .....	23
<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
Delineamento do estudo.....	32
Amostra .....	32
Coleta do material .....	33
Análise citopatológica.....	34
Técnica de micronúcleos.....	37
Análise dos dados .....	40
Considerações éticas .....	41
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
Análise qualitativa.....	42
Análise quantitativa.....	45
Avaliação do padrão de maturação celular.....	45
Técnica de micronúcleos.....	53
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>86</b>
ANEXO I.....	86
ANEXO II – Reação de Feulgen.....	87
ANEXO III – Técnica de Papanicolaou Modificada* .....	88
ANEXO IV – Critérios para Análise Morfológica dos Esfregaços Corados pelo Método de Papanicolaou.....	91
ANEXO V – Critérios para Classificação dos Esfregaços Obtidos pelo Método de Papanicolaou.....	91
ANEXO VI – SISTEMA BETHESDA 2001 (Modificado para mucosa bucal 2003) .....	93
ANEXO VII – CONSENTIMENTO INFORMADO .....	94



---

## RESUMO

Inúmeros fatores estão relacionados ao desenvolvimento do câncer, no caso das neoplasias de boca, o tecido epitelial esta constantemente em contato com diversos carcinógenos. O objetivo deste estudo é avaliar as alterações citopatológicas de três sítios anatômicos da mucosa bucal normal com maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca e expostas aos agentes carcinógenos presentes no fumo e no álcool. Foram considerados 3 sítios anatômicos de maior prevalência de câncer bucal. A amostra foi constituída de 68 indivíduos, sendo 21 do grupo controle, 28 do grupo fumo e 19 do grupo fumo/álcool. A avaliação qualitativa através da classificação de Papanicolaou, bem como o Sistema de Bethesda, 2001 Modificado não apresentaram sensibilidade suficiente para detectar alterações incipientes na mucosa bucal, nos sítios anatômicos estudados expostos ao fumo, ao álcool, ou ambos. Na avaliação do padrão de maturação celular, apesar da constatação de alteração na borda da língua de fumantes e no lábio inferior e assoalho de boca de indivíduos que fumam e consomem bebidas alcoólicas diariamente, a variação do padrão de maturação celular foi aleatória não sendo os resultados conclusivos para a detecção de alterações incipientes nos sítios anatômicos estudados da mucosa bucal normal de indivíduos expostos ao álcool e ao fumo. A técnica de micronúcleos foi capaz de detectar uma tendência no aumento de micronúcleos nos indivíduos expostos ao fumo e/ou álcool na mucosa bucal de todos os sítios anatômicos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Desoxiribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucléico

et al. – e colaboradores

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MN – Micronúcleo

BE – “broken egg”

CR – Cariorrexe

FISH – “Fluorescent *in situ* hybridization”

NNN – nitrosanornicotina

NNK – 4-metilnitrosamina-1-3-piridil-1-butanona

ALDH – enzima aldeído desidrogenase

ADH – enzina álcool desidrogenase

% – porcentagem

NCM – negativo para alteração maligna epitelial

NCMI – negativo para alteração maligna epitelial com presença de células inflamatórias

ASC – presença de anormalidade epitelial, presença de células parabasais no esfregaço citopatológico

## ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1: Características dos indivíduos. Porto Alegre. 2003.....	42
TABELA 2: Freqüência dos esfregaços classificados segundo critérios de Papanicolaou e Traud. Modificados nos grupos controle, fumo e fumo/Álcool de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2003.....	43
TABELA 3: Freqüência dos esfregaços classificados segundo Sistema de Bethesda Modificado para mucosa bucal nos grupos controle, fumo e fumo/Álcool de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2003.....	45
TABELA 4: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação as células anucleadas.....	46
TABELA 5: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação as células anucleadas.....	47
TABELA 6: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação as células superficiais com núcleo.....	48
TABELA 7: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação as células superficiais com núcleo.....	50
TABELA 8: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação as células intermediárias.....	50
TABELA 9: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação as células intermediárias.....	52
TABELA 10: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de Micronúcleos em 1.000 células.....	54

TABELA 11: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação ao número de Micronúcleos em 1.000 células.....55

TABELA 12: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de células em cariorrexe /1.000 células.....56

TABELA 13: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre os grupos em relação ao número de células em cariorrexe /1.000 células.....58

TABELA 14: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de Broken eggs/ 1.000 células.....59

TABELA 15: : Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre os grupos em relação ao número de Broken eggs/ 1.000 células.....61

GRÁFICO 1: Comparação das médias entre os grupos em relação as células anucleadas.....46

GRÁFICO 2: Comparação entre as médias do número de células superficiais com núcleo entre os grupos.....49

GRAFICO 3: Comparação entre as médias do número de células intermediárias entre os grupos.....51

GRAFICO 4: Comparação entre as médias do número de células parabasais entre os grupos.....52

GRÁFICO 5: Comparação das médias dos MN entre os grupos.....54

GRÁFICO 6: Comparação das médias das células em cariorrexe entre os grupos.....57

GRÁFICO 7: Comparação das médias dos Broken eggs entre os grupos.....60

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Desenho diagramático da mucosa bucal correlacionada com os tipos celulares observados em esfregaços citopatológicos.....20

Fonte: Desenho Paula Luce Bohrer.

FIGURA 2: Desenho esquemático do sentido utilizado para leitura das lâminas.....34

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 3: Fotomicrografia de célula anucleada. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.....35

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 4: Fotomicrografia de célula superficial com núcleo. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.....35

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 5: Fotomicrografia de célula intermediária. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.....35

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 6: Fotomicrografia de célula parabasal. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.....35

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 7: Fotomicrografia de células epiteliais e células inflamatórias (seta). Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 400X.....36

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 8: “broken egg” (seta). Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 400X.....36

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 9: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1.000X.....38

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 10: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1.000X.....38

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 11: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1.000X.....38

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 12: Cariorrexe. Feulgen. Aumento 1.000X.....39

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 13: Cariorrexe. Feulgen. Aumento 1.000X.....39

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 14: “broken egg” (seta). Feulgen. Aumento 400X.....39

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 15: “broken egg”. Feulgen. Aumento 1.000X.....39

Fonte: Paula Luce Bohrer.

FIGURA 16: Desenho mostrando as alterações nucleares encontradas nos esfregaços corados pela reação de Feulgen. ....40

Fonte: TOLBERT et al., 1992.

## INTRODUÇÃO

O câncer bucal ainda é uma doença muito prevalente no Brasil. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número estimado de novos casos de câncer bucal registrados no Brasil em 2003 é de 7.750, em homens e 2.885 em mulheres (INCA, 2003). Dessa forma, há a necessidade de prevenção e diagnóstico precoce, através de programas que visem a detecção de alterações incipientes da mucosa bucal e do monitoramento dos fatores de maior risco para o desenvolvimento dessa forma de câncer.

Estudos mostraram que o fumo e o álcool são fatores etiológicos potenciais para o desenvolvimento do câncer de boca (SQUIER, 1986; BRUGERE, 1986; DU, 2000; MORENO-LÓPEZ, 2000). Os efeitos desses agentes sobre a mucosa bucal foram estudados através da citopatologia bucal (OGDEN, 1989 e 1999; SAMPAIO, 1999; BLOCHING, 2000; CANÇADO, 2001), que é um método de exame fundamentado na análise microscópica de células individuais, no caso da mucosa bucal, células epiteliais descamadas. A aplicação de técnicas quantitativas à citologia bucal refinou o seu potencial de diagnóstico (OGDEN, 1997).

A técnica de micronúcleos (MN) aplicada à citopatologia bucal representa um método eficiente para o biomonitoramento de população humanas expostas à agentes genotóxicos (FENECH et al., 1999). Micronúcleos são corpos extranucleares constituídos por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que, durante a mitose, não foram incorporados ao núcleo principal. O aumento da frequência de células micronucleadas tem sido relacionado à exposição a diferentes carcinógenos (STICH et al., 1983; TOLBERT et al., 1991; KARAHALIL et al., 1999; DIETZ et al., 2000; REIS et al., 2002), assim como a lesões cancerizáveis (DESAI et

al., 1996; CASARTELLI et al., 2000). Sendo assim o presente estudo tem por objetivo avaliar, através da análise qualitativa e quantitativa, as alterações celulares nas células esfoliadas da mucosa bucal de três sítios anatômicos de maior prevalência para o desenvolvimento do câncer bucal de indivíduos expostos aos fatores de risco.



## REVISÃO DA LITERATURA

### CÂNCER BUCAL

A regulação do crescimento e da diferenciação celular são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular. Genes em células normais são responsáveis pela regulação do crescimento e da diferenciação celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor e genes reguladores de apoptose e reparo de DNA). Distúrbios nesses mecanismos de regulação celular podem resultar no desenvolvimento de neoplasias (SCULLY, 1992). Dessa maneira, o câncer se desenvolve através da ativação de oncogenes e da inativação de genes supressores de tumor, permitindo, assim, o crescimento de uma população clonal de células alteradas (CALIFANO et al., 1996).

CALIFANO et al. (1996) e PARTRIDGE et al. (1998), afirmam que, nas neoplasias de cabeça e pescoço, o acúmulo de mutações em genes específicos está relacionado à progressão tumoral.

Segundo ROSS (1998), a transformação neoplásica não acontece antes que ocorram danos permanentes no DNA, alterando o comportamento das células e suas descendentes. O câncer representa o produto final de um processo de múltiplos estágios que resulta do acúmulo de mutações não reparadas no DNA.

Atualmente, o câncer constitui-se na segunda maior causa de morte por doenças no Brasil, inferior somente às doenças cardiovasculares. O câncer de boca ocupa a oitava posição em relação às neoplasias mais prevalentes no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer estimou, para o ano de 1999, o surgimento de 7.950 novos casos de câncer de boca; já para 2003, as estimativas são de 10.635 novos casos. ([http:// www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregiões/](http://www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregiões/))

Aproximadamente 95% das neoplasias de boca são carcinomas espinocelulares (SAWYER e WOOD, 1992). Segundo SHAFFER (1975), os sítios de maior prevalência de câncer bucal são o lábios, a borda de língua e o soalho de boca. Na grande maioria dos casos, acometem pacientes acima dos 40 anos de idade (CONLEY e SADOYAMA, 1973; SAWYER e WOOD, 1992). No entanto, MACKENZIE et al. chama a atenção para o aumento da incidência de câncer de boca entre adultos jovens (abaixo dos 40 anos de idade). O autor, afirma ainda, que a maioria dos indivíduos jovens que desenvolveram câncer de boca apresentavam os mesmo fatores etiológicos aos quais os indivíduos adultos estão expostos (fumo, álcool e baixo consumo de frutas e verduras).

O INCA (2003) aponta o fumo como, principal agente causador de mortes por câncer no país. O risco de óbitos por câncer de boca em fumantes é considerado 30 vezes maior do que os em não-fumantes. O fumo contém mais de 3.900 constituintes, dentre eles inúmeros agentes carcinogênicos e cocarcinogênicos. Os derivados da nicotina N-nitrosaminas, N'-nitrosanornicotina (NNN) e 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), são os carcinógenos mais poderosos presentes no fumo (HOFFMANN e WYNDER, 1986).

Assim como o fumo, o álcool também é um fator etiológico potencial para o desenvolvimento do câncer de boca (OGDEN e WIGHT , 1998; REIS et al., 2002). O etanol, por si só, não é considerado um agente carcinogênico ou mutagênico. No entanto, o álcool, quando em contato com a mucosa bucal, é absorvido pelas células epiteliais. No interior dessas células é convertido em acetaldeído, através da enzima álcool desidrogenase (ADH). O acetaldeído, por sua vez, é convertido em acetado através da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), que posteriormente irá sofrer

oxidação, gerando como produto final dióxido de carbono, ácidos graxos e água (OGDEN e WIGHT, 1998).

Segundo OGDEN e WIGHT (1998), a enzima aldeído desidrogenase é menos ativa que a álcool desidrogenase na mucosa bucal, podendo levar ao acúmulo de acetaldeído nos tecidos bucais. O acetaldeído é considerado um agente mutagênico e carcinogênico (BIRD, DRAPER e BASRUR, 1982; HARTY et al., 1997).

O álcool também é apontado como responsável pelo aumento da permeabilidade da mucosa bucal (SQUIER, 1986). Sendo assim muitos autores afirmam que existe um sinergismo entre o fumo e o álcool na etiologia das neoplasias da cavidade bucal. Os efeitos locais do álcool aumentam a permeabilidade do tecido epitelial, facilitando a penetração dos agentes carcinogênicos do fumo através da mucosa bucal (WIGHT e OGDEN, 1998; DU, 2000).

Segundo ROSS, 1998, a carcinogênese química freqüentemente envolve mais de um componente: um iniciador, que provoca a mutação, e um promotor, que estimula a divisão celular. Nos vários estágios da teoria da carcinogênese bucal, o álcool é geralmente referido como um cocarcinogênico (facilitando a iniciação do tumor ou agindo como um promotor) mais do que como um iniciador por si só.

## **CITOPATOLOGIA**

A citopatologia é um método de exame fundamentado na análise microscópica de células individuais. Na cavidade bucal, para o estudo das mucosas as células epiteliais são obtidas por raspagem. Os efeitos do álcool e do fumo sobre a mucosa bucal foram estudados através desta técnica (OGDEN, 1989 e 1999; SAMPAIO; 1999, BLOCHING, 2000; CANÇADO, 2001).

Os instrumentos de coleta em citologia esfoliativa são os mais variados (cotonete, espátula de madeira (“abaixador” de língua) e o “Cytobrush”) (SILVERMAN, BECKS e FARBER, 1958; SANDLER et al., 1960; SANDLER, 1964; ROVIN, 1967; COWPE e LONGMORE, 1981; STICH, 1982 e 1983; COWPE et al., 1988; OGDEN, 1989 e 1999; DESAI, 1996; SAMPAIO, 1999; BLOCHING et al. , 2000; CASAETELLI et al. 2000; DIETZ, 2000; CANÇADO et al., 2001; GATTÁS, 2001). OGDEN, COWPE e GREEN (1992) e JONES (1994), em um estudo comparativo entre a espátula de madeira e o “Cytobrush” como instrumentos de coleta em citologia esfoliativa de boca, concluíram que o “Cytobrush” apresentou resultados superiores aos da espátula de madeira em relação à quantidade de células presentes e à dispersão celular no esfregaço. Esses autores recomendam a utilização do “Cytobrush” em citologia esfoliativa de boca.

As células esfoliadas, segundo FENECH (1999), apresentam um forte potencial como instrumento para o biomonitoramento da população humana exposta a agentes genotóxicos ou que estejam em tratamentos preventivos. Isso se deve ao fato de que essas células são facilmente coletadas através de procedimentos não-invasivos na boca, nariz e outras estruturas. Sabe-se que as alterações iniciais precedentes ao aparecimento de uma lesão clinicamente visível ocorrem no epitélio. Sendo assim, amostras de células epiteliais individuais podem oferecer uma chance para a detecção de alterações malignas, principalmente pelo fato de que 90% das neoplasias de cavidade bucal são carcinomas epidermóides (OGDEN, 1997).

Segundo FENECH et al. (1999), mais de 90% dos cânceres desenvolvem-se em tecidos epiteliais que estão mais expostos aos carcinógenos. Na mucosa bucal, o tecido epitelial sofre ação direta de agentes genotóxicos inaláveis ou ingeríveis.

O epitélio bucal mantém a integridade de sua estrutura através de um sistema de contínua renovação celular, no qual as células são produzidas por divisão mitótica nas camadas mais profundas e migram para a superfície, onde serão esfoliadas (TEN CATE, 2001).

Para, melhor compreensão dos tipos celulares encontrados nos esfregaços citopatológicos de boca, é necessário correlacioná-los com os achados histológicos da mucosa bucal. Embora a mucosa bucal seja quase que inteiramente recoberta por epitélio escamoso, existem pequenas diferenças em seu arranjo. A porção externa dos lábios é recoberta por epitélio escamoso do tipo epidermóide ceratinizado, e a porção interna dos lábios é do tipo mucoso, constituída por epitélio escamoso não-ceratinizado. Toda a língua é revestida por epitélio escamoso não-ceratinizado, assim como o soalho da cavidade bucal (CARVALHO, 2002).

Baseado em uma descrição detalhada, CARVALHO (2002), definiu os diferentes tipos celulares observados em esfregaços citopatológicos de boca: células parabasais, raramente encontradas em esfregaços bucais normais, possuem forma ligeiramente oval, coloração cianófila, núcleo em posição central ocupando mais ou menos metade da área celular; células intermediárias, possuem coloração cianófila, apresentam uma predominância do citoplasma sobre o núcleo, a cromatina é finamente granular e uniformemente distribuída, mas já se pode observar alguns grânulos e esboços de cordões de cromatina; células superficiais com núcleo, são células da camada mais externa, são volumosas e achatadas, possuem citoplasma eosinófilo com bordas bem delineadas, o núcleo é inteiramente picnótico, sem nenhuma estrutura identificável de cromatina, surgindo como um pequeno ponto

preto arredondado ou às vezes ligeiramente alongado; células anucleadas, são achatadas e sem núcleo, ocasionalmente pode-se notar leve vestígio da presença de um núcleo, seu citoplasma é intensamente ceratinizado e corado de amarelo alaranjado.

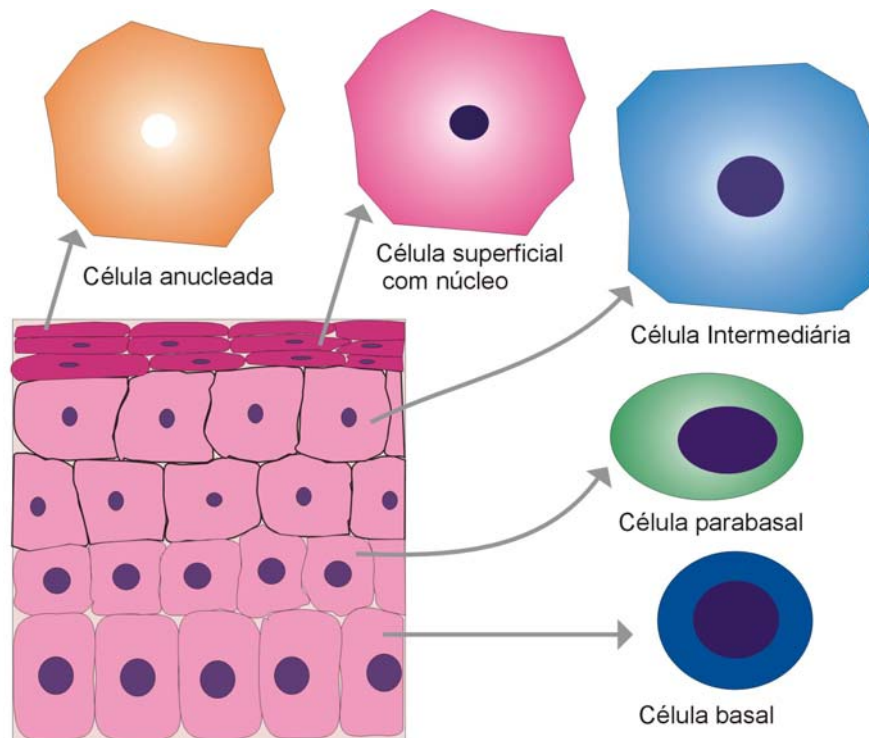


Fig. 1. Desenho diagramático da mucosa bucal correlacionada com os tipos celulares observados em esfregaços citopatológicos.

Fonte: Desenho Paula Luce Bohrer.

Os critérios de malignidade para classificação dos esfregaços, segundo CARVALHO (1995), são: irregularidade de contorno nuclear, multinucleação, figuras aberrantes de mitose, aumento do volume e do número dos nucléolos, presença de vacúolos no citoplasma, pleomorfismo celular, aumento do tamanho da célula e variação acentuada de tamanho das células em um grupamento.

A citopatologia foi bastante estudada nos anos 1960, através da técnica de PAPANICOLAOU, para o diagnóstico de lesões bucais; no entanto, os resultados mostraram uma grande percentagem de falsos-negativos e falsos-positivos, limitando a sua utilização para esse fim (SILVERMAN, BECKS e FARBER, 1958; SANDLER et al., 1960; SANDLER, 1964; ROVIN, 1967).

Muitos autores avaliaram o padrão de maturação celular na mucosa bucal clinicamente normal, através da citopatologia, utilizando a técnica de PAPANICOLAOU (MONTGOMERY, 1951; SILVERMAN, BECKS e FARBER, 1958). Pôde-se observar que o soalho de boca apresentou menor grau de maturidade celular, seguido pelo palato mole, mucosa bucal e dorso de língua, enquanto que a gengiva e o palato duro apresentaram maior grau de maturação epitelial, ou seja, apresentaram maior quantidade de células ceratinizadas.

O padrão de maturação epitelial em alguns estudos mostrou-se alterado em indivíduos expostos a carcinógenos como o fumo (ZIMMERMANN e ZIMMERMANN, 1965; MEYER, RUBINSTEIN e MEDAK, 1970; HILLMAN e KISSIN, 1976; BALÁEZ, DIAS E PÉRES, 1986 e 1989).

BALÁEZ, DIAS e PÉRES (1986 e 1989) verificaram que existe diferença estatisticamente significativa em relação ao número de células anucleadas na mucosa bucal de pacientes fumantes quando comparado ao grupo Controle, sugerindo que a mucosa bucal sofre modificações adaptativas que se refletem no aumento da ceratinização devido à ação dos constituintes do tabaco. Da mesma forma, os autores demonstraram que existe aumento estatisticamente significativo no número de células anucleadas no palato e na mucosa bucal em indivíduos fumantes e que esse aumento está relacionado diretamente à duração do hábito de fumar,

assim como com o número de cigarros consumidos, concluindo que o fumo atuando em baixas doses por um longo período de tempo é capaz de provocar alterações na mucosa bucal.

KAPCZINSKI (1997) observou uma diminuição das células superficiais com núcleo em soalho bucal e borda de língua de indivíduos fumantes. Enquanto que ANDRADE E SILVA (1997), verificou o aumento das células intermediárias em todos os sítios anatômicos estudados (lábio inferior, borda de língua e soalho bucal), aumento do número de células superficiais com núcleo no lábio inferior e na borda de língua, além do aumento do número de células superficiais anucleadas no soalho bucal de fumantes, sugerindo um processo metaplásico ou de alteração da divisão ou adesividade celular da mucosa bucal em fumantes.

A ação do fumo na mucosa bucal clinicamente normal do lábio inferior, borda de língua e soalho bucal de fumantes e não-fumantes foi analisada segundo a classificação de PAPANICOLAOU e TRAUT por KAPCZINSKI (1997), ANDRADE E SILVA (1997); ROMANINI (1999); SOARES PINTO (2001); CANÇADO, YURGEL e SANT'ANNA (2001). KAPCZINSKI (1997) obteve somente diagnósticos citopatológicos classes I e II, sendo que no lábio inferior mostraram o mesmo padrão citopatológico (Classe I) e independente do hábito de fumar ou não, na borda de língua e soalho bucal, os diagnósticos classe II em fumantes foram respectivamente 79,2% e 50%. ANDRADE E SILVA (1997) também obtiveram somente diagnósticos citopatológicos classes I e II. ROMANINI (1999) constatou dois esfregaços citopatológicos classe III em borda de língua e dois em soalho bucal de não-fumantes, enquanto SOARES PINTO (2001) observou um esfregaço citopatológico classe III em soalho bucal de fumante. CANÇADO, YURGEL e SANT'ANNA (2001),



quando avaliaram a borda de língua e o soalho bucal de fumantes e não-fumantes, observaram somente diagnósticos classe I e II, sendo que tanto na borda de língua como no soalho bucal os diagnósticos classe II em fumantes foram de 46,47%.

Em 1988, com o intuito de melhorar e unificar a terminologia utilizada para o diagnóstico citopatológico cervical/vaginal, a divisão de Controle e Prevenção de Câncer do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos da América organizou em Bethesda, Maryland, encontro para revisar a terminologia existente e estabelecer métodos efetivos de classificação para serem utilizados inicialmente em citologia cérvico-vaginal. Outros encontros foram realizados com a finalidade de modificar o Sistema de Bethesda em 1991 e 2001. (SOLOMON et al., 1989 e 2002).

Segundo COWPE (1981, 1988) e OGDEN (1989, 1997), atualmente a citopatologia pode ser utilizada para o monitoramento e controle de lesões suspeitas, como exame de diagnóstico adicional para a detecção precoce do câncer bucal, assim como fazer parte de protocolos de controle pós tratamento do câncer de boca. Além disso, COWPE (1981, 1988) e OGDEN (1989, 1997) acreditam que a aplicação de técnicas quantitativas em citopatologia pode melhorar significativamente a sensibilidade de diagnóstico na detecção precoce do câncer bucal.

## **MICRONÚCLEOS**

Os micronúcleos são estruturas extranucleares compostas por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que durante a mitose não foram incorporados ao núcleo principal. Os micronúcleos são observados em células que apresentam capacidade de divisão. Podem ser vistos tanto como fragmentos de cromossomos

com ausência de centrômeros (fragmentos acêntricos), quanto como cromossomos inteiros que, durante a mitose, não tiveram a capacidade de migrar através do fuso para um dos pólos celulares. Durante a telófase, um envoltório nuclear forma-se em torno dos cromossomos perdidos e/ou dos fragmentos de cromossomos, os quais se desespiralizam e gradualmente assumem a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, sendo esse menor que o núcleo principal, surgindo daí o nome micronúcleo (FENECH, 2000).

HOLLAND et al. (1996), em um estudo com indivíduos expostos ao formaldeído, mostrou através da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), utilizando uma sonda para centrômeros, que o formaldeído foi capaz de induzir predominantemente a formação de micronúcleos centrômero-negativos, sugerindo que a quebra cromossômica seja o principal mecanismo de formação de micronúcleos em indivíduos expostos à essa substância.

A freqüência de micronúcleos é capaz de medir tanto a quebra cromossômica quanto a perda cromossômica, sendo essa técnica sensível para o monitoramento de dano genético (FENECH, 1999). A análise de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal, segundo STICH, CURTIS e PARIDA (1982); SARTO (1987) e BLOCHING et al. (2000), mostra suficiente validade e sensibilidade, como método capaz de detectar o efeito de carcinógenos ambientais.

Quando o tecido a ser estudado é o tecido epitelial, a técnica de micronúcleos em células esfoliadas apresenta vantagens sobre a técnica de micronúcleos em linfócitos. As células do tecido alvo podem ser diretamente estudadas e a coleta é não-invasiva. Além disso, o estudo dos micronúcleos em linfócitos necessita de

estímulo para que estes entrem em divisão, ao contrário das células epiteliais, que estão em constante renovação (HOLLAND, 2003).

Os micronúcleos observados nas células dos esfregaços da mucosa bucal indicam a ocorrência de aberrações cromossômicas ocorridas nas células da camada basal (STICH, CURTIS e PARIDA, 1982), e dessa forma refletem o dano genotóxico ocorrido 7 a 10 dias antes da coleta.

As células esfoliadas passam por um processo degenerativo durante sua maturação, que leva ao surgimento de anomalias celulares, muitas vezes difíceis de serem distinguidas dos micronúcleos (SARTO et al., 1987). SARTO et al. (1987), com a finalidade de evitar vieses na análise dos micronúcleos, as células degeneradas foram excluídas da quantificação e estabeleceu critérios para a classificação dos micronúcleos.

Os critérios estabelecidos foram os seguintes: um micronúcleo deve ser considerado, quando apresentar as seguintes características: estrutura e intensidade de coloração da cromatina similares ou mais fracas que o núcleo principal; bordas nítidas, sugerindo a presença de membrana nuclear; forma arredondada ou ovalada e incluída no mesmo citoplasma do núcleo principal e tamanho menor que 1/5 do núcleo principal (SARTO et al., 1987).

Tolbert e sua equipe, em seus estudos nos anos 90, mostraram que na quantificação dos micronúcleos também devem ser levadas em consideração as outras anomalias nucleares encontradas nos esfregaços citopatológicos da mucosa bucal, pois estas também refletem eventos que podem estar ligados à carcinogênese. Alterações citotóxicas podem estar ligadas à promoção das neoplasias via estimulação na proliferação celular, bem como a apoptose induzida

pela genotoxicidade pode ser um indicativo de uma resposta aos eventos iniciais no câncer (TOLBERT, SHY e ALLEN, 1991 e 1992).

TOLBERT, SHY e ALLEN (1992) descreveram as anomalias nucleares encontradas nos esfregaços citopatológicos bucais e introduziram um novo protocolo para a técnica de micronúcleos, no qual as outras anomalias foram consideradas e quantificadas separadamente. Dentre as anomalias celulares encontradas nos esfregaços citopatológicos podemos destacar cariorrexe, picnose, cariólise, binucleação e “broken egg”.

O “Broken egg” é descrito como uma forma nuclear bastante anômala, da qual não se sabe a origem ou significado (TOLBERT, SHY e ALLEN, 1992). RAMIRES (2000), acredita que os BE representam uma primeira alteração nuclear, provavelmente uma resposta adaptativa à ação do agente clastogênico; quando essa ação é intensificada, o “fio Feulgen positivo” do BE provavelmente rompe-se, originando um MN.

FENECH (2000), FENECH e CROTT (2002) e TOMAS, UMEGAKI e FENECH (2003) descrevem a formação de pontes nucleoplásmicas em linfócitos, originadas provavelmente quando os centrômeros de cromossomos discêntricos são puxados para pólos opostos durante a anáfase e o DNA resultante da ponte é recoberto pela membrana nuclear.

Apesar dos “broken eggs” representarem uma forma de anomalia nuclear encontrada com frequência nos esfregaços citopatológicos provenientes da mucosa bucal, muito pouco se encontra na literatura a seu respeito.

A cariorrexe e a cariólise são evidentes em células em processo de necrose. A cariólise é identificada pela ausência do núcleo nas células, enquanto a cariorrexe

representa a fragmentação do núcleo. A cariorrexe também está presente nos primeiros estágios de outro tipo de morte celular, a apoptose (TOLBERT, SHY e ALLEN, 1992).

Para a evidenciação dos micronúcleos, utilizam-se técnicas específicas para a marcação de DNA, como a reação de Feulgen. Essa reação foi introduzida em 1924 por Feulgen e Rossenbeck. Através de um processo de hidrólise, ocorre a liberação de grupamentos aldeídos livres na estrutura do DNA, que posteriormente serão detectados através do reagente de Schiff (CHIECO e DERENZINI, 1999).

O número de células quantificadas para análise varia bastante na literatura consultada, sendo utilizadas desde 500 células (STICH e ROSIN, 1983; DIETZ et al., 2000), 1.000 células (STICH, CURTIS e PARIDA, 1982; HOLLAND et al., 1996; DESAI et al., 1996; BLOCHING et al., 2000) até mais de 1.000 células (SARTO et al., 1987; TOLBERT, SHY e ALLEN, 1991; GATTÁS et al., 2001).

STICH, CURTIS e PARIDA (1982), observaram um aumento significativo no número de células micronucleadas da mucosa bucal de mascadores de tabaco. Os mesmos autores acreditam que o teste de micronúcleos nas células esfoliadas é capaz de mostrar evidências da exposição a carcinógenos, assim como medir o grau de exposição destes tecidos nos quais as lesões neoplásicas podem vir a se desenvolver.

STICH e ROSIN (1983), com o propósito de estabelecer o efeito do sinergismo do fumo e do consumo de álcool sobre a mucosa bucal, utilizaram a quantificação de MN em esfregaços da mucosa bucal obtidos por citologia esfoliativa. Os autores encontraram elevação significativa no número de células micronucleadas na mucosa bucal dos indivíduos que fumavam e apresentavam alto

consumo de álcool. O autor afirma que, utilizando a contagem de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de fumantes e consumidores de bebidas alcóolicas, pode-se avaliar uma resposta celular precoce a esses dois fatores, os quais estão ligados à maior incidência de câncer bucal.

O aumento na frequência de células micronucleadas, segundo STICH e ROSIN (1983), só é encontrado nos indivíduos que fumam pelo menos 20 cigarros/dia e consomem 150ml de etanol/dia. Segundo o autor, tanto o hábito isolado de fumar mais de 60 cigarros/dia, como o de ingerir isoladamente quantidades de bebidas alcóolicas acima de 1,2l/dia, não levaram à detecção do aumento do número de células micronucleadas da mucosa bucal.

SARTO et al. (1987), em seu estudo, comparou a quantidade de células micronucleadas em fumantes e não-fumantes e observou aumento estatisticamente significativo no número de células micronucleadas de indivíduos fumantes quando comparado aos não-fumantes.

TOLBERT, SHY e ALLEN (1991) observaram aumento significativo no número de células micronucleadas em indivíduos que utilizam tabaco em pó ("snuff"). Além disso, os autores observaram maior quantidade estatisticamente significativa de células em cariorrexe nos esfregaços citopatológicos de indivíduos que usavam tabaco em pó, quando comparados aos esfregaços citopatológicos de indivíduos que não faziam uso dessa substância.

BONASSI et al. (2003), em um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do fumo sobre a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos, mostrou aumento na frequência de micronúcleos apenas em indivíduos que fumam 30 ou mais cigarros por dia.

Alguns estudos suportam a hipótese da associação entre a frequência de MN em determinados tecidos e o desenvolvimento do câncer. Segundo DESAI (1996), observa-se o aumento significativo do número de MN em células epiteliais esfoliadas de pacientes com lesões cancerizáveis, assim como nos linfócitos circulantes quando comparados ao número de células micronucleadas de indivíduos considerados saudáveis e que não apresentam qualquer hábito de risco para câncer. O autor afirma que a avaliação da frequência de MN pode ser utilizada como biomarcador para estudos de campo.

BENNER et al. (1994), em um estudo com indivíduos que apresentavam lesões cancerizáveis, mostrou que a frequência de MN nos esfregaços realizados nas lesões era maior do que nos esfregaços provenientes da região de mucosa clinicamente normal dos mesmos pacientes.

CASARTELLI et al. (2000), estudando a frequência de micronúcleos em indivíduos com lesões cancerizáveis e carcinomas, observou aumento significativo no número de células micronucleadas nos carcinomas quando comparados com as lesões cancerizáveis, e o número de células micronucleadas também mostrou-se significativamente maior nas lesões cancerizáveis quando comparadas à mucosa bucal sem lesão.

RAMIREZ (2000), nas avaliações das anomalias nucleares de indivíduos alcólatras portadores de carcinoma de boca, observou maior quantidade na frequência de células micronucleadas nos esfregaços coletados na região adjacente ao tumor quando comparados com a área contra lateral e a região gengivo-labial superior dos indivíduos portadores de carcinoma. A comparação das frequências de MN indicou, ainda, um aumento significante de sete vezes na frequência de MN ao

redor da lesão ( $p=0.0004$ ), um aumento significativo de três vezes na região contralateral ao tumor ( $p=0.0297$ ) e de duas vezes, mas não-significante, na região gengivo-labial superior ( $p=0.4409$ ) dos pacientes, quando comparadas com as regiões equivalentes do grupo controle. Foi encontrado maior número de células em cariorrexe e de “broken eggs” na mucosa jugal, assim como na região gengivo-labial superior do grupo controle quando comparado à região adjacente ao tumor dos pacientes. As menores freqüências de todas as anomalias metanucleares ocorreram na região adjacente ao tumor, justamente a que apresentou as maiores freqüências de MN. Esses resultados indicam que a freqüência de MN aumenta às expensas da diminuição das anomalias metanucleares.

Concordando com os outros autores, BLOCHING et al. (2000) também encontrou aumento estatisticamente significativo no número de células micronucleadas nos esfregaços citopatológicos de indivíduos portadores de lesões neoplásicas e lesões cancerizáveis, quando comparados aos esfregaços citopatológicos de indivíduos sem lesões bucais.



## PROPOSIÇÃO

Este estudo tem por:

Objetivo Geral:

- Avaliar as variações citopatológicas de três sítios anatômicos da mucosa bucal normal com maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca e expostos aos agentes carcinógenos presentes no fumo e/ou álcool.

Objetivos específicos:

- Avaliação qualitativa de Papanicolaou modificado e Bethesda, 2001 modificado para mucosa bucal normal.
- Avaliação quantitativa do padrão de maturação celular .
- Avaliação de dano genético através da técnica de micronúcleos utilizando a reação de Feulgen.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **DELINEAMENTO DO ESTUDO**

O delineamento do estudo desenvolvido consiste em um estudo observacional transversal clínico-descritivo.

### **AMOSTRA**

A amostra foi selecionada entre os meses de maio de 2002 e abril de 2003, no serviço de saúde do DMAE de Porto Alegre e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Foram selecionados indivíduos do sexo masculino, acima de 30 anos de idade, que não apresentavam lesão bucal clinicamente visível e que apresentavam as seguintes características: hábito de ingerir bebida alcoólica ou não, hábito de fumar ou não e boa saúde geral, além de ausência de história pregressa ou atual de neoplasias benignas ou malignas.

Foi realizada uma anamnese detalhada e os dados foram registrados em uma ficha clínica, na qual também constava nome, endereço e um número de identificação (ANEXO I). Após a anamnese foi realizado um exame clínico da cavidade bucal para verificar a presença ou ausência de lesão bucal clinicamente visível. A partir dos dados coletados durante a anamnese os indivíduos foram classificados em um dos seguintes grupos: Grupo I (controle), constituído por indivíduos que nunca fumaram e não bebem em média um copo de bebida alcoólica por dia; Grupo II (fumo), constituídos por indivíduo que consomem no mínimo 20 cigarros por dia (OGDEN, 1990) há no mínimo, um ano, ou que fumem 10 cigarros por dia há mais de 10 anos (CANÇADO et al., 2001); Grupo III (fumo/álcool),

constituído por indivíduos que fumam no mínimo 20 cigarros por dia ou que fumam 10 cigarros por dia a mais de 10 anos e bebem, em média, um copo de qualquer bebida alcoólica por dia. Apenas fumantes de cigarros com filtro foram incluídos neste estudo.

Foram examinados, no total, 129 indivíduos. Os esfregaços de 61 indivíduos foram excluídos do estudo devido a problemas na qualidade deles ou na técnica de coloração. A amostra constituiu-se de 68 indivíduos (21 no grupo controle, 28 no grupo fumo e 19 no grupo fumo/álcool).

### **COLETA DO MATERIAL**

Foram realizados dois esfregaços, mediante a utilização de uma espátula de madeira, em três áreas anatômicas bucais de maior prevalência de câncer: vermelhão do lábio, borda de língua e soalho bucal. Previamente à realização dos esfregaços, os indivíduos foram instruídos a remover as próteses, quando da presença das mesmas, e realizar um bochecho com água por um minuto. A preparação do material para análise envolveu a distensão de cada esfregaço sobre uma lâmina de vidro para microscopia, previamente identificada. Essas lâminas foram acondicionadas em frascos plásticos porta-lâminas, contendo álcool absoluto como fixador. Tal metodologia de coleta resultou em duas lâminas correspondentes a cada um dos três sítios bucais. Foram obtidos dois esfregaços do lado esquerdo de cada sítio anatômico. As lâminas foram registradas no livro de registro de citopatologia do laboratório de Patologia da FO-UFRGS e codificadas de maneira que o examinador, durante a avaliação dos esfregaços, desconhecesse a qual grupo pertenciam as lâminas. A partir disso, uma lâmina referente a cada sítio foi submetida à reação de Feulgen (ANEXO II) e a outra, à técnica de Papanicolaou Modificado (ANEXO III).

## ANÁLISE CITOPATOLÓGICA

Para as análises foi utilizado um microscópio binocular marca Zeiss®. Tanto para a análise do material corado pela técnica de Papanicolaou Modificado, como para a análise do material corado pela reação de Felugen, a lâmina foi percorrida no sentido horizontal, da esquerda para a direita (FIGURA 2) (COWPE et al., 1985; KAPCZINSKI e RADOS, 1997; CANÇADO et al., 2001).

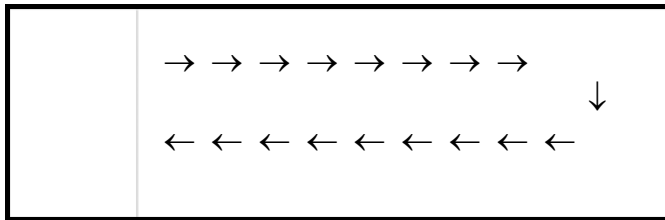


Figura 2: Desenho esquemático do sentido utilizado para leitura das lâminas.

O material submetido à técnica de Papanicolaou modificado foi utilizado para a avaliação qualitativa através da classificação dos esfregaços, segundo os critérios estabelecidos por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943) (ANEXO IV e ANEXO V) e Bethesda 2001 modificado (ANEXO VI), assim como para a avaliação quantitativa da maturação epitelial. Para esta avaliação foram contados os números de células superficiais anucleadas (Figura 3), superficiais nucleadas (Figura 4), intermediárias (figura 5) e parabasais (Figura 6) presentes em cada esfregaço. Para a definição do padrão de maturação celular foi avaliada a morfologia das células, segundo critérios de CARVALHO (2002). Foram analisadas as 100 primeiras células bem distendidas e isoladas entre si em cada esfregaço, em um aumento de 400X. A análise qualitativa e quantitativa dos esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou modificado foi realizada por dois pesquisadores.

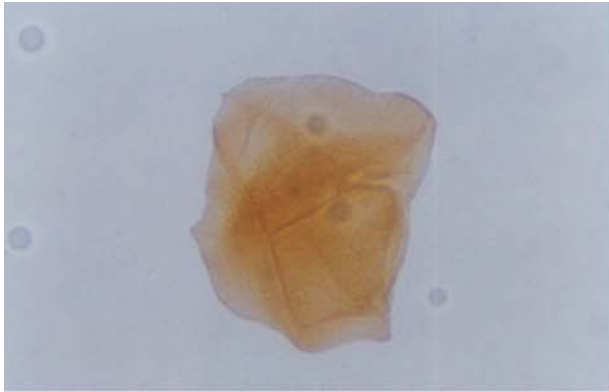


FIGURA 3: Fotomicrografia de célula anucleada. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.

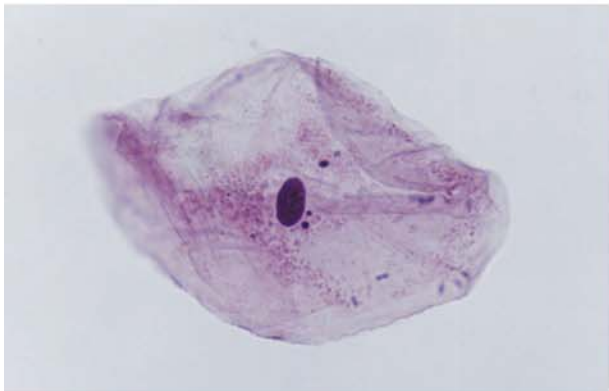


FIGURA 4: Fotomicrografia de célula Superficial com núcleo. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.

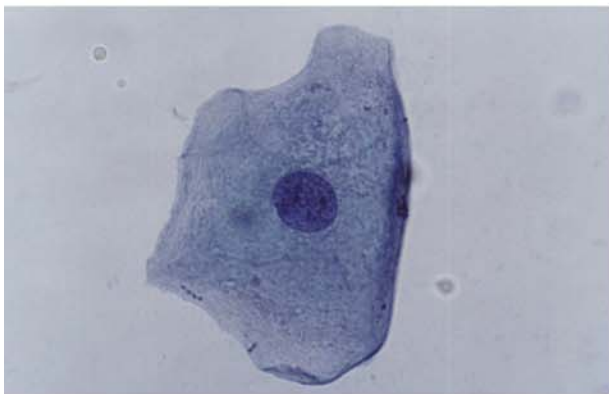


FIGURA 5: Fotomicrografia de célula intermediária. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.

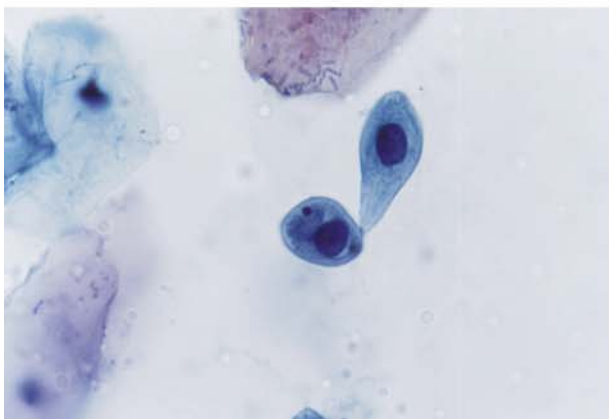


FIGURA 6: Fotomicrografia de célula parabasal. Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 1000X.

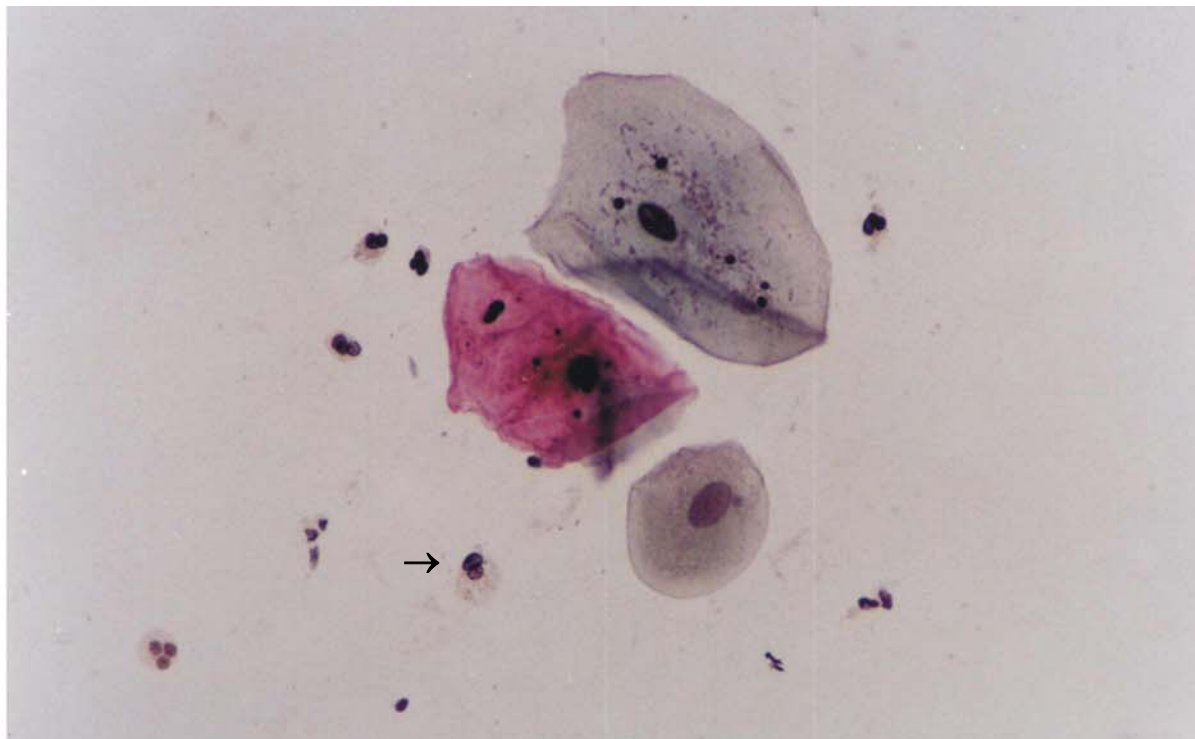


FIGURA 7: Fotomicrografia de células epiteliais e células inflamatórias (seta). Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 400X.

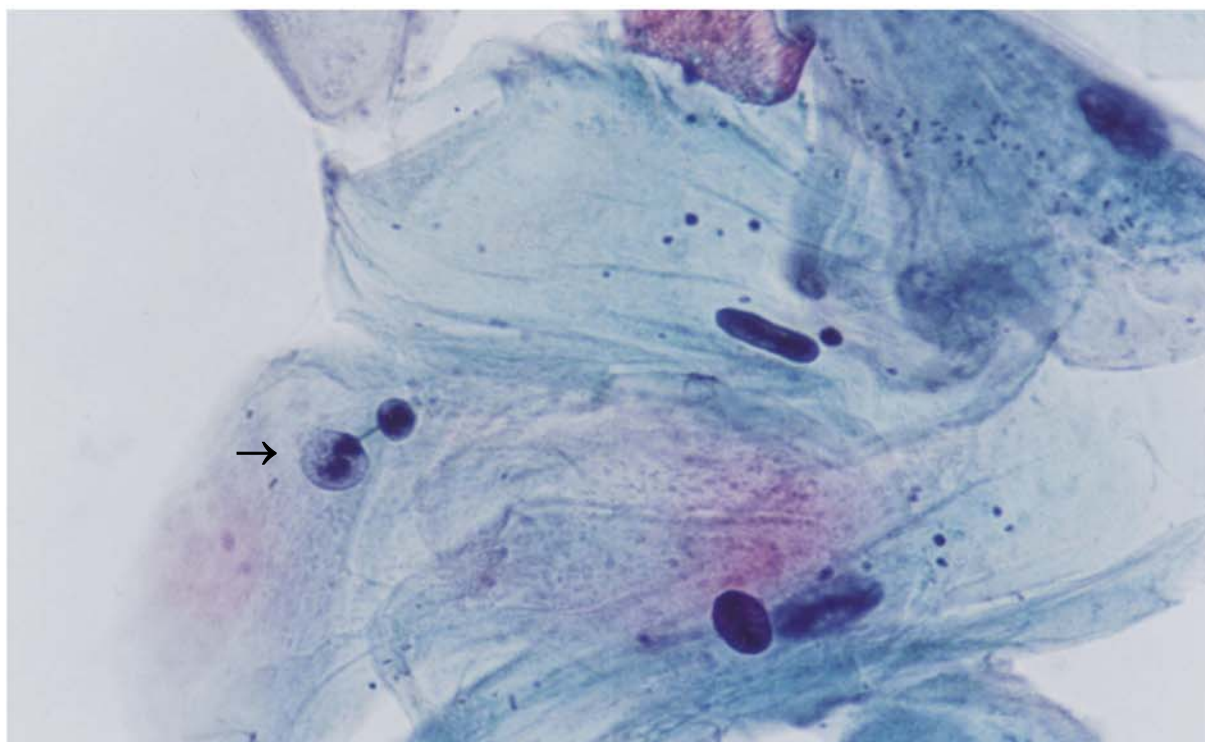


FIGURA 8: "broken egg" (seta). Coloração de Papanicolaou Modificado. Aumento 400X.

## TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

As lâminas coradas pela reação de Feulgen serviram para a avaliação da frequência de micronúcleos. Foram analisadas 1.000 células bem distendidas e isoladas entre si em cada esfregaço. As células que apresentarem alterações degenerativas foram descartadas (cariólise, cariorrexe, picnose ou fragmentação nuclear). Os núcleos foram avaliados em um aumento de 400X, e quando foram localizadas células micronucleadas, essas foram avaliadas em um aumento de 1.000X, sob imersão, para confirmar a presença do micronúcleo.

Os micronúcleos foram quantificados quando preencheram os seguintes critérios: estrutura e intensidade de coloração da cromatina similar ou mais fraca que o núcleo principal; bordas nítidas, sugerindo a presença de membrana; estruturas arredondadas e incluídas no mesmo citoplasma do núcleo principal e não ultrapassar 1/5 do maior diâmetro do núcleo principal (SARTO, 1987) (Figuras 9, 10 e 11).

Além disso foram quantificadas alterações nucleares presentes nos esfregaços corados pela reação de Feulgen, como o número de células em cariorrexe (Figuras 12 e 13) e de “broken eggs” (Figuras 14 e 15) presentes em 1.000 células. Os núcleos foram avaliados em aumento de 400X, segundo critérios de TOLBERT et al. (1992) (Figura 16).



FIGURA 9: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1000X.

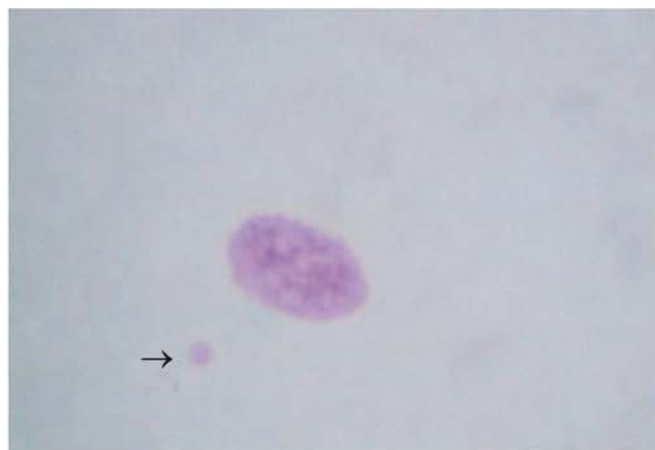


FIGURA 10: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1000X.



FIGURA 11: Célula com micronúcleo (seta). Feulgen. Aumento 1000X.





FIGURA 12: Cariorrexe. Feulgen. Aumento 1000X.

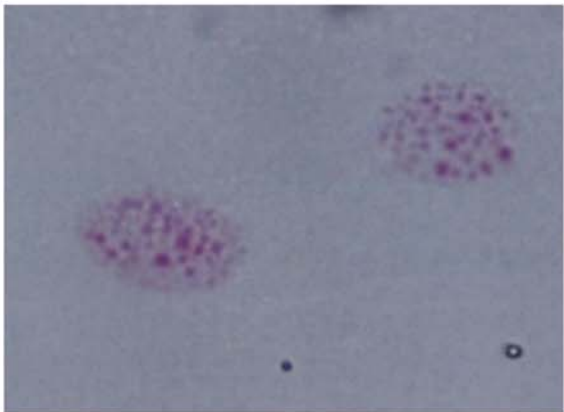


FIGURA 13: Cariorrexe. Feulgen. Aumento 1000X.

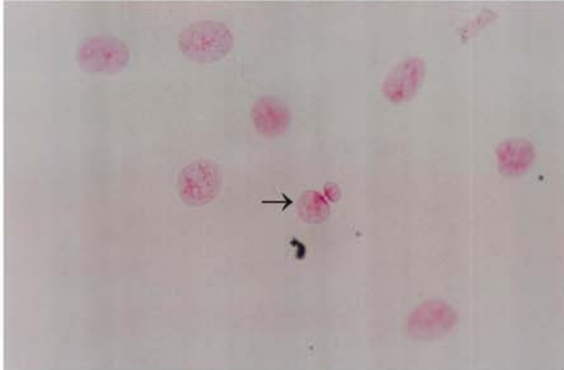


FIGURA 14: "broken egg" (seta). Feulgen. Aumento 400X.



FIGURA 15: "broken egg" (setas). Feulgen. Aumento 1000X.

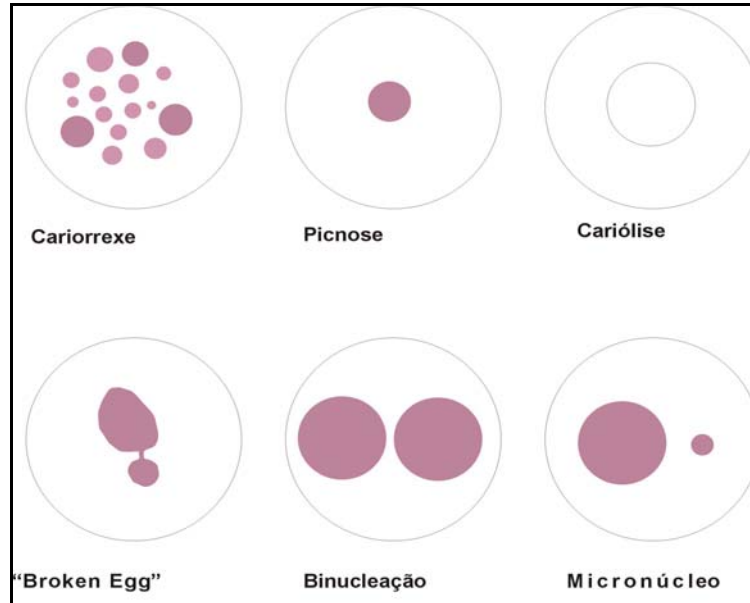


Figura 16: Desenho mostrando as alterações nucleares encontradas nos esfregaços corados pela reação de Feulgen.

Fonte: TOLBERT et al., 1992.

Previamente ao início da avaliação dos esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou modificada foi realizada calibragem dos examinadores com o professor orientador, obtendo-se um Kappa 0.49-0.89 para avaliação qualitativa e Kappa 0.82-0.85 para avaliação quantitativa. Para avaliação dos esfregaço corados pela reação de Feulgen foi realizada calibragem intra examinador ao início da quantificação, bem como no decorrer do estudo, dando um nível de coincidência de 85% para o teste t.

## ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise qualitativa dos esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou modificado foram utilizado os critérios de Papanicolaou e Traut (1947),

assim como os critérios de Bethesda 2001 modificado, estes valores foram expressos pela porcentagem.

Para a comparação da média das contagens de micronúcleos, cariorrexes e “Broken egg” e análise do padrão de maturação celular entre os grupos foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e subsequente identificação dos contrastes, com ajuste para comparações múltiplas, pelo teste não paramétrico de comparação múltipla. Na avaliação entre os sítios anatômicos foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedmann e subsequente identificação dos contrastes, com ajuste para comparações múltiplas, pelo teste não paramétrico de comparação múltipla (ZAR, 1999).

### **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Previamente à coleta do material, os indivíduos foram informados verbalmente e por escrito, pelo pesquisador, sobre a natureza do estudo. Foi obtido o termo de consentimento por escrito de todos os indivíduos que fizeram parte do estudo (ANEXO VII). No caso dos pacientes que apresentaram alterações celulares, estes foram avisados e engajados num programa de controle periódico na disciplina de Patologia Bucal da FO-UFRGS.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de pesquisa e ética da Faculdade de Odontologia da Universidade do Rio Grande do Sul, processo n° 84/02 e foi aprovado quanto ao método na disciplina de Seminário de Dissertação em 12 de março de 2002.

## RESULTADOS

A amostra deste estudo foi composta por 68 indivíduos, divididos em três grupos, Controle (21), Fumo (28) e Fumo/Álcool (19). A média de idades dos indivíduos foi de 44,6 anos (30 – 67). A média de idade dos indivíduos do grupo controle e do grupo fumo foi de 44 anos; no grupo fumo/álcool foi de 46 anos. Não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação à idade. (Análise de variância – ANOVA ( $p=0.40$ ) (Tabela 1).

Em relação à quantidade de cigarros fumados por dia, a média dos grupos fumo e fumo/álcool foi de 23,89 (10 – 60). Os indivíduos do grupo fumo apresentaram uma média de consumo de 20.83 cigarros/dia, e do grupo fumo/álcool 28.43 cigarros/dia. Não houve diferença estatística em relação ao número de cigarros fumados por dia entre os grupos fumo e fumo/álcool, segundo a análise de variância (ANOVA) (Tabela 1).

**Tabela 1: Características dos indivíduos. Porto Alegre. 2003**

	<i>Controle</i>	<i>DP</i>	<i>Fumo</i>	<i>DP</i>	<i>Fumo/ Álcool</i>	<i>DP</i>	<i>Total</i>
N	21		28		19		68
Idade (média)	43,76	8.4	42,57	8,28	45,65	8,24	43,82 (30 - 67)
Cigarros/dia (média)	0	0	20,83	10	28,43	14,9 6	23,89 (10 - 60)

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

## ANÁLISE QUALITATIVA

Os resultados obtidos através da análise qualitativa das lâminas coradas pela técnica de Papanicolaou Modificado mostraram que:

Nos indivíduos do grupo controle, 100% dos esfregaços do lábio foram de classe I. Na língua, tanto os esfregaços classe I como os classe II compreenderam 47,61% dos esfregaços, e 4,76% foram classificados como classe III. No soalho de boca, 47,61% dos esfregaços foram classificados como classe I, 42,85% como classe II e 9,52% como classe III.

Nos indivíduos do grupo fumo, no lábio, 88% dos esfregaços foram classificados como classe I e 12% como classe II. Na língua, 68% dos esfregaços foram classificados como classe I e 32% como classe II, e no soalho bucal, 56% foi classificado como classe I e 44% como classe II.

Nos indivíduos do grupo fumo/álcool, no lábio, assim como no soalho bucal, 87,5% dos esfregaços foram classificados como classe I e 12,5% como classe II. Na língua, 68,75% dos esfregaços foram classificados como classe I e 31,25% como classe II (Tabela 2).

**Tabela 2: Frequência dos esfregaços classificados segundo critérios de Papanicolaou e Traut modificados nos grupos controle, fumo e fumo/Álcool de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2003**

	<i>Controle</i>			<i>Fumo</i>			<i>Fumo/ Álcool</i>		
	Classe I	Classe II	Classe III	Classe I	Classe II	Classe III	Classe I	Classe II	Classe III
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Lábio</b>	100	0	0	88	12	0	87,5	12,5	0
<b>Língua</b>	47,61	47,61	4,76	68	32	0	68,75	31,25	0
<b>Soalho</b>	47,61	42,85	9,52	56	44	0	87,5	12,5	0

Fonte: Indivíduos atendidos no Serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Os resultados obtidos através da classificação dos esfregaços, segundo o Sistema de Bethesda 2001 modificado para mucosa bucal, foram:

Nos indivíduos do grupo controle, 100% dos esfregaços do lábio foram negativos para alteração maligna epitelial. Na língua, os esfregaços negativos para alteração maligna epitelial, como os negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias, compreenderam 47,61% dos esfregaços, e 4,76% foram classificados como com presença de anormalidade epitelial (ASCUS). No soalho de boca, 47,61% dos esfregaços foram classificados como negativos para alteração maligna, 42,85% como classe negativos para alteração maligna e 9,52% como classe ASCUS.

Nos indivíduos do grupo fumo e do grupo fumo/álcool, 100% dos esfregaços, na classificação geral, negativos para alteração maligna epitelial. Sendo que no grupo fumo, para o lábio, 88% dos esfregaços foram classificados como negativos para alteração maligna e 12% como negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias. Na língua, 68% dos esfregaços foram classificados como negativos para alteração maligna e 32% como negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias e, no soalho bucal, 56% foram classificado como negativos para alteração maligna e 44% como negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias.

Nos indivíduos do grupo fumo/álcool, no lábio, assim como no soalho bucal 87,5% dos esfregaços foram classificados como negativos para alteração maligna e 12,5% como negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias. Na língua, 68,75% dos esfregaços foram classificados como negativos para alteração maligna e 31,25% como negativos para alteração maligna com presença de células inflamatórias (Tabela 3).

**Tabela 3: Frequência dos esfregaços classificados segundo Sistema de Bethesda Modificado para mucosa bucal nos grupos controle, fumo e fumo/Álcool de acordo com o sítio anatômico. Porto Alegre. 2003.**

	<i>Controle</i>			<i>Fumo</i>			<i>Fumo/ Álcool</i>		
	NCM %	NCMI %	ASC %	NCM %	NCMI %	ASC %	NCM %	NCMI %	ASC %
<b>Lábio</b>	100	0	0	88	12	0	87,5	12,5	0
<b>Língua</b>	47,61	47,61	4,76	68	32	0	68,75	31,25	0
<b>Soalho</b>	47,61	42,85	9,52	56	44	0	87,5	12,5	0

Fonte: Indivíduos atendidos no Serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

## ANÁLISE QUANTITATIVA

### Avaliação do padrão de maturação celular

Os resultados obtidos pela análise quantitativa das lâminas coradas pela técnica de Papanicolaou modificado foram os seguintes:

Em relação às células anucleadas, quando comparou-se as médias entre os grupos, no lábio, pôde-se observar maior número de células anucleadas nos grupos fumo e fumo/álcool quando comparados ao grupo controle. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p=0,18$ ). Na língua, pôde-se observar um maior número de células anucleadas no grupo fumo/álcool, quando comparado ao grupo controle e ao fumo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p=0,22$ ). No soalho bucal, observou-se um menor número de células anucleadas no grupo fumo/álcool, quando comparado aos grupos controle e fumo ( $p=0,02$ ) (Tabela 4).

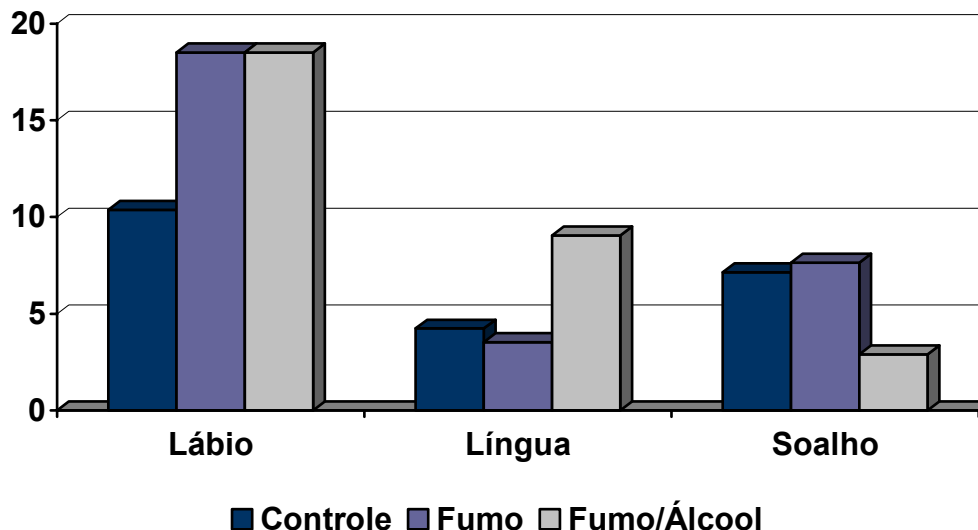
**Tabela 4: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação as células anucleadas.**

Grupo	<i>n</i>	Média (n° de células)	Desvio-padrão	Rank Médio	<i>p</i>
<b>Lábio</b>					
Controle	21	10,38	8,29	28,33	0,18
Fumo	28	18,5	16,36	38,02	
Fumo/Álcool	20	18,5	16,86	37,78	
<b>Língua</b>					
Controle	21	4,24	3,70	34,62	0,22
Fumo	28	3,53	3,12	30,98	
Fumo/Álcool	20	9,05	12,69	41,03	
<b>Soalho</b>					
Controle	21	7,14	10,08	37,36 <sup>A</sup>	0,03*
Fumo	28	7,64	9,67	40,09 <sup>A</sup>	
Fumo/Álcool	20	2,9	3,54	25,40 <sup>B</sup>	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

**Gráfico 1: Comparação das médias de células anucleadas entre os grupos.**



Fonte: Indivíduos atendidos no Serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Quando foram comparadas as médias das células anucleadas entre os sítios anatômicos no grupo controle, pôde-se observar diferença estatisticamente significante entre a média do número deste tipo celular no lábio, na borda de língua



e soalho bucal ( $p=0,04$ ). No grupo fumo, pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre a média da contagem deste tipo celular no lábio quando comparada com a borda da língua e soalho bucal ( $p=0,0001$ ). Assim como, no grupo fumo/álcool, pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre a média do número de células anucleadas no lábio e na borda da língua e soalho bucal ( $p=0,001$ ). As médias do número de células anucleadas, para todos os grupos, foram superiores no lábio quando comparado com a borda da língua e o soalho bucal. Não se observou diferença estatisticamente significativa quando comparou-se a borda da língua com o soalho bucal entre todos os grupos (Tabela 5).

**Tabela 5: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação às células anucleadas.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	21	10,38	8,29	2,40 <sup>A</sup>	0,04*
<i>Língua</i>	21	4,24	3,70	1,69 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	21	6,67	10,03	1,90 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	28	18,50	16,36	2,70 <sup>A</sup>	0,000*
<i>Língua</i>	28	3,53	3,12	1,41 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	28	7,64	9,67	1,89 <sup>C</sup>	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	20	18,50	16,86	2,58 <sup>A</sup>	0,001*
<i>Língua</i>	20	9,05	12,68	1,98 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	20	2,90	3,53	1,45 <sup>B</sup>	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Em relação às células superficiais com núcleo, quando foram comparadas as médias deste tipo celular entre os grupos, observou-se no lábio uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e fumo/álcool, sendo que os

valores do grupo controle foram superiores àqueles do grupo fumo/álcool ( $p=0,03$ ). Na língua, observou-se menor número de células superficiais com núcleo no grupo fumo/álcool quando comparado aos grupos controle e fumo ( $p=0,002$ ). Os valores do grupo fumo foram superiores àqueles dos grupos controle e fumo/álcool. No soalho bucal, não foram observadas diferenças estaticamente significantes entre os grupos para o número de células superficiais com núcleo ( $p=0.37$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação às células superficiais com núcleo.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
<b>Lábio</b>					
<i>Controle</i>	21	21,33	13,69	40,85 <sup>A</sup>	0,03*
<i>Fumo</i>	28	18,57	10,77	37,35 <sup>B</sup>	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	12,2	1,69	25,55 <sup>B</sup>	
<b>Língua</b>					
<i>Controle</i>	21	22,23	10,49	40,14 <sup>A</sup>	0,002*
<i>Fumo</i>	28	24,32	16,20	39,60 <sup>A</sup>	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	13,5	8,57	23,15 <sup>B</sup>	
<b>Soalho</b>					
<i>Controle</i>	21	12,08	7,55	40,02	0,37
<i>Fumo</i>	28	13,32	13,92	33,44	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	9,85	7,62	31,90	

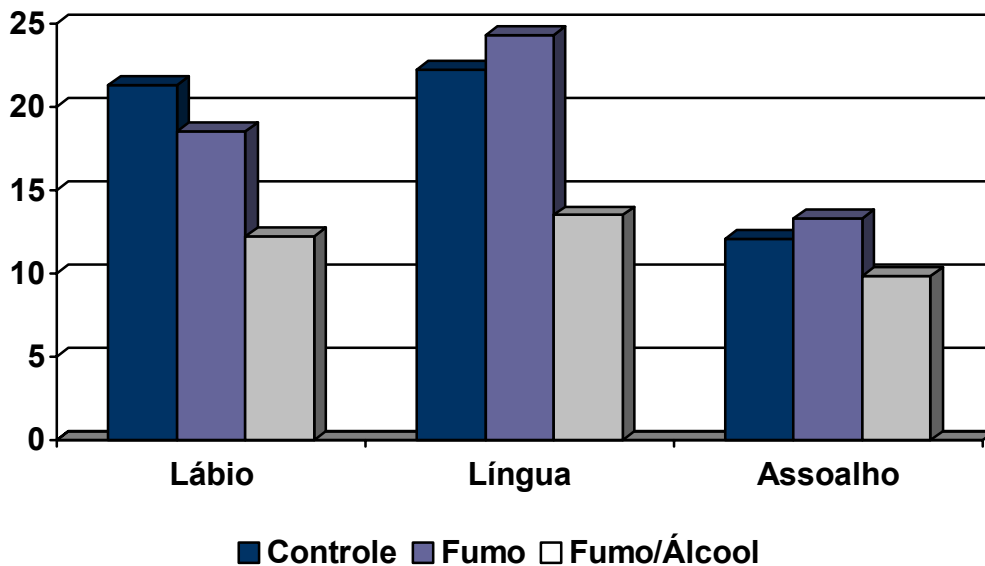
\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Quando foram comparadas as médias das células superficiais com núcleo entre os sítios anatômicos, no grupo controle, pôde-se observar diferença estaticamente significativa entre a média do número deste tipo celular no lábio, na borda de língua e no soalho bucal ( $p \leq 0,0001$ ). A média do número de células superficiais com núcleo foi menor no soalholábio quando comparado ao lábio inferior e a borda da língua.

No grupo fumo, pôde-se observar diferença estatística entre a média do número de células superficiais com núcleo da borda de língua, do lábio e do soalho bucal ( $p=0,001$ ). A média do número de células superficiais com núcleo foi superior na língua. No grupo fumo/álcool, não foi observada diferença estatística entre os sítios anatômicos em relação às médias de células superficiais com núcleo (Tabela 7).

**Gráfico 2: Comparação entre as médias do número de células superficiais com núcleo entre os grupos.**



Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

**Tabela 7: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação às células superficiais com núcleo.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i> <i>(n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank</i> <i>Médio</i>	<i>p</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	21	21,33	13,69	2,24 <sup>A</sup>	0,008*
<i>Língua</i>	21	22,23	10,49	2,31 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	21	12,08	7,55	1,45 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	28	18,57	10,77	1,91 <sup>A</sup>	0,001*
<i>Língua</i>	28	25,32	16,20	2,52 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	28	13,32	13,92	1,57 <sup>A</sup>	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	20	12,20	1,69	2,05	0,40
<i>Língua</i>	20	13,50	8,57	2,17	
<i>Soalho</i>	20	9,85	7,62	1,77	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas

Fonte: Indivíduos atendidos no Serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

**Tabela 8: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação às células intermediárias.**

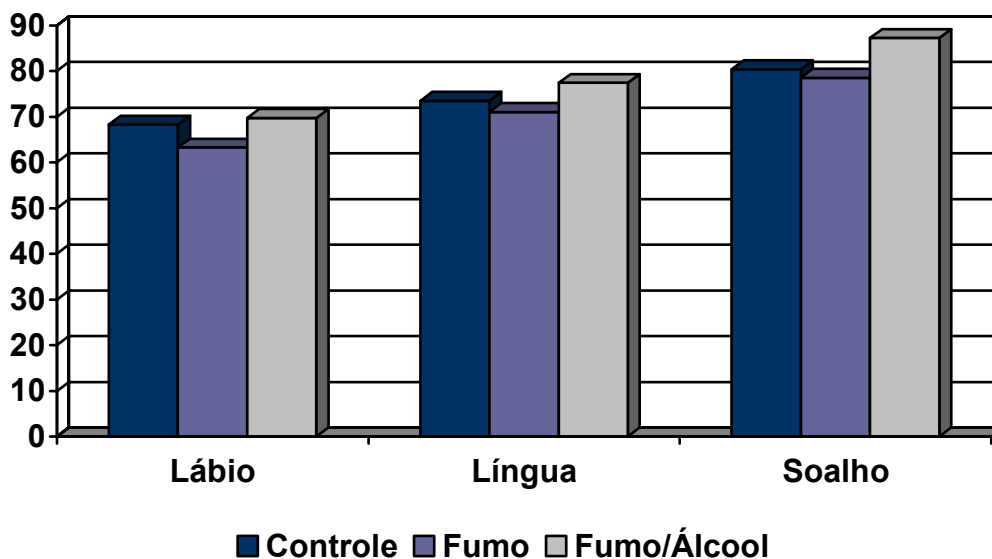
<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i> <i>(n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank</i> <i>Médio</i>	<i>p</i>
<b>Lábio</b>					
<i>Controle</i>	21	68,28	17,94	30,02	0,27
<i>Fumo</i>	28	63,25	17,08	30,41	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	69,75	19,24	39,3	
<b>Língua</b>					
<i>Controle</i>	21	73,52	10,88	18,83	0,35
<i>Fumo</i>	28	71	17,05	32,53	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	77,4	13,71	40,42	
<b>Soalho</b>					
<i>Controle</i>	21	80,38	14,67	32,35	0,12
<i>Fumo</i>	28	78,57	15,80	31,50	
<i>Fumo/Álcool</i>	20	87,25	8,17	42,67	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Em relação às células intermediárias, quando foram comparados os grupos em um mesmo sítio anatômico, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média do número deste tipo celular no lábio, na borda de língua e no soalho bucal (Tabela 8). Quando foram comparadas as médias das células intermediárias entre os sítios anatômicos, nos diferentes grupos, pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle, fumo e fumo/álcool. As médias do número de células intermediárias no soalho bucal foram superiores quando comparada ao lábio e à borda de língua em todos os grupos estudados ( $p \geq 0.01$ ) (Tabela 9).

**Grafico 3: Comparação entre as médias do número de células intermediárias entre os grupos.**



Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

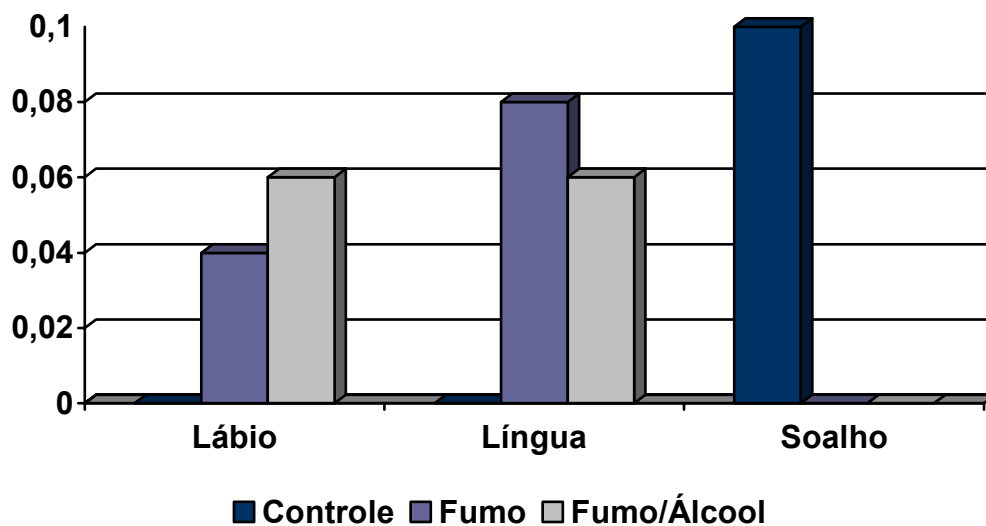
**Tabela 9: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação às células intermediárias.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i> <i>(n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank</i> <i>Médio</i>	<i>p</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	21	68,28	17,94	1,69 <sup>A</sup>	0,04*
<i>Língua</i>	21	73,52	10,89	1,88 <sup>AB</sup>	
<i>Soalho</i>	21	80,38	14,67	2,43 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	28	63,25	17,08	1,52 <sup>A</sup>	0,001*
<i>Língua</i>	28	71,00	17,05	1,95 <sup>A</sup>	
<i>Soalho</i>	28	78,57	15,80	2,54 <sup>B</sup>	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	20	69,75	19,24	1,60 <sup>A</sup>	0,01*
<i>Língua</i>	20	77,40	13,71	1,90 <sup>AB</sup>	
<i>Soalho</i>	20	87,25	8,17	2,50 <sup>B</sup>	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo teste de comparações múltiplas

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

**Gráfico 4: Comparação entre as médias do número de células parabasais entre os grupos.**



Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Em relação às células parabasais, quando foram comparados os grupos em um mesmo sítio anatômico, não observou-se diferenças entre as médias dos grupos controle, fumo e fumo/álcool. (GRÁFICO 4.)

### **Técnica de micronúcleos**

A contagem média de células micronucleadas variou na amostra entre 0,14 e 1,52 micronúcleos/1.000 células. No grupo controle a variação foi de 0,14 e 0,95 micronúcleos/1.000 células; no grupo fumo, variou entre 0,36 e 1,10 micronúcleos/1.000 células e no grupo fumo/álcool, variou entre 0,79 e 1,52 micronúcleos/1.000 células.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias de micronúcleos entre os grupos nos sítios anatômicos estudados (Tabela10). De maneira geral as médias de micronúcleos no grupo fumo/álcool nos diferentes sítios anatômicos, mostraram-se superiores às do grupo controle e fumo, assim como as médias do grupo fumo nos diferentes sítios anatômicos mostraram-se superiores às do grupo controle (Gráfico 5).

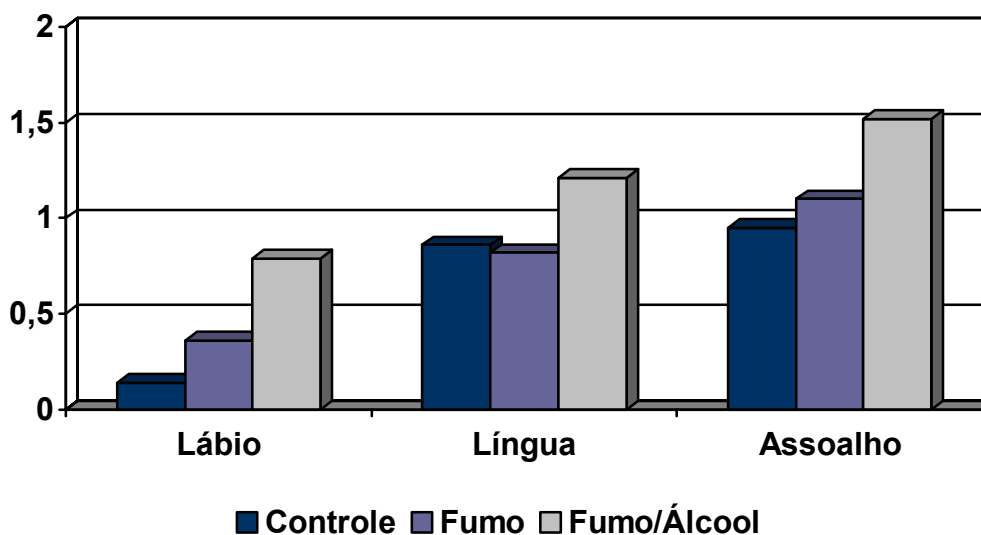
Tabela 10: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de micronúcleos em 1.000 células.

<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
<b>Lábio</b>					
<i>Controle</i>	21	0,14	0,36	30,36	0,172
<i>Fumo</i>	28	0,36	0,68	34,38	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	0,79	1,23	39,26	
<b>Língua</b>					
<i>Controle</i>	21	0,86	1,06	35,07	0,47
<i>Fumo</i>	28	0,82	1,49	31,66	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	1,21	1,51	38,05	
<b>Soalho</b>					
<i>Controle</i>	21	0,95	1,24	32,62	0,67
<i>Fumo</i>	28	1,10	1,47	33,80	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	1,52	2,29	37,61	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Gráfico 5: Comparação das médias dos MN entre os grupos.



Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.



Quando foram comparadas as médias do número de células com micronúcleos entre os diferentes sítios anatômicos, pôde-se observar que estas foram superiores no soalho de boca em relação ao lábio e à borda da língua, em todos os grupos estudados. Semelhantemente, as médias de micronúcleos foram superiores na língua quando comparadas com o lábio, em todos os grupos estudados. Foi observada diferença estatisticamente significante entre as médias de micronúcleos do soalho bucal quando comparadas ao lábio e borda de língua apenas no grupo controle (Tabela 11).

**Tabela 11: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre sítios em relação ao número de Micronúcleos em 1000 células.**

<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	21	0,14	0,36	1,57 <sup>A</sup>	0,009*
<i>Língua</i>	21	0,86	1,06	2,21 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	21	0,95	1,24	2,21 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	28	0,36	0,68	1,79	0,07
<i>Língua</i>	28	0,82	1,49	1,98	
<i>Soalho</i>	28	1,10	1,47	2,23	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	19	0,79	1,23	1,82	0,45
<i>Língua</i>	19	1,21	1,51	2,09	
<i>Soalho</i>	19	1,52	2,29	2,09	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

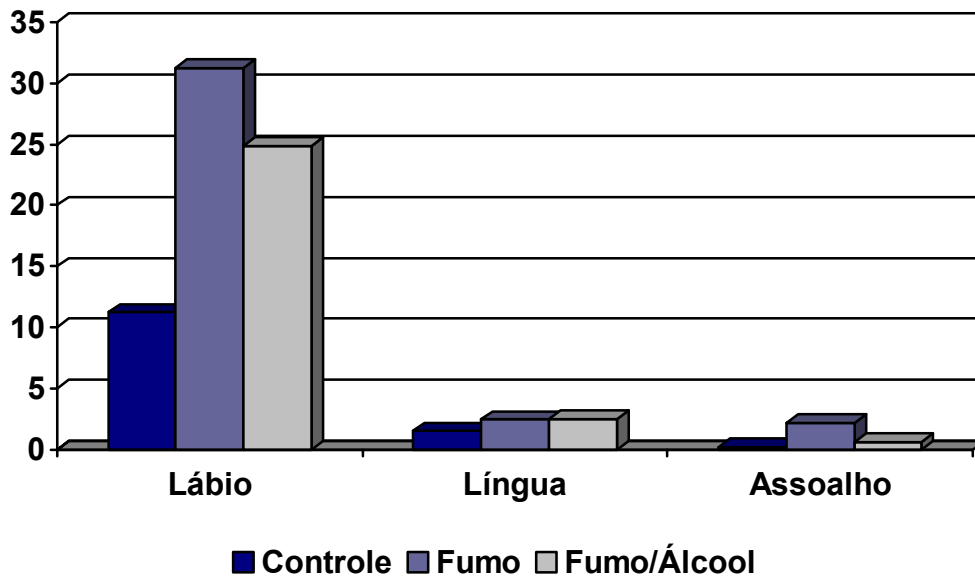
**Tabela 12: : Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de células em cariorrexe/1.000 células.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i> <i>(n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank</i> <i>Médio</i>	<i>p</i>
<b>Lábio</b>					
<i>Controle</i>	21	11,24	18,18	26,31	0,066
<i>Fumo</i>	28	31,21	40,30	37,13	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	24,84	28,82	39,68	
<b>Língua</b>					
<i>Controle</i>	21	1,52	2,38	31,40	0,655
<i>Fumo</i>	28	2,46	3,81	35,59	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	2,53	3,63	36,32	
<b>Soalho</b>					
<i>Controle</i>	21	0,24	1,09	31,29	0,052
<i>Fumo</i>	28	2,18	11,14	33,09	
<i>Fumo/Álcool</i>	19	0,63	1,06	40,13	

Fonte: Indivíduos atendidos no Serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

A média do número de células em cariorrexe na amostra variou de 0,24 a 31,21. No grupo controle variou de 0,24 a 11,24 células em cariorrexe/1.000 células. No grupo fumo variou de 2,18 a 31,21 células em cariorrexe/1.000 células, enquanto que no grupo fumo/álcool variou de 0,63 a 24,84 células em cariorrexe/1.000 células (Tabela 12).

Quando comparou-se as médias do número de células em cariorrexe entre os grupos, não foram observadas diferenças estaticamente significantes (Tabela 12). No entanto, para os três sítios anatômicos estudados, no grupo fumo e fumo/álcool, as médias do número de células em cariorrexe foram superiores às do grupo controle, sendo que, nos grupos expostos, as médias de células em cariorrexe no lábio foram 2.2-2.7 vezes maiores que no grupo não exposto, na borda de língua, 1.61-1.66 vezes maiores que no grupo não-exposto e, no soalho bucal, 2.26-9.08 vezes maiores que no grupo não-exposto. (GRÁFICO 6).

**Gráfico 6: Comparação das médias das células em cariorexe entre os grupos.**

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

Quando comparou-se as médias das células em cariorexe entre os sítios anatômicos, em todos os grupos, estas foram superiores no lábio quando comparadas com a borda da língua e o soalho bucal. Em todos os grupos estudados, pôde-se observar diferença estatisticamente significantes entre a média do número deste tipo celular no lábio comparada à borda de língua e ao soalho bucal ( $p \leq 0,001$ ). Não se observou diferença estatisticamente significativa quando comparou-se a contagem de células da borda de língua e do soalho bucal em qualquer dos grupos (Tabela 13).

**Tabela 13 : Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre os grupos em relação ao número de células em cariorrexe/1.000 células.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i> ( <i>n° de células</i> )	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank</i> <i>Médio</i>	<i>p</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	21	11,24	18,18	2,63 <sup>A</sup>	0,000*
<i>Língua</i>	21	1,52	2,38	1,92 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	21	0,24	1,09	1,45 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	28	31,21	40,30	2,75 <sup>A</sup>	0,000*
<i>Língua</i>	28	2,46	3,81	1,86 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	28	2,18	11,14	1,39 <sup>C</sup>	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	20	24,84	28,82	2,95 <sup>A</sup>	0,000*
<i>Língua</i>	20	2,53	3,63	1,71 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	20	0,63	1,06	1,34 <sup>B</sup>	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

As médias de “broken eggs” na amostra variaram de 0,08 a 9,44 “broken eggs”/1000 células. No grupo controle variou de 0,83 a 9,44 “broken eggs”/1.000 células. No grupo fumo variou de 0,30 a 4,7 “broken eggs”/1000 células. No grupo fumo/álcool variou de 0,08 a 2 “broken eggs”/1.000 células (Tabela 13).

No lábio, quando comparou-se as médias de “broken eggs” entre os grupos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e fumo/álcool, sendo que a média do grupo controle foi superior à do grupo fumo/álcool (0,83 e 0,08 “broken eggs”/1.000 células respectivamente) ( $p=0,01$ ). Foi observado um maior número de “broken eggs” no grupo controle em relação ao grupo fumo e no grupo fumo em relação ao grupo fumo/álcool.

Quando foram comparadas as médias de “broken eggs” entre os grupos, na língua, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e fumo/álcool, sendo que a média do grupo controle foi superior à do grupo

fumo/álcool (6,06 e 2,08 “broken eggs”/1.000 células respectivamente) ( $p=0,01$ ). Foi observado um menor número de “broken eggs” no grupo controle; comparado ao grupo fumo e no grupo fumo em relação ao grupo fumo/álcool.

No soalho de boca, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias de “broken eggs” nos grupos. No entanto, a média de “broken eggs” do grupo controle foi superior à observada nos grupos fumo e fumo/álcool. No entanto, como foi muito próximo do significativo ( $p=0,06$ ), talvez com uma amostra maior, alguma diferença poderia ser detectada estatisticamente (Tabela 14).

**Tabela 14: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos em relação ao número de broken eggs/1.000 células.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
<b>Lábio</b>					
<i>Controle</i>	18	0,83	1,04	32,00 <sup>B</sup>	0,01*
<i>Fumo</i>	19	0,30	0,73	24,00 <sup>B</sup>	
<i>Fumo/Álcool</i>	13	0,08	0,28	20,77 <sup>A</sup>	
<b>Língua</b>					
<i>Controle</i>	18	6,06	6,07	33,92 <sup>B</sup>	0,01*
<i>Fumo</i>	19	4,7	9,10	22,67 <sup>B</sup>	
<i>Fumo/Álcool</i>	13	2,08	2,40	20,15 <sup>A</sup>	
<b>Soalho</b>					
<i>Controle</i>	18	9,44	12,98	32,50	0,06
<i>Fumo</i>	19	2,8	4,38	22,55	
<i>Fumo/Álcool</i>	13	2	2,24	22,31	

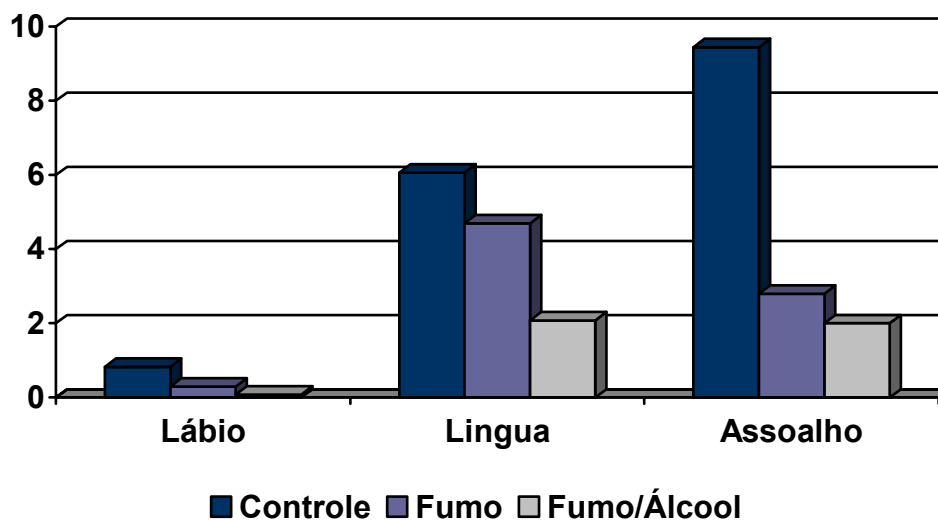
\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

De maneira geral, as médias de “broken eggs” no grupo controle nos diferentes sítios anatômicos, mostraram-se superiores às do grupo fumo e

fumo/álcool. Da mesma forma, as médias do grupo fumo nos diferentes sítios anatômicos mostraram-se superiores às do grupo fumo/álcool (Gráfico 7).

**Gráfico 7 : Comparação das médias dos “Broken eggs” entre os grupos.**



Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2003.

Quando comparou-se as médias de “broken eggs” entre os sítios anatômicos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados. No grupo controle, a média de “broken eggs” no soalho bucal foi estatisticamente superior à do lábio e da borda de língua, assim como a média da língua foi estatisticamente superior à do lábio ( $p \leq 0,001$ ). No grupo fumo, a média de “broken eggs” na borda de língua foi estatisticamente superior à do lábio e do soalho bucal, assim como a média do soalho bucal foi estatisticamente superior à do lábio ( $p = 0,002$ ). No grupo fumo/álcool, a média de “broken eggs” no soalho bucal foi estatisticamente superior à do lábio, assim como a média da língua foi estatisticamente superior à do lábio ( $p = 0,01$ ). Não foi observada diferença

estatisticamente significativa entre as médias de “broken eggs” na borda de língua quando comparada ao soalho bucal no grupo fumo/álcool (Tabela 15).

**Tabela 15: Resultados do teste não-paramétrico de Friedman para a comparação entre os grupos em relação ao número de Broken eggs/1.000 células.**

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média (n° de células)</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
<b>Controle</b>					
<i>Lábio</i>	18	0,83	1,04	1,28 <sup>A</sup>	0,000*
<i>Língua</i>	18	6,06	6,07	2,42 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	18	9,44	12,98	2,31 <sup>B</sup>	
<b>Fumo</b>					
<i>Lábio</i>	19	0,30	0,73	1,45 <sup>A</sup>	0,002*
<i>Língua</i>	19	4,7	9,10	2,45 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	19	2,80	4,38	2,10 <sup>B</sup>	
<b>Fumo/álcool</b>					
<i>Lábio</i>	13	0,08	0,28	1,46 <sup>A</sup>	0,01*
<i>Língua</i>	13	2,08	2,40	2,38 <sup>B</sup>	
<i>Soalho</i>	13	2,00	2,24	2,15 <sup>B</sup>	

\*Diferença significativa entre os grupos – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo teste de comparações múltiplas.

Fonte: Indivíduos atendidos no serviço de saúde do DMAE e no serviço de triagem da FO-UFRGS. Porto Alegre, 2002/2003.

---

## DISCUSSÃO

A ciência evoluiu bastante nos últimos anos em relação ao conhecimento sobre a etiologia e etiopatogenia, métodos de diagnóstico e de tratamento do câncer de boca. No entanto, as estimativas de novos casos de câncer de boca no Brasil mostram-se mais elevadas a cada ano, como pode-se constatar pelos dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2003. Dessa forma, faz-se necessária a implementação de programas que visem a prevenção do câncer de boca, bem como estudos com biomarcadores que possam ser utilizados para o monitoramento das alterações celulares precedentes ao surgimento das neoplasias bucais principalmente em populações expostas a carcinógenos (OGDEN, 1997).

A partir desses dados, justifica-se o delineamento do estudo com a finalidade de avaliar as alterações celulares encontradas na mucosa bucal de indivíduos expostos a carcinógenos, como o álcool e o fumo. Foi utilizada a técnica de citopatologia para a coleta das células e a coloração de Papanicolaou Modificado para a avaliação qualitativa e quantitativa do padrão celular. Para a avaliação de dano genético nas células epiteliais da mucosa bucal foi utilizada a técnica de micronúcleos.

O descrédito em relação à utilização da citopatologia como método de diagnóstico das lesões bucais nos anos 60 e 70 já está bastante estabelecido e justificado. Atualmente, com as técnicas quantitativas e de biologia molecular, surge uma nova utilidade para a citopatologia como método de detecção precoce do câncer de boca. No entanto, ainda é necessário estabelecer o destino da



---

citopatologia em boca, de método de pesquisa para a prática clínica de rotina (OGDEN, 1997).

No presente estudo, foi utilizada a espátula de madeira para a coleta citológica. Com esse método de coleta, foi encontrado um número insuficiente de células em muitos esfregaços e/ou sobreposição celular exacerbada, principalmente naqueles coletados da mucosa do lábio inferior. Esse problema levou à invalidação da análise de muitos esfregaços, acarretando na diminuição da amostra. OGDEN, COWPE e GREEN (1992) e JONES et al. (1994), em seus estudos, mostraram que a utilização do “cytobrush” em citopatologia bucal apresentou resultados superiores aos da espátula de madeira em relação à qualidade do esfregaço, recomendando a sua utilização para diagnóstico citopatológico em boca.

A avaliação qualitativa dos esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou modificado mostrou que as variações nos padrões celulares são pequenas, compreendendo exclusivamente a presença ou ausência de células inflamatórias. No grupo controle, foram encontrados esfregaços classe III de Papanicolaou, um na borda de língua (4,76%) e dois no soalho de boca (9,52%). Sendo que dois dos esfregaços classe III, foram diagnosticados em um mesmo paciente. Achados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por KAPCZINSKI (1997), ANDRADE E SILVA (1997), ROMANINI (1999), SOARES PINTO (2001), CANÇADO, YURGEL e SANT’ANNA (2001), os quais obtiveram somente diagnósticos citopatológicos classes I e II. ROMANINI (1999) constatou dois esfregaços citopatológicos em borda de língua e dois em soalho bucal classe III em não-fumantes e SOARES PINTO (2001) observou um esfregaço citopatológico classe III em soalho bucal de fumante. Esses achados revelam que a classificação

de PAPANICOLAOU e TRAUT (1947), necessita de uma amostra maior para detectar alterações celulares prévias ao aparecimento clínico do câncer de boca.

Em 1988, com o intuito de melhorar e unificar a terminologia utilizada para o diagnóstico citopatológico cervical/vaginal, a divisão de Controle e Prevenção de Câncer do Instituto Nacional do Câncer (NCI) organizou em Bethesda, Maryland, um encontro para revisar a terminologia existente e estabelecer métodos efetivos de classificação para serem utilizados nos laudos citopatológicos. A partir desse encontro, surgiu um novo sistema de classificação dos diagnósticos citopatológicos cervicais e vaginais, modificado novamente em 1991 e 2001. No presente estudo, foi buscada a adaptação do Sistema de Bethesda 2001, utilizado para a classificação dos diagnósticos citopatológicos cervicais e vaginais, para ser aplicada na classificação dos esfregaços citopatológicos de boca. Dessa forma, os esfregaços também foram classificados qualitativamente, segundo o Sistema de Bethesda 2001 modificado para mucosa bucal. Na adequação do espécime, os esfregaços foram considerados satisfatórios para avaliação ou não-satisfatórios para avaliação. Na classificação geral, os esfregaços foram considerados negativos para alteração epitelial maligna ou com presença de anormalidade epitelial. Na interpretação do resultado negativo para alteração maligna epitelial, foram também considerados a presença de fungo (*Cândida*), bactérias e células inflamatórias. Para a determinação de um resultado com presença de anormalidade epitelial, foi considerada a presença de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), no caso dos esfregaços citopatológicos de boca, células parabasais. As demais alterações caracterizadas no Sistema de Bethesda 2001, como esfregaço suspeito de malignidade, não foram encontradas neste estudo em citologia bucal, pois estas são

encontradas apenas em esfregaços de lesões clinicamente visíveis, não necessitando assim de predição de risco e sim de indicação da biópsia total ou parcial (conforme indicação). Os resultados classificados com o Sistema de Bethesda 2001, modificado para mucosa bucal mostraram que 3 esfregaços foram classificados como ASC, sendo os 3 do grupo controle, 1 (4,76%) em borda de língua e 2 (9,52%) em soalho de boca. 100% dos esfregaços do grupo fumo e do grupo fumo/álcool, na borda de língua e no soalho de boca foram classificados como negativos para alteração maligna epitelial (Tabela 3).

Considerando que o Sistema de Bethesda nunca foi utilizado na citopatologia bucal estes resultados demonstram que este sistema de classificação também necessita de uma maior amostra para detectar alterações celulares prévias ao aparecimento de lesão clinicamente visível em boca. Apesar da tentativa de diminuir a discordância nos diagnósticos citopatológicos através da padronização da terminologia empregada para interpretação dos achados citopatológicos, ainda faz-se necessária a realização de estudos de correlação histocitopatológica, para melhor estabelecer e adaptar os critérios do Sistema de Bethesda 2001 para os esfregaços citopatológicos de boca, porém os resultados se sobrepuseram aos achados da classificação de Papanicolaou.

A aplicação mais recente de técnicas quantitativas em citopatologia bucal contribuiu para estimular o interesse e reavaliar o emprego dessa técnica na cavidade bucal (OGDEN, COWPE e WIGHT, 1997). Uma grande quantidade de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas têm sido aplicadas às pesquisas em citopatologia. Com a avaliação do padrão de maturação epitelial, através da quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados nos esfregaços

citopatológicos, buscou-se avaliar o padrão de maturação celular nos indivíduos expostos ao fumo e ao álcool.

Comparando esses achados com os da literatura, observa-se uma alteração no padrão de maturação celular que ocorre de forma aleatória, ou seja, não ocorre de maneira uniforme nos sítios anatômicos estudados, comprometendo dessa forma a utilização da avaliação de maturação celular para detecção de alterações celulares prévias ao aparecimento do câncer de boca. Analisando os achados de ZIMMERMANN e ZIMMERMANN (1965), MEYER, RUBINSTEIN e MEDAK (1970), HILLMAN e KISSIN (1976), BALÁEZ, DIAS e PÉRES (1986 e 1989), KAPCZINSKI (1997) e ANDRADE E SILVA (1997), também encontraram alterações no padrão de maturação do epitélio da mucosa bucal de forma aleatória nos indivíduos expostos aos agentes físicos e químicos do fumo.

Na comparação entre os sítios anatômicos foi observado que estes apresentam padrão de maturação celular diferentes, concordando com CARVALHO (2000). Foram observados um maior número estatisticamente significativo de células anucleadas no lábio inferior, quando comparado à borda de língua e ao soalho de boca em todos os grupos estudados, bem como, foram observados um maior número estatisticamente significativo de células intermediárias no soalho bucal quando comparado com o lábio inferior e a borda de língua em todos os grupos estudados.

A associação de técnicas citogenéticas à citopatologia bucal também contribui para melhorar a sensibilidade de detecção de alterações celulares incipientes ao aparecimento de lesão clinicamente visível. A técnica de quantificação de células micronucleadas tem sido empregada na citopatologia de boca para o

biomonitoramento de populações expostas a carcinógenos, dentre eles o fumo e o álcool, bem como para detectar substâncias mutagênicas e carcinogênicas (STICH, CURTIS e PARIDA, 1982; STICH e ROSIN, 1983; SARTO et al., 1987; TOLBERT, SHY e ALLEN, 1991; HOLLAND et al., 1996; DESAI et al., 1996; BLOCHING et al., 2000, DIETZ et al., 2000, GATTÁS et al., 2001). Micronúcleos são estruturas constituídas de material genético perdido durante a mitose devido a alterações clastogênicas (formadas por alterações da cinética do fuso mitótico) ou aneugênico (conseqüentes à aneuploidia) ocorridas no genoma da célula (BLOCHING et al., 2000). Os micronúcleos podem ser constituídos por fragmentos de cromossomos ou por cromossomos inteiros (FENECH, 2000; HOLLAND et al., 1996). Dessa forma, a frequência de micronúcleos é capaz de medir tanto a quebra cromossômica como a perda cromossômica, sendo considerada indicadora de dano genético (FENECH, 1999).

Na análise das células micronucleadas, os resultados do presente estudo não demonstraram diferença estatisticamente sigificante entre as médias de micronúcleos nos indivíduos expostos a carcinógenos, em todos os sítios anatômicos estudados. No entanto, pode-se constatar uma tendência no aumento do dano genético (MN) em relação ao aumento da exposição a carcinógenos. Os indivíduos fumantes apresentaram médias superiores aos indivíduos do grupo controle, assim como, os indivíduos expostos ao álcool e ao fumo, apresentaram médias de células micronucleadas superiores ao grupo controle e ao grupo fumo.

Considerando o tamanho da amostra, e que a ocorrência de MN por indivíduo é um evento raro (mutação espontânea) que exhibe distribuição aleatória, a técnica de MN provavelmente não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente

significante no número de micronúcleos em indivíduos expostos ao álcool e/ou ao fumo devido ao número baixo de células quantificadas.

SITCH e ROSIN (1983), encontraram aumento significativo apenas nos indivíduos que fumavam e consumiam bebidas alcoólicas, não foi observado aumento significativo nos indivíduos que fumavam até mais de 60 cigarros por dia, assim como nos indivíduos que tinham o hábito de ingerir diariamente bebidas alcoólicas em grande quantidade.

Na comparação entre os grupos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias de micronúcleos do soalho bucal quando comparadas ao lábio e a borda de língua no grupo controle (Tabela 11). No entanto, foi observada uma tendência ao maior número de células com micronúcleos no soalho de boca em relação ao lábio e à borda da língua, bem como na língua, quando comparada com o lábio em todos os grupos estudados. Estes resultados apontam o soalho bucal como sítio anatômico mais afetado por agentes carcinógenos, como os presentes no álcool e no fumo. Considerando que o álcool ingerido permanece por maior tempo em contato com a mucosa bucal do soalho de boca, este comporta-se como um “reservatório” para essas substâncias. Além disso, o soalho de boca representa o sítio anatômico com menor grau de ceratinização, facilitando ainda mais a penetração de substâncias (SQUIER e HALL, 1986).

No presente estudo, seguindo o protocolo de TOLBERT (1992), além da quantificação dos micronúcleos, foram quantificados os números de células em cariorrexe e o número de “broken eggs”. Os resultados deste estudo mostraram que quando foram comparadas as médias de células em cariorrexe entre os grupos, os indivíduos expostos (fumo e fumo/álcool) apresentaram maior número de células em

cariorrexe que os não-expostos (controle). Estes achados concordando com os resultados dos estudos de TOLBERT (1991), que encontrou maior número de cariorrexe nos usuários de rapé, bem como RAMIREZ (2000), que encontrou maior número de células em cariorrexe nos indivíduos expostos ao álcool.

O lábio inferior e o soalho de boca de fumantes apresentaram as maiores médias de células em cariorrexe, sugerindo maior dano citogenético (maior quantidade de células em necrose e ceratinização), bem como à genotoxicidade, pela maior quantidade de células em apoptose (RAMIREZ, 2000).

Na comparação entre os sítios anatômicos, o lábio inferior apresentou maior número estatisticamente significativo de células em cariorrexe em todos os grupos, quando comparado com os outros sítios anatômicos estudados ( $p \leq 0,001$ ). O lábio representa o sítio anatômico de maior grau de ceratinização, bem como o sítio mais exposto a agressões externas, justificando dessa forma a maior quantidade de células em cariorrexe. Esses achados têm maior respaldo com os achados encontrados na avaliação do padrão de maturação celular para as células anucleadas (Tabelas 4, 5, 12 e 13), podendo-se confirmar a relação da cariorrexe com a ceratinização ocorrida no epitélio bucal, visto que os ceratinócitos no processo de maturação têm o seu núcleo destruído (HADLER, 1993).

A avaliação da quantidade de “broken eggs” nos esfregaços citopatológicos, mostrou que os indivíduos não expostos ao álcool e fumo (grupo controle) apresentaram, no lábio inferior e na borda da língua, um número maior, estatisticamente significativo, de células com esse tipo de anomalia. No soalho bucal, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, também as médias no grupo controle foram superiores às encontradas nos grupos fumo e fumo/álcool.

---

RAMIREZ (2000), observou que a região contra-lateral do tumor e a região ao redor da mucosa do tumor dos pacientes apresentaram as freqüências mais baixas das anomalias nucleares, quando comparadas ao grupo controle, levando em consideração os sítios anatômicos estudados.

Neste estudo, as menores freqüências de “broken eggs” e as maiores freqüências de MN ocorreram nos indivíduos expostos ao álcool e ao fumo, assim como no soalho de boca em relação aos sítios anatômicos estudados. RAMIRES (2000) encontrou maiores freqüências de MN e menores freqüências de anomalias nucleares na região que apresentava neoplasia, sugerindo que a freqüência de MN têm uma relação inversa com a freqüência de anomalias nucleares. No presente estudo podemos concordar com essa afirmação em relação aos “broken eggs” e MN.

Em 1992, TOLBERT descreveu os “broken eggs” como uma forma nuclear bastante anômala da qual não se sabe origem ou significado. RAMIRES (2000), afirma que os BE possam representar uma primeira alteração nuclear, provavelmente uma resposta adaptativa à ação do agente clastogênico, e, quando essa ação é intensificada, “o fio Feulgen positivo” do BE provavelmente rompe-se, originando um MN. No entanto, em uma análise mais detalhada dessa alteração nuclear, podemos constatar que o material genético nuclear é distribuído de maneira inconstante nas duas porções conectadas pelo “fio Feulgen positivo” ou ponte nucleoplásmica (FIGURAS 14 e 15). Em alguns casos, uma porção muito pequena de material genético está conectada ao núcleo principal. No entanto, em outros casos, a estrutura conectada ao núcleo principal representa mais da metade do volume do núcleo celular. Nesse último, caso a ponte nucleoplásmica rompesse



geraria uma estrutura incompatível com MN, se considerarmos os critérios de SARTO (1987).

FENECH (2000) e FENECH e CROTT (2002) e TOMAS, UMEGAKI e FENECH (2003) descrevem a formação de pontes nucleoplásmicas em linfócitos, originadas provavelmente quando os centrômeros de cromossomos discêntricos são puxados para pólos opostos durante a anáfase e o DNA resultante da ponte é recoberto pela membrana nuclear. No entanto, esse tipo de alteração é vista em linfócitos binucleados, ficando difícil de extrapolar para células epiteliais, morfológica e fisiologicamente distintas.

Outra possibilidade é que essa anomalia represente, amplificação gênica ou os chamados “nuclear buds”, que também estão relacionados à formação de micronúcleos e representam regiões amplificadas de DNA (SHIMIZU et al., 1988 e 2000).

Levando em consideração que o epitélio de revestimento da mucosa bucal está constantemente exposto a diferentes tipos de agentes agressores e responde à eles conforme a intensidade da agressão, os micronúcleos, como as anomalias nucleares, representam diferentes respostas do epitélio de revestimento da mucosa bucal frente às injúrias provocadas nesse tecido (TOLBERT et al., 1992). Quando ocorre uma agressão de baixa intensidade, a célula é capaz de reparar o dano provocado no seu genoma, não levando adiante os danos que eventualmente possam ter ocorrido. Na agressão moderada, os danos não-reparados poderiam ser eliminados através da ativação dos mecanismos de morte celular e, no caso de uma agressão mais intensa, o dano genético poderia não ser reparado, bem como os mecanismos de morte celular não seriam ativados, acarretando a permanência do dano genético e, conseqüentemente, maior formação dos MN (STICH et al., 1982).

Os resultados do presente estudo encontraram maiores freqüências de MN nos indivíduos expostos a agentes carcinogênicos e, uma maior freqüência de BE nos indivíduos não-expostos, sugerindo, em nossa opinião, que o “broken egg” possa representar uma tentativa de reparo de DNA, através da exclusão de material genético danificado ou represente uma anomalia nuclear conseqüente a uma agressão de baixa intensidade. No entanto, essas hipóteses necessitam ser testadas em futuros estudos. Apesar dessas suposições, ainda não se chegou a um consenso em relação à origem e significado dos “broken eggs”. Devido à grande freqüência desse tipo de alteração nuclear nos esfregaços citopatológicos de boca, faz-se necessária a realização de mais estudos específicos em células epiteliais da mucosa bucal, com a finalidade de esclarecer os mecanismos responsáveis pela sua formação e seu significado.

Os critérios para utilização da técnica de análise de micronúcleos, os mecanismos responsáveis pela sua formação assim como, as outras anomalias nucleares encontradas, já foram bastante estudadas em linfócitos. No caso dessa técnica aplicada as células esfoliadas da mucosa bucal, alguns pontos ainda necessitam de elucidação. Dentre eles, a determinação de critérios para quantificação dos MN e das anomalias nucleares, a validação desta técnica através da definição de parâmetros de normalidade para os micronúcleos e anomalias nucleares, bem como, a aplicação de técnicas moleculares, como FISH, técnica do cometa e avaliação de ploidia para melhor entender os mecanismos de formação dos MN e BE (HOLLAND, 2003).

Para finalizar, queremos reforçar que a quantificação de células micronucleadas se limita ao biomonitoramento de populações expostas a agentes

genotóxicos como o fumo e o álcool através da detecção de dano genético, não sendo capaz de prever o desenvolvimento de neoplasias. Ela é capaz de detectar uma população mais predisposta ao desenvolvimento de mutações que, quando estas ocorrerem em genes específicos, como oncogenes e genes supressores de tumor, possam levar a progressão neoplásica.

## CONCLUSÕES

- Apesar da constatação de alteração no padrão de maturação celular na borda da língua de fumantes e no lábio inferior e no soalho de boca de indivíduos que têm o hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas diariamente, a avaliação do padrão de maturação celular foi aleatória, não sendo os resultados conclusivos para a detecção de alterações incipientes nos sítios anatômicos estudados da mucosa bucal normal de indivíduos expostos ao álcool e ao fumo.

- A técnica de micronúcleos foi capaz de detectar uma tendência ao aumento de células micronucleadas na mucosa bucal de indivíduos expostos ao fumo e/ou álcool na mucosa bucal do lábio inferior.

- O número de células em cariorrexe na mucosa bucal do lábio inferior foi estatisticamente superior ao da mucosa bucal da borda de língua e assoalho de boca em todos os grupos, mostrando a relação da cariorrexe com o processo de maturação celular.

- O maior número de “broken eggs” foi observado nos indivíduos não expostos ao fumo e/ou álcool, indicando que esta figura nuclear possa representar uma forma de reparo de DNA.

## SUMMARY

Cancer development is related to many factors, considering oral neoplasias, the epithelial tissue is frequently exposed to carcinogens. The aim of this study is to evaluate cytopathology alterations in three anatomical sites of the normal oral mucosa which have the high risk of cancer development and are exposed to carcinogens such as tobacco and alcohol. Three anatomical sites from higher prevalence of oral cancer were considered. The sample was constituted of 68 individuals; 21 from a control group, 28 from a smokers group and 19 from smoke/alcohol group. The qualitative analysis through the modified Papanicolaou as well as through the modified Bethesda System 2001 does not show enough sensible to detect early alterations in the oral mucosa in the considered anatomical sites exposed to tobacco and alcohol. Although we observed alterations in the border of the tongue of smokers and in the lower lip and floor of the mouth of individuals who smoke and drink alcohol, the analysis of the pattern of cell maturation was random and the results were not conclusive towards the detection of early cell alterations on the oral mucosa in the considered anatomical sites exposed to tobacco and alcohol. The micronucleus assay detected a tendency in the increase of micronucleus in de individuals exposed to tobacco and/or alcohol in all anatomical sites.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BALÁEZ, A. B.; DÍAZ E. M.; PEREZ, H. R. Influencia de la edad, duracion dem habito de fumar y consumo de cigarrillos sobre los indices de queratinizacion de la mucosa bucal. **Rev. Cub. Estomatol.**; Havana, v. 6, n. 1/2, p.87-95, ene./jun. 1989.

BALÁEZ, A. B.; DÍAZ E. M.; PEREZ, H. R. et al. Modificaciones de los indices de exfoliacion celular em la mucosa del paladar y carrillo de fumadores de tabacos (puros). **Rev. Cub. Estomatol.** Havana, v. 23, n. 3, p.177-181, set/dic. 1989.

BENNER, S. E.; LIPPMAN, S. M.; WARGOVICH, M. J.; LEE, J. J.; VELASCO, M.; MARTIN J. W.; TOTH, B. B.; HONG, W. K. Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. **Int J Cancer.** New York, NY , v. 59, n. 4, p. 457-459, 1994.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H.; BASRUR, P. K. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. **Mutat Res.** Amsterdam, v. 101. P. 237-246. 1982.

BLOCHING M; HOFMANN A; LAUTENSCHLAGER CH; BERGHAUS A; GRUMMT T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncology**, Oxford, v.36. p.550-555. 2000.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C. et al. Effect of smoking habit on thr frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutat Res.** Amsterdam, v. 543, p. 155-166. 2003.

BRASIL. Misnistério da Saúde. Secretaria Nacional de assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil: 2002. Disponível em:

<<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2001/>>. Acesso em: 27/2/2003.

BRUGERE, J; GUENEL, P; LECLERC, A; RODRIGUEZ, J. Differential effects to tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. **Cancer**, Philadelphia, V.57. p.391-395.1986.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res.** v. 56, p. 2488-2492. Jun. 1996.

CANÇADO, RP; YURGEL, LS; SANT'ANNA, M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncology**, Oxford, v. 37, p.446-454, 2001.

CARVALHO, G. **Citologia Oncológica**. Editora Atheneu. São Paulo. 1995.

CARVALHO, G. **Citologia Oral**. Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro. 2002.

CASARTELLI, G.; BONATTI, S.; FERRARI, M. et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Analyt Quant Cytol Hystol**. St Louis, v. 22, n. 6, p. 486-492. 2000.

CHIECO P; DERENZINI M. The feulgen reaction 75 years on. **Histochem Cell Biol** v. 111. p.345-358.1999.

CONLEY, J.; SADOYAMA, J. A. Squamous cell cancer of the buccal mucosa. A review of 90 cases. **Arch Otolaryngol**. v. 97, p. 330-333, Apr. 1973.

COWPE JG; LONGMORE, RB. Nuclear area and Feulgen DNA content of normal buccal mucosal smears. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.10. p.81-86.1981.

COWPE, JG; LONGMORE, RB; GREEN, MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. **J R Soc Med**, London, p.509-513.1988.

DESAI, S. S.; GHASIAS, S. D.; JAKHI, S. V.; BHIDE, S. V. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. **Canc. Letters**. v. 109, p. 9-14, 1996.

DIETZ, J.; DIEHL, A. S.; PROLLA, J. C. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Rev. Ass. Med Brasil*. v. 46, n. 3, p. 207-211. 2000.

DU, X; SQUIER CA; KREMER MJ; WERTZ, PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29, p.80-85, 2000.

FENECH, M; HOLLAND, N; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BOSSANI, S. The Human MicroNucleus Project – Na international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res**, v. Amsterdam, v. 428, p. 271-283, 1999.

FENECH, M. The micronucleus thechnique. **Mutat. Res**. Amsterdam, v. 455, p. 81-95. 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lynfocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycle in the cytokinesis-block micronucleus assay. . **Mutat. Res**. Amsterdam, v.504, p. 131-136. 2002.

GATTÁS, G. J.; CARDOSO, L. A.; MEDRADO-FARIA, M. A. et al. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operarors sfter introducing methanol. **Occup. Med**. v. 51, n. 2, p. 107-113. 2001.

HADLER, W. A.; SILVEIRA, S. R. Histofisiologia dos epitélios. Correlação entre a morfologia e a função nos epitélios. 1ª edição. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993. 318 p.



HARTY, L. C.; CAPORASO, N. E.; HAYES, R. B. et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity pharyngeal cancers. **J Natl Cancer Inst.** Oxford. V. 89, n. 22, p. 1698-1705. Nov. 1997.

HILLMAN, R. W.; KISSIN, B. Oral cytologic patterns in relation to smoking habits. Some epithelial, microfloral, and leukocytic characteristic. **Oral Surg.** St Louis, v. 42, n. 3, p. 366-374. Spet. 1976.

HOFFMANN D.; WYNDER E. L. Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. **Iarc Sci Publ.** v. 74. p.145-65.1986.

HOLLAND, N. T.; LEVINE, A. J.; SMITH, M. T. et al. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. **Mutat. Res.** Amsterdam, v. 371, p. 237-248. 1996.

HOLLAND, N. T. Bucal cell micronucleus assay: new developments and future project. **Gent Mol Biol.** v.26, n.2, p.47. 2003

JONES, A. C.; PINK, F. E.; SANDOW, P. L. et al. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.** St Louis. V. 77, n. 1, p. 101-104, 1994.

KAPCZINSKI, M. P. Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através da citologia esfoliativa. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Odontologia, 1997. Dissertação (Patologia). Faculdade de Odontologia, UFRGS. 1997.

KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A. E.; BURGAZ, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat Res.** Amsteden, v. 442, p. 29-35. 1999.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. **Oral Oncol.** Oxford. V. 37, p. 401-418. 2001.

MACKENZIE, J.; AH-SEE, K.; THAKKER, N. et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? **Oral Oncol.** Oxford. V. 36, p. 387-389. 2000.

MEYER, J.; RUBINSTEIN, A.; MEDAK, H. Early effects of smoking on surface cytology of the oral mucosa. Cell changes in smokers. **Oral Surg.** St Louis, v. 30, n. 5, p. 700-710. 1970.

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

MORENO-LÓPEZ, LA; ESPARZA-GÓMEZ, GC; GONZALES-NAVARRO et al. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol**, Oxford, v.36. p.170-174. 2000

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G. Quantitative cytophotometric analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. **Br J Oral Max Fac**, Edinburgh p.224-228.1989.

OGDEN G. R.; COWPE J. G.; GREEN M. W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, p.19.53-55.1990.

OGDEN, G.R. The Future Role for Oral Exfoliative Cytology – Bleak or Bright?. **Oral Oncology**, Oxford, v.33.p. 2-4.1997.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; WIGHT, A. J. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, p.201-205.1997.

OGDEN, GR; WIGHT, AJ; COWPE, JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. **Anal Quant Cytol Histol** St Louis, v. 21. p.126-130.1999.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br J Oral Maxillofac Surg**. Edinburg DC. V. 36, p. 247-251. 1998.

OGDEN, G. R.; COWPE, J. G.; GREEN, M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. **Act Cytol**. V. 36, n. 5, p. 706-710, 1992.

PAPANICOLAOU, GN; TRAUT, H. The diagnostic Value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **Am J Obst Gine**. p.193-206.1941.

PAPANICOLAOU, GN. **Diagnosis os uterine cancer by vaginal smear**. New York: Commonwealth Fund., 1943 46 p.

PARTRIDGE, M.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S. et al. Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. **Oral Oncol**. Oxford. V. 34, p. 77-83. 1998.

REIS, S. R. A.; SADIGURSKY, M.; ANDRADE, M. G. S. et al. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. **Pesq Odontol Bras**. V. 16, p. 221-225. 2002

ROSS, D. W. **Introduction to Oncogenes and Molecular Cancer Medicine**. Editora Springer. Nova Iorque. 1998.

RAMIRES, A. Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais. São Paulo: USP. 2000. Dissertação Unidade Instituto de Biociências Área de Concentração Biologia (Genética). USP. 2000.

SAKU, T; SATO, E .Prediction of malignant change in oral precancerous lesions by DNA cytofluorometry. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.12. p.90-102.1983.

SAMPAIO, H; LOYOLA, A; GOMEZ, R; MESQUITA, R. AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa: Effect of Smoking. **Acta Cytol**, St Louis IL. V.43 p.117-120, 1999.

SANDLER, H. C.; STHAL, S. S.; CAHN, R. L. et al. Oral exfoliative cytology for detection of early mouth cancer. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.** St Louis, v. 13, n. 8, p. 994-1009, Aug. 1960.

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

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis.** V. 2, p. 11-17, 1987.

SAWYER, D. R.; WOOD, N. K. Oral cancer. Etiology, recognition and management. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 36, n.4, p. 414-418. Sept. 1958.

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

SHAFER, W. G. Oral carcinoma in situ. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, St. Louis, v. 39, n.2, p. 227-238, Feb. 1975.

SHIMIZU, N. I.; UYIYAMA, H.; WALT, G.M. Selective entrapment of extracromosomally DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J Cell. Biol.** , v. 140, p. 1307-1320. 1998.

SHIMIZU, N. I.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 448, p. 81-90. 2000.

SILVERMAN Jr. S.; BECKS, H.; FARBER, S. M.; The diagnostic value of introral cytology. **J Dent. Res.** Washington, v. 37, n. 2, p. 195-205, Apr. 1958.

SQUIER CA; COX P; HALL BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.15, p.276-279.1986.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**. V. 287, p. 2114-2119, 2002.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int. J. Cancer**. New York, NY, v.31, p. 305-308, 1983.

STICH, H. F.; CURTIS, R.; PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int. J. Cancer**, New York, NY, v. 30, p. 553-559. 1982.

TEN CATE, A. R. Oral Mucosa. In:\_\_\_\_\_. **Oral Histology. Development, Structure, and Function**. 4. th. St Louis: Mosby,1994. 531p. chap.18. p 397-401.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am J Epidemiol**, v. 134, p. 840-850. 1991.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat Res**. Amsterdam, v. 271, p. 60-77. 1992.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**. v. 18, n. 2, p. 187-194. 2003.

WIGHT, A. J.; OGDEN, G. R. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer – a review. **Oral Oncol.** Oxford. v. 34, p. 441-447. 1998.

WRIGHT, T. C.; COX, J. T.; MASSAD, L. S.; et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. **JAMA**. V. 287, n. 16, p. 2120-2129, 2002.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 1999.

ZIMMERMANN, E. R.; ZIMMERMANN, A. Z. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. **J Dent. Res.** Washington DC, v. 44, n. 4, p. 627-631, July/Aug. 1965.

---

**ANEXOS****ANEXO I**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FICHA DE ANAMNESE PARA CADASTRAMENTO DOS PACIENTES

**Dados do Paciente**

Nome : \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Doenças Sistêmicas: \_\_\_\_\_

Medicamentos: \_\_\_\_\_

**Hábitos:**

Café: quantidade de xícaras por dia \_\_\_\_\_

Chimarrão: quantidade de cunhas por dia \_\_\_\_\_

Cigarro: quantidade de cigarros por dia \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Álcool: tipo: \_\_\_\_\_ quantidade de doses por dia \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Alterações dos dados do paciente:

---

---

---

---

**ANEXO II – REAÇÃO DE FEULGEN**

- a) Ácido Hidroclorídrico 5M à 22 °C 50 min
- b) Lavar em água destilada 2min
- c) Lavar em água destilada 2 min
- d) Reagente de Schiff 60 min
- e) Lavar em solução de Metabisulfito de sódio\* 3 min
- f) Lavar em solução de Metabisulfito de sódio\* 3 min
- g) Lavar em água destilada 2 min
- h) Lavar em água destilada 2 min
- i) Etanol 50% 1 min
- j) Etanol 70% 1 min
- k) Etanol 80% 1 min
- l) Etanol 99% 1 min
- m) Xilol 1 min

\* Metabisulfito de sódio concentrado 5 ml

Água destilada 95ml

Ácido clorídrico 5M 1ml



---

**ANEXO III – TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADA\***

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

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

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

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

## **ANEXO IV – CRITÉRIOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ESFREGAÇOS CORADOS PELO MÉTODO DE PAPANICOLAOU**

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

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

## ANEXO V – CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS ESFREGAÇOS OBTIDOS PELO MÉTODO DE PAPANICOLAOU

A classificação utilizada segue os critérios descritos por PAPANICOLAOU e TARUT (1943), descritos abaixo:

- Classe 0 – Amostra inválida  
Material insuficiente ou inadequado para análise.
  
- Classe I – Esfregaço normal  
As células observadas apresentam padrão normal em todo o esfregaço.
  
- Classe II – Esfregaço normal com presença de inflamação  
As células observadas apresentam padrão normal em todo o esfregaço, porém verifica-se a presença de células inflamatórias em pelo menos dois campos.
  
- Classe III – Esfregaço suspeito – Alterações Displásicas  
Presença de alterações celulares em pelo menos dois campos do esfregaço. Tais alterações podem ser descritas como uma discreta hipercromasia nuclear, um leve aumento do tamanho nuclear e possível ocorrência de multinucleação celular.
  
- Classe IV – Esfregaços sugestivos de neoplasia maligna – Carcinoma *in situ*  
Presença de alterações celulares em dois ou mais campos. Há um considerável número de células atípicas por esfregaço. O carcinoma *in situ* é caracterizado pela presença de células malignas imaturas (células das camadas basais e parabasal, redondas ou ovais, com núcleo em posição central). Podem ser observadas células com núcleos volumosos e escasso citoplasma. O núcleo é difusamente hipercromático. A cromatina é irregular ou em grânulos grosseiros.

Pode ser observada multinucleação. O citoplasma pode conter vacúolos. Presença de sincícios celulares com bordas celulares indistintas e arranjos em fila, também podem ser vistos.

- Classe V – Esmregaço maligno – Carcinoma Invasivo

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

## **ANEXO VI – SISTEMA BETHESDA 2001 (MODIFICADO PARA MUCOSA BUCAL 2003)**

### **ADEQUAÇÃO DO ESPÉCIME**

- Satisfatório para avaliação
- Não satisfatório para avaliação

Espécime rejeitado/não processado

Espécime processado e examinado, mas insatisfatório para avaliação, porque (especificar)

### **CLASSIFICAÇÃO GERAL**

- Negativo para alteração maligna epitelial
- Presença de anormalidade epitelial
- Outro

### **INTERPRETAÇÃO (RESULTADO)**

- Negativo para alteração maligna epitelial

Fungo (Candida)

Bactérias presentes no esfregaço

Células inflamatórias presentes no esfregaço

- Anormalidade celular epitelial

Células Escamosas Atípicas de significado indeterminado, como a presença de células parabasais nos esfregaços (ASCUS)

As demais alterações caracterizadas no Sistema Bethesda, como esfregaço suspeito de malignidade, representam em citologia bucal presença de alterações clinicamente detectáveis, não necessitando a predição de risco, determinando a necessidade da realização de biópsia total ou parcial (conforme indicação).

---

## ANEXO VII – CONSENTIMENTO INFORMADO

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

### CONSENTIMENTO INFORMADO

I – Justificativa e objetivos da pesquisa: Avaliar , através da quantificação do número de células micronucleadas, utilizando a reação de Feulgen o efeito do álcool e do fumo sobre as células da mucosa bucal normal.

II – Procedimentos que serão utilizados e seus propósitos: Serão realizados dois esfregaços, mediante a utilização de uma espátula de madeira, de três áreas anatômicas bucais de maior prevalência de câncer: vermelhão do lábio, borda de língua e soalho bucal. Será utilizada uma espátula de madeira para a raspagem de cada área anatômica. Tal procedimento de coleta é absolutamente indolor e não traz nenhum dano ao indivíduo. Como esta pesquisa busca estudar a existência de mudanças no padrão de descamação celular da mucosa dos pacientes, todos os casos que mostrarem variação do padrão normal serão submetidas a novas avaliações clínicas e/ou laboratoriais.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido pelo presente Projeto de Pesquisa.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida e cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo;
- da disponibilidade de tratamento médico e a indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa.

O pesquisador responsável por este Projeto de Pesquisa é Dr. Pantelis Varvaki Rados (fone: 3328-8600).

---

Nome e assinatura do voluntário

Data: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadas para Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (resolução a96/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e outra do pesquisador Responsável.