

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

**ESTUDO DO EFEITO DO FUMO SOBRE A VELOCIDADE DE
PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA
SUSPENSÃO DO HÁBITO**

FÁBIO VIEIRA DE MIRANDA

PORTO ALEGRE
2009

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

FÁBIO VIEIRA DE MIRANDA

**ESTUDO DO EFEITO DO FUMO SOBRE A VELOCIDADE DE
PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA
SUSPENSÃO DO HÁBITO**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos obrigatórios
para obtenção do título de Mestre
em Odontologia, área de
concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE
2009

Dedico este trabalho aos maiores mestres da minha vida, meus pais, Ana Maria e João, por sempre apoiarem meus sonhos e pela dedicação incansável para ajudar a alcançá-los.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, pela vida.

Aos meus irmãos, **Tiago Vieira de Miranda e Adriana Vieira de Miranda**, pelo amor e união sempre presentes no nosso convívio. Obrigado pelo apoio e carinho que sempre encontrei em vocês.

Aos meus avós, **Aldo e Jacyra**. Tenho uma gratidão eterna pelos ensinamentos e pelo grande exemplo de vida. Apoiaram-me e estiveram presentes em toda a minha vida.

À minha verdadeira amiga, **Adriana Jou Inchausti**, com quem por dois anos convivi momentos de alegrias, tristezas e companheirismo. Esteve sempre presente nas horas difíceis apoiando e incentivando, tornando mais fácil chegar até o fim desta jornada.

À **Fernanda Visioli**, que desde o início teve muita paciência e dedicação para ajudar na minha adaptação. E ao longo do tempo nossa amizade que foi crescendo, e hoje eu a considero uma pessoa muito especial cuja amizade guardarei para sempre.

À **Francinne Miranda da Rosa**, por ser uma amiga divertida, companheira e conselheira.

Ao **Leandro Nunes**, pela grande amizade que levarei para o resto da minha vida.

À **Rosa Savall**, que me acolheu como um filho.

Ao meu orientador, professor **Pantelis Varvaki Rados**, uma pessoa íntegra e totalmente comprometida com o ensino, que, durante esses dois anos de mestrado não foi somente meu orientador, mas um grande amigo.

Ao professor **Manoel Sant'Ana Filho**, pela incansável luta pela Pós-graduação e pela motivação do crescimento intelectual de todos à sua volta.

Às professoras **Anna Cecília Moraes Chaves e Márcia Gaiger de Oliveira**, pelos ensinamentos, principalmente na parte clínica.

À **Isabel da Silva Lauxen**, pela amizade e carinho. Foi uma pessoa presente nos momentos em que mais precisei, sempre com bons conselhos e me motivando, por isso serei eternamente grato.

Aos colegas de mestrado, **Vicente Leitune e Fabricio Mezzomo**, pela amizade e momentos de descontração.

Ao **Vinícius Carrard**, pela amizade, apoio e incentivo durante o mestrado.

A **Profa. Dra. Marli**, pela ajuda na realização deste trabalho e por toda sua competência.

À **Capes** por tornar possível a realização da minha Pós-Graduação.

A todos os que me ofereceram auxílio, incluindo as pessoas que não citei nominalmente aqui. Agradeço por me permitirem concluir mais uma etapa da minha vida acadêmica e profissional.

Uma das formas de prevenção do câncer bucal é a remoção de fatores que influenciam na ocorrência desta patologia, sendo um deles o hábito de fumar. Este estudo avaliou os efeitos do abandono do fumo nas células da mucosa bucal em um período de 3 e 6 meses em indivíduos que ingressaram do programa de abandono de fumo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra foi composta por 28 indivíduos, 14 no grupo controle, 7 no grupo abandono de fumo e 7 no grupo não abandono. Como forma de investigação este trabalho analisou, através da citopatologia associada à técnica histoquímica de AgNOR, a variação do ritmo da velocidade de proliferação celular com o abandono do fumo. Os esfregaços foram obtidos da mucosa do lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal. Foi avaliado de forma quantitativa o número de AgNORs presentes em cada núcleo do total de 50 células por sítio anatômico. Foi realizada análise da média de AgNORs por núcleo e também a porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ AgNORs e ≥ 5 AgNORs. Na mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal não observou-se diferenças estatísticas significantes. A mucosa da borda de língua mostrou diferenças estatísticas quando avaliada longitudinalmente no grupo não abandono de fumo, tanto na comparação com o grupo controle quanto com o momento inicial, observamos aumento na taxa de proliferação celular nos tempos de 3 e 6 meses. No grupo abandono houve um discreto aumento sem diferença estatística aos 3 meses com diminuição deste valor aos 6 meses. Esta avaliação sugere que o não abandono do fumo promove aumento na velocidade de proliferação em borda de língua e que a remoção do fumo começa a indicar no tempo de 6 meses a regressão da taxa de proliferação para valores próximos aos do grupo controle para a mucosa da borda de língua. Nossos dados mostram que uma porcentagem de 45% de células com $\geq 3 < 5$ AgNORs e 7% com ≥ 5 AgNORs por núcleo seria um “ponto de corte” para risco em indivíduos fumantes. A borda de língua apresentou maior sensibilidade para os efeitos do fumo e seu abandono no período de 6 meses, indicando que o hábito promoveu aumento da velocidade de proliferação.

ABSTRACT

One possible way to prevent oral cancer is by excluding or limiting associated risk factors, such as smoking. The present study assessed the effects of smoking cessation on cells of the oral mucosa, after 3 and 6 months, in patients attending a smoking cessation program at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. The sample included 28 patients, as follows: 14 controls, 7 patients who had quit smoking, and 7 smokers. Cytopathology was used in association with the AgNOR histochemical technique to assess variations in cell proliferation rate caused by smoking cessation. Smears were obtained from the lower lip, border of the tongue, and floor of the mouth. Were assessed with regard to the number of AgNORs per nucleus in a total of 50 cells collected from each anatomic site. The mean number of AgNORs per nucleus and the percentage of nucleus with > 3 and ≥ 5 AgNORs were quantified. No statistically significant differences were observed in cells collected from the lower lip and floor of the mouth. Cells collected from the border of the tongue, however, showed significant differences in the long term when compared to the control group and to baseline values. An increased cell proliferation rate was observed at 3 and 6 months in the group of smokers. Patients who had quit smoking showed a slightly increased proliferation rate at 3 months (nonsignificant) and a lower result at 6 months. These findings suggest that smoking increases the rate of cell proliferation on the border of the tongue, with a gradual regression to normal (control) levels starting 6 months after cessation for the mucosa of the border of the tongue. Our data show that a percentage of 45% of cells with $\geq 3 < 5$ AgNORs and 7% with ≥ 5 AgNORs for nucleus would be a “point of cut” for risk in smoking individuals. The border of the tongue showed a higher sensitivity for the effects of smoking and smoking cessation in a period of 6 months, with an increased cell proliferation rate observed in association with smoking.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	9
2 OBJETIVO.....	13
REFERÊNCIAS.....	14
3 ARTIGO CIENTÍFICO	16
Introdução.....	16
Materiais e métodos.....	18
Análise quantitativa.....	20
Cálculo do tamanho amostral	22
Análise estatística.....	22
Resultados.....	23
Discussão	28
REFERÊNCIAS.....	34
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
ANEXOS	37

*Artigo científico de acordo com as instruções da revista Oral Oncology.

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O câncer de boca é o sétimo tipo de câncer mais incidente na população brasileira. Foram estimados para o ano de 2008 mais de 14.000 novos casos no Brasil, destes 10.380 em homens. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal estão principalmente, o uso do tabaco e a ingestão de álcool em homens com idade superior a 40 anos. Segundo estudo realizado nas principais capitais do Brasil, o hábito de fumar é maior em homens do que em mulheres sendo Porto Alegre, RS a capital com maior índice de fumantes.¹

Existem outros agentes etiológicos, além do fumo e do álcool, para o desenvolvimento do câncer bucal, entre os quais se destacam: fatores hormonais, genéticos, nutricionais e as deficiências imunológicas.^{2, 3} Os sítios anatômicos mais acometidos por essa patologia são o vermelhão do lábio inferior, borda de língua e o assoalho de boca.^{1, 4, 5}

Por meio da citopatologia, Wrubel e Scopp (1961) estudaram a variação da ceratinização da mucosa jugal e do palato duro. A amostra do estudo foi constituída por 11 fumantes que, após a primeira coleta citológica cessaram o hábito por 4 semanas, sendo avaliadas 100 células de cada sítio anatômico estudado. Os resultados não foram estatisticamente significantes, sendo sugerido pelos autores que o curto período de cessação do fumo e o tamanho da amostra não foram suficientes para obtenção de resultados conclusivos.⁶

Braga, *et al.* (2004) avaliaram células da mucosa bucal, obtidas a partir de raspados citológicos de pacientes fumantes e não fumantes. Os sítios avaliados foram: mucosa do lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal. Os autores sugeriram que quando a mucosa bucal é exposta ao fumo, a região da borda de língua sofre maior ceratinização.⁷

Van Oijen *et al.* (1998) avaliaram a proliferação celular utilizando o marcador imunoistoquímico Ki-67 em material obtido através de biópsias. A amostra deste estudo foi composta por 6 grupos: 3 grupos formados por indivíduos com o diagnóstico de Carcinoma espinocelular e os outros 3 foram de indivíduos que não apresentavam lesão. Dos 3 grupos que apresentavam Carcinoma espinocelular, um grupo não fumantes, grupo fumantes e o último

por indivíduos que abandonaram o fumo há 1 ano. Dos que não apresentaram lesão, a distribuição foi: grupo não fumantes, grupo de fumantes e grupo de indivíduos que abandonaram o fumo há 3 meses. Foi observado um aumento na proliferação celular nos grupos de fumantes e nos grupos de cessação do fumo, sugerindo que este aumento no índice de proliferação pode indicar uma alteração permanente causada pelo fumo.⁸

Vainio *et al.* (2001) abordaram métodos de cessação do hábito de fumar para prevenção do câncer. Como terapia para abandono foi utilizada a goma de mascar de nicotina, adesivos de nicotina, terapia psicológica e uso de antidepressivos. O método mais efetivo foi a utilização do antidepressivo bupropiona, associado ou não a outras terapias. A utilização da bupropiona combinado com adesivos de nicotina foi a forma mais eficaz.⁹

Hamadah *et al.* (2007) relataram a dificuldade de obter sucesso em programa de cessação de fumo. De 27 indivíduos, apenas 7 pararam de fumar em um intervalo de 5 anos.¹⁰

Anthenelli *et al.* (2008) compararam a especificidade quanto ao gênero no abandono do fumo e à eficácia da cessação utilizando a medicação Topiramato, através de um estudo randomizado, duplo cego e controlado por placebo. Os autores mostraram maior percentagem de homens que pararam de fumar com o uso da medicação em relação às mulheres e sugerem que o Topiramato é eficaz no abandono do fumo quando comparado ao placebo; a avaliação foi realizada após 90 dias do início do tratamento.¹¹

Hays *et al.* (2008) mostraram através da revisão de outros estudos a melhor efetividade e maior segurança da terapia medicamentosa com Varenicline em relação a Bupropiona.¹²

Em relação ao câncer bucal, 90% dos casos são do tipo carcinoma espinocelular. Por esse fato a citopatologia pode auxiliar na detecção de alterações prévias ao aparecimento de lesões clinicamente visíveis. A utilização da citopatologia agregada a outras técnicas quantitativas como AgNORs e de micronúcleos buscam aumentar a acurácia dos estudos pela avaliação da taxa de proliferação e mensuração do dano no DNA.¹³ Vários estudos empregando a citopatologia neste sentido foram capazes de mostrar variações nas células epiteliais descamadas da mucosa bucal.^{7, 13-15}

Bohrer *et al.* (2005) realizaram estudo em 68 indivíduos, divididos em 3 grupos: controle, uso de fumo e uso de fumo e álcool. Foram avaliadas células obtidas por raspagem de três sítios anatômicos; mucosa do lábio inferior, borda de língua e mucosa do assoalho de boca, submetidas à técnica de Feulgen para detecção de micronúcleos. Os autores mostraram que a mucosa bucal, quando exposta ao álcool e ao fumo, apresenta células esfoliadas com aumento do número de micronúcleos. Os achados sugeriram maior dano genético em indivíduos que faziam uso de álcool associado ao fumo.¹⁴

Regiões organizadoras nucleolares (NORs) são alças em cromossomos acrocêntricos. Na espécie humana esses cromossomos são: 13, 14, 15, 21 e 22. Quando estas NORs estão ativas a impregnação pela prata é específica para detectá-las, ocorrendo a marcação seletiva das proteínas não-histônicas associadas a estas regiões, representando um parâmetro de avaliação da velocidade de proliferação celular.¹⁵⁻¹⁸

Cançado *et al.* (2001) e Pinto *et al.* (2003) estudaram células da mucosa bucal de fumantes e não fumantes coletadas através de raspagem, e que foram submetidas à técnica de AgNORs. Ambos os estudos sugerem que o fumo promove um aumento na proliferação demonstrado pelo aumento no número das AgNORs por célula no grupo de fumantes.^{13, 15}

Estudos comparando epitélio normal, displasia epitelial e carcinoma espinocelular, mostraram aumento significativo e progressivo no número de AgNORs por núcleo nos casos de displasia epitelial e carcinoma. Nas duas situações, displasia epitelial e carcinoma, os números encontrados foram em sua grande maioria 5 ou mais AgNORs por núcleo, sugerindo incremento da velocidade de proliferação celular em ambos os casos.¹⁹

Paiva *et al.* (2004) analisaram células descamadas da mucosa bucal de indivíduos expostos aos carcinógenos álcool e fumo. Avaliaram mucosa do lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal através da citopatologia agregada à técnica histoquímica de AgNOR. Sugerem que estes três sítios analisados apresentam diferentes padrões de maturação celular, mostrando com significância estatística que as células da mucosa da borda da língua apresentam um menor ritmo de proliferação, quando expostas ao álcool e fumo.²⁰

Gedoz *et al.* (2007) avaliaram a velocidade de proliferação celular em mucosa bucal clinicamente normal exposta ao fumo e álcool, através de raspados submetidos à técnica de AgNOR coletados em um momento inicial e após 24 meses. Os raspados foram obtidos da mucosa do lábio inferior, da borda de língua e da mucosa do assoalho bucal. Após 24 meses, os autores observaram um aumento significativo na média do número de AgNORs por núcleo em indivíduos do grupo fumo e fumo/álcool, sugerindo que a variação da velocidade de proliferação pode ser utilizada para o monitoramento de indivíduos de risco para o câncer bucal, de forma longitudinal individualizada.²¹

2 OBJETIVO

- Avaliar de forma quantitativa o padrão da velocidade de proliferação celular pela técnica de AgNOR em um momento inicial e após um período de 3 e 6 meses de suspensão da exposição ao fumo sobre as células epiteliais descamadas em 3 sítios anatômicos da mucosa bucal.

REFERÊNCIAS

1. INCA. Instituto Nacional de Câncer. Brasil; 2007 [updated 2007 11/26/2007; cited 10/25/2007]; Capturado 2007 Novembro.2026]. Available from: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324.
2. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 2005;35:169-173.
3. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-418.
4. Squier CA. Smokeless tobacco and oral cancer: a cause for concern? *CA Cancer J Clin* 1984;34:242-247.
5. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro RJ; 2004.
6. Wrubel GJ, Scopp IW. A Study of the Exfoliative Cytology of the hard Palate and Buccal mucosa Following Cessation of Smoking in Previous Smokers. *J D Res* 1961;40:341-345.
7. Braga FL, Meneguzzi RD, Paiva RL, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. *Revista Odonto Ciência - Faculdade de Odontologia PUCRS* 2004;19:157-163.
8. van Oijen MG, Gilsing MM, Rijksen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral Oncol* 1998;34:297-303.
9. Vainio H, Weiderpass E, Kleihues P. Smoking cessation in cancer prevention. *Toxicology* 2001;166:47-52.
10. Hamadah O, Hepburn S, Thomson PJ. Effects of active non-smoking programmes on smoking behaviour in oral precancer patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:706-711.
11. Anthenelli RM, Blom TJ, McElroy SL, Keck PE, Jr. Preliminary evidence for gender-specific effects of topiramate as a potential aid to smoking cessation. *Addiction* 2008;103:687-694.
12. Hays JT, Ebbert JO, Sood A. Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation. *Am J Med* 2008;121:S32-42.
13. Pinto TAS, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJD. Avaliação Quantitativa de Núcleo/Citoplasma e AgNORs em Células da Mucosa Bucal de Fumantes e Não Fumantes. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*. 2003:12-14.

14. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol* 2005;49:265-272.
15. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol* 2001;37:446-454.
16. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Fundamentos da Biologia Celular*. Porto Alegre RS; 2006.
17. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000;31:117-120.
18. Schwartz JL, Muscat JE, Baker V, Larios E, Stephenson GD, Guo W, et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral Oncol* 2003;39:842-854.
19. Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997;79:2200-2208.
20. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:175-180.
21. Gedoz L, Lauxen Ida S, Sant'Ana MF, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol* 2007;29:231-238.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

ESTUDO DO EFEITO DO FUMO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA SUSPENSÃO DO HÁBITO

F.V. Miranda¹, M. M. Knorst², P.V. Rados¹

¹ Serviço de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-Chave: Abandono do hábito de fumar, Câncer bucal, Citopatologia

Introdução

O câncer de boca é uma doença prevalente na população mundial,¹ afetando principalmente homens com idade superior a 40 anos, cujos fatores de risco mais importantes são o fumo e o álcool.²

Baseada nesta realidade uma das estratégias para prevenção do câncer é a suspensão da exposição a estes fatores de risco visando o retorno das células expostas às condições fisiológicas. Na literatura os dados referentes ao comportamento das células da mucosa bucal após a retirada dos fatores de risco são escassos.³ Os sítios anatômicos mais acometidos por essa patologia são a mucosa do vermelhão do lábio inferior, borda de língua e a mucosa do assoalho bucal.^{2, 4, 5}

Os métodos utilizados para a cessação do uso do fumo avaliam principalmente a eficácia da intervenção. Estudos realizados até o momento não tiveram a preocupação em avaliar o efeito da suspensão do fumo sobre as células epiteliais da mucosa bucal.

A citologia exfoliativa vem sendo utilizada em trabalhos com grupos de indivíduos fumantes e não fumantes. Braga et al. avaliaram mucosa do lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal e observaram uma maior ceratinização na borda de língua quando exposta ao fumo.⁶

A citopatologia pode ser utilizada para detectar alterações celulares prévias ao aparecimento de lesões clinicamente visíveis, pelo fato de no câncer de boca 90% dos casos serem do tipo carcinoma espinocelular. A utilização da citopatologia agregada a outras técnicas quantitativas como AgNORs e de micronúcleos busca aumentar a acurácia dos estudos pela avaliação da taxa de proliferação e mensuração do dano no DNA.^{7, 8} Vários estudos utilizando a citopatologia neste sentido foram capazes de mostrar variações nas células epiteliais descamadas da mucosa bucal.^{6, 7, 9, 10}

Bohrer et al. avaliaram células obtidas por raspagem de três sítios anatômicos: mucosa do lábio inferior, borda de língua e mucosa do assoalho bucal. A técnica utilizada foi a de Feulgen para detecção de micronúcleos. O estudo foi realizado em 68 indivíduos, divididos em 3 grupos: controle, uso de fumo e uso de fumo e álcool. Os achados sugeriram maior dano genético em indivíduos que faziam associação entre álcool e fumo. Os autores mostraram ainda, que a mucosa bucal, quando exposta ao álcool e fumo apresenta células esfoliadas com aumento do número de micronúcleos.⁶

Regiões organizadoras nucleolares (NORs) presentes no núcleo representam um parâmetro de avaliação da velocidade de proliferação celular e quando ativas podem ser quantificadas através da impregnação pela prata, sendo denominadas AgNORs.¹⁰⁻¹²

Os autores Cançado et al. e Pinto et al. estudaram células da mucosa bucal de fumantes e não fumantes, coletadas através de raspagem, e que foram submetidas à técnica de AgNORs. Estes estudos apontam que o fumo promove um aumento na proliferação celular demonstrado pelo aumento no número das AgNORs por núcleo no grupo de fumantes.^{7, 10}

Estudo avaliou a proliferação celular utilizando o marcador imunohistoquímico Ki-67 em material obtido através de biópsias, utilizando indivíduos não fumantes, fumantes e ex fumantes que apresentaram ou não algum carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Foi observado um aumento na proliferação celular nos grupos de fumantes e nos grupos de cessação do fumo, sugerindo que este aumento no índice de proliferação pode indicar uma alteração permanente causada pelo fumo.¹³

Estudos destacam que foi observado um aumento significativo e progressivo no número de AgNORs por núcleo nos casos de displasia epitelial

e carcinoma espinocelular quando comparados ao epitélio normal. Os números encontrados nas duas situações, displasia epitelial e carcinoma, foram em sua grande maioria 5 ou mais AgNORs por núcleo, sugerindo aumento da velocidade de proliferação celular em ambos os casos.¹⁴

A mucosa do lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal através da citopatologia agregada à técnica histoquímica de AgNOR, foi avaliada por Paiva et al.. Estes autores analisaram células descamadas da mucosa bucal de indivíduos expostos aos carcinógenos álcool e fumo e sugerem que estes três sítios analisados apresentam diferentes padrões de maturação celular e que as células da mucosa da borda da língua apresentam um menor ritmo de proliferação quando expostas ao álcool e fumo.¹⁵

Pela ausência de estudos longitudinais na literatura verificando os efeitos do fumo na mucosa bucal com o uso da citopatologia, Gedoz et al. avaliaram a velocidade de proliferação celular em mucosa bucal clinicamente normal exposta ao fumo e álcool, através de citologia exfoliativa associada à técnica de AgNOR pelo período de até 24 meses. Os raspados foram obtidos da mucosa do lábio inferior, da borda de língua e do assoalho bucal. Após 24 meses, os autores observaram um aumento significativo na média de números de AgNORs por núcleo em indivíduos do grupo fumo e fumo/álcool, sugerindo que a variação da velocidade de proliferação pode ser utilizada para o monitoramento de indivíduos em risco para o câncer bucal, de forma longitudinal individualizada.¹⁶

Este estudo visa avaliar de forma quantitativa o padrão da velocidade de proliferação celular pela técnica de AgNOR em um momento inicial e após um período de 3 e 6 meses de suspensão da exposição ao fumo sobre as células epiteliais descamadas em 3 sítios anatômicos da mucosa bucal.

Materiais e métodos

Este estudo consiste em um ensaio clínico controlado onde os indivíduos que concordaram em participar deste estudo foram provenientes do programa de abandono do hábito de fumar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pacientes em atendimento clínico na Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS). Os

critérios de seleção foram: indivíduos do gênero masculino, acima de 30 anos de idade, e que bebiam menos do que uma dose de bebida alcoólica por dia, em média. Estes Indivíduos deveriam apresentar mucosa bucal clinicamente saudável no momento do exame e da coleta inicial. Todos os indivíduos participantes desta pesquisa foram esclarecidos sobre a metodologia e concordaram em participar assinando um termo de compromisso livre e esclarecido (Anexo II). Este estudo foi realizado após apreciação e aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da FO-UFRGS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. (ANEXO III)

Neste estudo, os indivíduos foram divididos em 3 grupos:

- Grupo controle (GC)
- Grupo abandono do fumo (G_{ABF})
- Grupo não abandono do fumo (G_{NABF})

O Grupo controle (GC) foi constituído por indivíduos que nunca fumaram. O grupo abandono do fumo (G_{ABF}) foi constituído por indivíduos que fumavam e foram incluídos no grupo de abandono do tabagismo e que obtiveram sucesso no abandono do hábito. O grupo não abandono do fumo (G_{NABF}) foi constituído pelos indivíduos que foram incluídos no programa de abandono de fumo do HCPA e que não obtiveram sucesso no abandono do hábito.

O tratamento do tabagismo foi realizado através de terapia cognitivo-comportamental em grupo, associada, de acordo com critérios clínicos, à bupropiona ou adesivo de nicotina. A abordagem em grupo foi realizada em seis sessões semanais, duas sessões quinzenais, seguidas de reuniões mensais no período de seguimento. A terapia medicamentosa foi administrada por 8 a 12 semanas.

A coleta inicial ocorreu no momento de inclusão no programa de abandono de fumo, uma segunda coleta após 3 meses e a última coleta foi realizada após 6 meses para os grupos abandono e não abandono de fumo. Os Indivíduos do GC foram avaliados e o material foi coletado em um único momento.¹⁶ A coleta de material de pacientes não fumantes foi realizada durante consulta odontológica de rotina na FO – UFRGS.

Mediante a utilização da escova citológica, foram obtidos esfregaços dos seguintes sítios bucais: mucosa de transição do lábio inferior, borda de língua e mucosa do assoalho bucal. Foram realizados dois raspados em cada sítio, em cada indivíduo.

As células coletadas com a escova citológica foram distendidas sobre uma lâmina histológica com a identificação do sítio anatômico. As lâminas de um mesmo paciente foram armazenadas em um frasco porta-lâminas identificado com o nome do paciente e fixadas em álcool etílico 96°GL. No laboratório, as lâminas foram identificadas com o número de registro do paciente, evitando que o examinador identificasse o grupo ao qual o paciente pertencia durante a análise. As lâminas foram submetidas à técnica de impregnação pela prata conforme o protocolo descrito por Ploton et al.¹⁷ (ANEXO I). O intervalo entre a coleta e a realização da reação foi de no máximo uma semana. A captura das imagens ocorreu imediatamente após a montagem final das lâminas.

As primeiras 50 células nucleadas distendidas e não sobrepostas de cada lâmina, em um aumento de 1000X, foram capturadas com o auxílio de uma câmara de vídeo (Qcolor 5, Coolet, RTV, Olympus Latin America Inc., Miami USA) acoplada a um microscópio binocular (CX41RF, Olympus Latin America Inc., Miami, USA) e a um computador (Dimension 5150, Dell, Porto Alegre, Brasil), utilizando o programa Qcapture[®], versão 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc.; Surrey, Canada)¹..

Análise quantitativa

A partir das imagens capturadas, foram realizadas as contagens das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al.,¹⁸ sendo estes considerados como estruturas esféricas impregnadas pela prata presentes dentro de núcleos de contorno bem definidos. No caso da existência de agregados (pontos pretos unidos ou sobrepostos), estes foram considerados como uma estrutura única. A partir da quantificação das NORs, foi calculada a

¹ Equipamento presente na Unidade de Morfometria e Histometria, FO-UFRGS e foi adquirido com apoio financeiro da FAPERGS, PROAP04/2005 n° do Processo 0410882.

média do número de AgNORs por núcleo, sendo as NORs quantificadas divididas pelo número de células (50). A porcentagem de AgNORs (pAgNORs) foi calculada usando o número de células com 1, 2, 3, 4 e 5 ou mais NORs por núcleo dividido pelo número total de células, resultando em: $\geq 3 < 5$ AgNORs e ≥ 5 AgNORs por núcleo.¹⁰

A quantificação das AgNORs foi realizada por um pesquisador que antes da análise das lâminas realizou uma calibragem (*kappa* 0,82) com um citopatologista experiente. Foi efetuada ainda durante análise uma calibragem intraexaminador com valor de *kappa* 0,94.

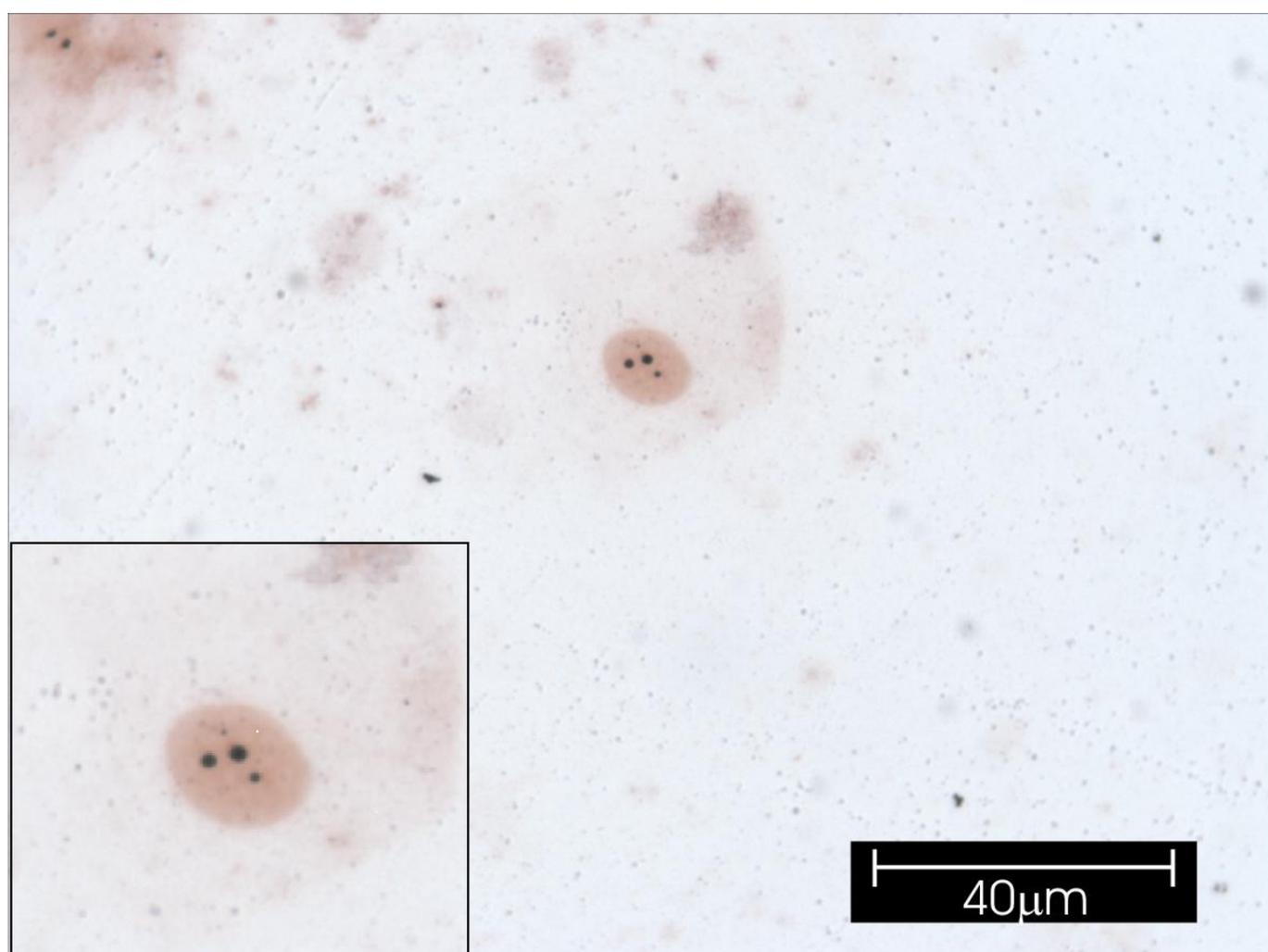


Figura 1 Aspectos dos pontos de AgNORs em célula epitelial. Núcleo com 3 AgNORs em célula de borda de língua GNABF no tempo de 6 meses. Captura da imagem realizada no mesmo dia da realização da técnica de AgNORs. Aumento original 1000X. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS. Porto Alegre 2009.

Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em dados de estudo prévio que comparou a detecção de AgNORs em controles e em tabagistas e encontrou desvio padrão de 0,48 no grupo controle e de 0,51 nos tabagistas. Utilizando uma diferença esperada de 0,50 na quantificação de AgNORs nos dois grupos, estimou-se um tamanho amostral de 24 indivíduos em cada grupo, considerando-se perda de 10%, uma significância de 0,05, poder do teste de 90%.

Análise estatística

A normalidade dos valores obtidos foi testada através do teste Kolmogorof-Smirnov. Nos dados em que houve normalidade, o teste estatístico escolhido foi ANOVA de um e dois fatores. E para a análise longitudinal, foi utilizada ANOVA de dois fatores para medidas repetidas. Havendo diferença, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Quando não houve uma distribuição normal dos dados, o teste realizado foi o de Kruskal-Wallis; e, havendo diferença, foi aplicada a prova U de Mann-whitney. O nível de significância foi de 5% para todos os testes.

Resultados

Na amostra do estudo, foram incluídos 17 indivíduos que participaram do programa de abandono de fumo do HCPA. Destes, 2 desistiram da pesquisa por motivos pessoais e foram excluídos da amostra. Um indivíduo no momento da coleta relatou ter se submetido a uma hemimandibulectomia em razão de um carcinoma espinocelular. Relatou também que a cirurgia para remoção do tumor havia ocorrido há mais de 5 anos e estava aguardando uma cirurgia de reconstrução. Frente a este quadro, a coleta foi realizada e seus dados analisados separadamente.

No total, o número de indivíduos que participaram do programa de abandono de fumo durante o tempo do estudo foram 58 indivíduos, e os que participaram efetivamente e que preencheram todos os requisitos de inclusão na pesquisa foram 14 participantes.

Tabela 1 Comparação das médias do número de AgNORs por núcleo e porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs, em lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal nos grupos inicial (fumantes), NAB e AB nos tempos de 3 meses e 6 meses

		Inicial		3 Meses		6 Meses		P
				GNABF	GABF	GNABF	GABF	
L. Inf.	N° AgNORs	2.34(±0.37)	2.71(±0.30)	2.40(±0.55)	2.64(±0.23)	2.37(±0.33)		
	$\geq 3 < 5$ AgNORs%	39,86	43,43	34,86	45,14	37,43		
	≥ 5 AgNORs%	4,00	5,71	4,86	6,29	3,43		
B de lín.	N° AgNORs	2.03(±0.22)	2.25(±0.55)	2.42(±0.49)	2.57(±0.50)	2.23(±0.43)		
	$\geq 3 < 5$ AgNORs%	25,71 ^B	28,29 ^{AB}	34,00	45,14 ^A	31,43		(0,036)
	≥ 5 AgNORs%	1,00 ^B	6,29 ^A	2,86	6,86 ^A	2,57		(0,003)
A. Buc.	N° AgNORs	2.37(±0.38)	2.60(±0.28)	2.52(±0.47)	2.84(±0.47)	2.44(±0.42)		
	$\geq 3 < 5$ AgNORs%	37,57	44,57	34,86	49,71	43,14		
	≥ 5 AgNORs%	3,28	4,86	6,57	9,14	1,43		

Abreviaturas: L. Inf. – Lábio inferior; B.de Lín. – Borda de língua; A. Buc. – Assoalho bucal.
 Fonte: Pacientes atendidos no serviço de pneumologia do HCPA. Porto Alegre, 2009.

Após a coleta final de 6 meses, esses 14 indivíduos foram separados em 2 grupos: o G_{ABF} composto de 7 indivíduos e o G_{NABF} representado por 7 indivíduos. O grupo controle GC foi composto por 14 indivíduos.

A média de idade do G_{ABF} foi de 53,3 anos, do G_{NABF} foi de 54 anos e do GC de 48,14 anos, (p=0.339).

Nos indivíduos que participaram do programa de abandono de fumo foi avaliado o tempo de tabagismo. No G_{ABF}, a média foi de 40,43 anos e no G_{NABF} a média foi 37,43 anos, (p=0,589)

Tabela 2 Comparação das médias do número de AgNORs por núcleo e porcentagem de núcleos com ≥ 3 <5 e >5 AgNORs, em lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal nos grupos Controle, NAB e AB nos tempos de 3 meses e 6 meses

		Controle	3 Meses		6 Meses		P
			GNABF	GABF	GNABF	GABF	
L. Inf.	N° AgNORs	2.49(±0.38)	2.71(±0.30)	2.40(±0.55)	2.64(±0.23)	2.37(±0.33)	
	≥ 3 <5 AgNORs%	37,57	43,43	34,86	45,14	37,43	
	≥ 5 AgNORs%	4,43	5,71	4,86	6,29	3,43	
B. de Lín.	N° AgNORs	1.98(±0.35) ^C	2.25(±0.55)	2.42(±0.49)	2.57(±0.50) ^{AB}	2.23(±0.43) ^{BC}	(0,013)
	≥ 3 <5 AgNORs%	24,71 ^C	28,29	34,00	45,14 ^{AB}	31,43 ^{BC}	(0,025)
	≥ 5 AgNORs%	1,14 ^{CC}	6,29 ^{ab}	2,86 ^{bc}	6,86 ^{AB}	2,57 ^{BC}	p 3 meses (0,022) p 6 meses (0,017)
A. Buc.	N° AgNORs	2.52(±0.26)	2.60(±0.28)	2.52(±0.47)	2.84(±0.47)	2.44(±0.42)	
	≥ 3 <5 AgNORs%	47,71	44,57	34,86	49,71	43,14	
	≥ 5 AgNORs%	3,57	4,86	6,57	9,14	1,43	

Abreviaturas: L. Inf. – Lábio inferior; B.de Lín. – Borda de língua; A. Buc. – Assoalho bucal.

Letras minúsculas indicam diferença estatística no tempo de 3 meses e letras maiúsculas indicam diferença estatística no tempo de 6 meses

Fonte: Pacientes atendidos no serviço de pneumologia do HCPA e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre, 2009.

A comparação das médias de número de AgNORs por núcleo e as porcentagens de núcleos com >3 e ≥ 5 AgNORs entre o GC e o grupo de fumantes no momento inicial não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Foi feita a comparação das médias de AgNORs por núcleo e a porcentagem de núcleos com ≥ 3 <5 e ≥ 5 AgNORs, em lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal, esta análise foi realizada comparando o grupo abandono de fumo no momento inicial, onde todos os indivíduos ainda fumavam e aos 3 e 6 meses com os grupos G_{NABF} e G_{ABF} (tabela 1).

Outra comparação foi realizada entre o GC e os grupos G_{NABF} e G_{ABF} aos 3 e 6 meses (tabela 2).

Em ambas comparações, tanto nos fumantes no momento inicial como no GC, a borda de língua apresentou menor ritmo de proliferação celular, quando comparada ao lábio inferior e ao assoalho bucal (tabela 1 e tabela 2).

Quando comparado o número de AgNORs dos fumantes no momento inicial com os valores obtidos nos grupos G_{NABF} e G_{ABF} , nos tempos de 3 e 6 meses, observou-se que o lábio inferior e assoalho bucal não apresentaram diferenças estatísticas significantes tanto para a média de número de AgNORs por núcleo quanto para a porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs (tabela 1).

A borda de língua nesta mesma análise não apresentou diferença estatística significativa na média de números de AgNORs por núcleo; porém, mostrou diferença estatística na porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs.

Observou-se aumento com diferenças estatísticas ($p=0,036$) para o número de células com $\geq 3 < 5$ AgNORs por núcleo aos 6 meses no G_{NABF} em comparação ao momento inicial e aos 3 meses.

Já com relação ao percentual de células com ≥ 5 AgNORs por núcleo, a diferença no G_{NABF} era vista aos 3 e 6 meses ($p=0,003$; tabela 1). Estes achados sinalizam uma velocidade maior de proliferação celular nas células da borda de língua, no G_{NABF} .

O G_{ABF} , nesta comparação com os fumantes no momento inicial, não apresentou em borda de língua diferença estatisticamente significativa; porém, pode-se observar que no tempo de 3 meses apresentou um aumento na proliferação celular e no tempo de 6 meses uma tendência à diminuição, o que sugere uma possível reversão na velocidade de proliferação.

Outra comparação realizada considerou os dados do GC, do G_{NABF} e do G_{ABF} nos tempos de 3 e 6 (tabela 2). Nesta análise, pode-se observar que o lábio inferior e o assoalho bucal não apresentaram diferenças estatísticas significantes tanto para a média de número de AgNORs por núcleo quanto para a porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs (tabela 2).

As diferenças estatísticas foram vistas na borda de língua considerando-se as médias de número de AgNORs por núcleo e as porcentagens de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs.

O G_{NABF} apresentou diferença estatística ($p=0,013$) indicando aumento na velocidade de proliferação celular aos 6 meses quando analisadas as médias de número de AgNORs por núcleo (tabela 2).

Observou-se ainda em borda de língua aumento com diferença estatística ($p=0,025$) para a porcentagem de células com $\geq 3 < 5$ AgNORs por núcleo no GNABF aos 6 meses em comparação ao GC (tabela 2).

Em relação à porcentagem de células com ≥ 5 AgNORs por núcleo, o GNABF apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,022$) aos 3 meses em relação ao GC e também diferença estatística ($p=0,017$) aos 6 meses sinalizando que a manutenção do hábito determina aumento da velocidade de proliferação em relação ao GC (tabela 2).

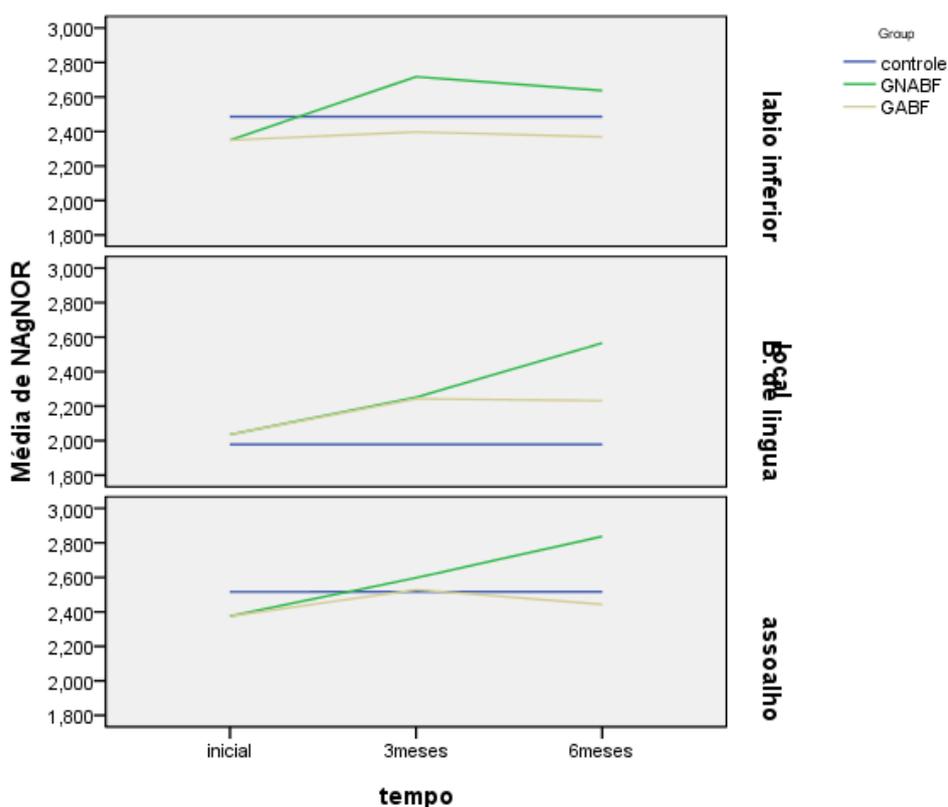


Figura 2 Distribuição dos dados por sítio anatômico

Fonte: Pacientes atendidos no serviço de pneumologia do HCPA e na Faculdade de Odontologia da UFRGS. Porto Alegre, 2009.

Na figura 2, observa-se que no grupo não abandono, nos sítios anatômicos, borda de língua e assoalho bucal, as médias de AgNORs por núcleo apresentam um aumento com a persistência do hábito de fumar. No grupo abandono de fumo, pode-se notar que esse aumento ocorre em 3 meses e depois começa a apresentar diminuição nos 6 meses.

No indivíduo que, no momento da coleta, relatou cirurgia prévia para tratamento de carcinoma espinocelular de mandíbula, foi feita análise individual. O mesmo participou do grupo de abandono de fumo do HCPA e até o período de 6 meses estava sem fumar. Este paciente mostrou redução na média do número de AgNORs por núcleo e na porcentagem de núcleos com ≥ 3 <5 e ≥ 5 AgNORs no lábio inferior e na borda de língua, quando comparadas a coleta inicial e as coletas de 3 e 6 meses. O assoalho bucal apresentou estabilidade no momento de 3 e 6 meses (tabela 3).

Tabela 3 Comparação das médias do número de AgNOR por núcleo e porcentagem de núcleos com ≥ 3 <5 e > 5 AgNORs nos tempos; inicial, 3 meses e 6 meses e nos sítios anatômicos; lábio inferior, borda de língua e assoalho bucal de coleta do indivíduo que apresentou tratamento ao carcinoma espinocelular e que abandonou o fumo

Sítios Anatômicos		Inicial	3 meses	6 meses
Lábio Inferior	Nº AgNORs	2.760*(± 1.02)	2.180(± 0.85)	1.900(± 0.86)
	≥ 3 <5 AgNORs %	27%	17%	12%
	≥ 5 AgNORs %	3%	0%	0%
Borda de Língua	Nº AgNORs	2.760*(± 1.12)	2.200(± 0.95)	1.900(± 0.84)
	≥ 3 <5 AgNORs %	22%	18%	9%
	≥ 5 AgNORs %	3%	0%	0%
Assoalho de boca	Nº AgNORs	2.360(± 0.72)	2.140(± 0.73)	2.360(± 0.96)
	≥ 3 <5 AgNORs %	17%	15%	17%
	≥ 5 AgNORs %	0%	0%	0%

Fonte: Paciente atendido no serviço de pneumologia do HCPA. Porto Alegre, 2009.

Discussão

O câncer de boca é uma doença prevalente na população mundial.¹ O Instituto Nacional do Câncer (INCA), em seu último estudo, estimou para o ano de 2008 mais de 14000 novos casos de câncer de boca no Brasil, sendo a população de maior risco constituída por homens com mais de 40 anos expostos a carcinógenos como fumo e o álcool.² A amostra do presente estudo foi composta por indivíduos do gênero masculino na mesma faixa etária expostos a um dos carcinógenos (fumo) no momento inicial do processo de abandono do hábito de fumar.

Este estudo procurou abordar uma lacuna presente na literatura, pois o abandono do fumo é importante para prevenção do câncer bucal, e não há trabalhos na literatura voltados para avaliação dos efeitos do abandono do fumo sobre as células da mucosa bucal.³

Como observado, os indivíduos que participaram do grupo de abandono de fumo do HCPA totalizaram 58 indivíduos e destes somente 14 preencheram todos os requisitos da pesquisa. Dos indivíduos incluídos, 50% cessaram o hábito de fumar após 6 meses e foram incluídos no G_{ABF}; o restante que não abandonou o fumo foi incluído no G_{NABF}. Este trabalho avaliou os efeitos causados pelo fumo e seu abandono em células esfoliadas da mucosa bucal até 6 meses. O protocolo usado no serviço de pneumologia do HCPA no Grupo de abandono de fumo foi através de terapia cognitivo-comportamental em grupo, associada, de acordo com critérios clínicos, à bupropiona ou adesivo de nicotina. A abordagem em grupo foi realizada em seis sessões semanais, duas sessões quinzenais, seguidas de reuniões mensais no período de seguimento. A terapia medicamentosa foi administrada por 8 a 12 semanas.

Uma das limitações deste estudo foi a não obtenção do número de indivíduos previstos pelo cálculo do tamanho amostral. Fatores como a demanda assistencial, a forma de recrutamento dos pacientes e a duração do estudo influenciaram o tamanho da amostra. A maioria dos pacientes que procura ajuda para parar de fumar era do sexo feminino e uma parcela dos homens apresentava menos de 30 anos. Os pacientes foram selecionados no

momento de inclusão no programa de tabagismo, isto é, no início do grupo, que ocorria a cada dois meses, dificultando o recrutamento.

Outra questão é que o abandono do tabagismo não é previsível e nem sempre é alcançado, como descrito em estudos anteriores,¹⁹⁻²¹ diminuindo o número da amostra. A desistência do projeto por motivos pessoais também gerou diminuição da amostra.

A média de idade dos indivíduos não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos deste trabalho e também quando comparados com os resultados de Gedoz et al.¹⁶

Entre os grupos G_{NABF} e G_{ABF} , não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao tempo do hábito de fumar, apresentando a média de 38,93 anos de hábito.

A citopatologia associada com a técnica histoquímica de AgNOR mostrou neste estudo, assim como já foi demonstrado em outros estudos,^{7, 10, 15, 16} tratar-se de um método rápido, não invasivo e de baixo custo, podendo ser um método útil para o monitoramento de risco em indivíduos expostos.

Os sítios anatômicos da mucosa bucal considerados para coleta e avaliação foram o lábio inferior, a borda de língua e o assoalho bucal, sendo estes relatados na literatura como os locais mais acometidos pelo carcinoma espinocelular.^{4, 6}

Inicialmente julgamos conveniente salientar os resultados citopatológicos obtidos da mucosa de transição do lábio inferior. Neste trabalho, o lábio inferior, quando analisado, mostrou na (figura 1) que no G_{NABF} as médias de número de AgNORs por núcleo encontradas não mostraram um padrão crescente como observado em borda de língua e assoalho bucal no decorrer dos tempos das coletas. Foi observado que houve um aumento na média do número de AgNORs por núcleo no período de 3 meses. No tempo de 6 meses, houve uma redução. Estes resultados que não apresentaram diferenças estatísticas significativas (tabela1), concordam com Paiva et al.¹⁵ e Gedoz et al.¹⁶ quando afirmam que este sítio anatômico está exposto a outros fatores de risco diferentes do fumo e álcool cujo controle torna-se muito difícil (exposição solar, hábitos locais como chimarrão, café quente, herpes). A mucosa do lábio inferior é um sítio com alta incidência de carcinoma e, portanto, deve ser monitorado em estudos futuros que possam avaliar outros fatores envolvidos na

carcinogênese, sugerindo finalmente que este sítio anatômico deve ser abordado em estudos individualizados.

A comparação das médias de número de AgNORs por núcleo e as porcentagens de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs entre o GC e o grupo de fumantes no momento inicial não mostrou diferença estatisticamente significativa, podendo este achado ser justificado pelo tamanho da amostra, já que outros estudos apresentaram diferença entre estes grupos.^{10, 15} Nesta comparação entre o GC e o grupo de fumantes, no momento inicial não houve diferenças estatísticas, quando considerados os diferentes sítios estudados.

Foi realizada a comparação entre o GC deste estudo com os de grupos controle de outros estudos com metodologia semelhante.^{15, 16} Foi observada diferença estatisticamente significativa somente na mucosa do lábio inferior onde o presente trabalho mostrou uma média do número de AgNORs menor. A diferença estatística que foi observada em mucosa do lábio inferior pode ser explicada pela diferença populacional nas amostras dos outros dois trabalhos, composta por profissionais que passam longo período expostos à radiação solar, sendo este um fator que pode estar relacionado ao maior ritmo de proliferação celular encontrado pelos autores.

Com relação à mucosa da borda de língua, observa-se que o efeito do fumo avaliado em uma perspectiva longitudinal apresentou diferença estatisticamente significativa para porcentagem de núcleos com $\geq 3 < 5$ e ≥ 5 AgNORs (tabela 1). Este achado indica que a continuidade do hábito promoveu aumento da proliferação celular neste sítio anatômico ao longo do tempo, sendo este achado semelhante aos de Gedoz et al.¹⁶

Analisando os achados nos diferentes sítios anatômicos no grupo de fumantes no momento inicial e no GC, nota-se que a borda de língua apresenta menor ritmo de proliferação em relação ao lábio inferior e assoalho bucal (tabelas 1 e 2), como mostrado em trabalhos anteriores.^{10, 15}

A mucosa do lábio inferior e do assoalho bucal não apresentou diferença significativa quando os grupos G_{NABF} e G_{ABF} foram comparados com o GC nos tempos de 3 e 6 meses (tabela 2). Com estes achados pode-se sugerir que o assoalho bucal não seria o sítio anatômico mais sensível para identificar e monitorar alterações dos indivíduos fumantes ou que abandonaram o fumo, discordando dos achados de Cançado et al.¹⁰

Uma possibilidade para explicar esse achado seria que a mucosa do assoalho de boca necessita de um tempo maior de abandono para mostrar alguma variação. Em relação à mucosa de transição do lábio inferior, pode-se, com estes dados, reforçar o que foi relatado anteriormente que este sítio anatômico sofre influências de outros fatores não controlados neste estudo e/ou também necessita de um tempo maior para indicar sinais de volta à normalidade.^{15, 16}

Considerando a média do número de AgNORs por núcleo, a borda de língua mostrou diferenças estatísticas nos grupos G_{NABF} e G_{ABF} em relação ao GC (tabela 2), como nos trabalhos de Cançado et al.¹⁰ e Paiva et al.¹⁵ mostrando aumento na taxa de proliferação celular desta região, quando permanece exposta ao fumo. No G_{ABF}, foi possível constatar que a suspensão do hábito indicou aumento na taxa de proliferação no momento de 3 meses e em 6 meses mostrando diminuição deste valor, sugerindo que na mucosa da borda de língua ocorre mudança no ritmo de proliferação celular, sendo este sítio mais sensível para detectar alguma alteração no tempo de 3 e 6 meses (tabela 2).

No G_{NABF}, a comparação com o grupo controle em relação aos achados da borda de língua apresentou aumento de núcleos com ≥ 5 AgNORs nos períodos de 3 e 6 meses, confirmando que a borda de língua foi o sítio anatômico que indicou variabilidade da velocidade de proliferação nos tempos de observação, com este critério. Estes resultados indicam que o não abandono do fumo promove aceleração da velocidade de proliferação das células da mucosa da borda da língua. Adicionalmente, a quantificação de células com $\geq 3 < 5$ AgNORs por núcleo igual ou maior do que 45% e a porcentagem de células com ≥ 5 AgNORs por núcleo igual ou maior que 7% poderia ser uma sinalização de risco para o indivíduo fumante.

Os resultados apresentados neste estudo, dentro de suas limitações, indicam ainda que a borda de língua é o sítio anatômico que apresentou sensibilidade no monitoramento de indivíduos considerados de risco em fase de abandono já aos 6 meses.

Os achados encontraram em média menos do que 10% de células com mais de 5 AgNORs por núcleo, o que coincide com os encontrados por Xie et al., que sugere a distinção entre epitélio normal, displasia e carcinoma

espinocelular, observando em seu estudo no epitélio normal que a porcentagem de núcleos com >4 AgNORs foi menor que 10%, indicando este número como um indicador de ponto de corte entre epitélio normal e aquele que já dá indicações de alterações rumo à displasia.¹⁴

A diminuição das médias de AgNORs por núcleo observadas na figura 1 no G_{ABF} no tempo de 6 meses pode sugerir que ao longo do tempo esses indivíduos apresentam a tendência de regressão do ritmo de proliferação, diferente do G_{NABF} que apresenta um valor crescente das médias ao longo do tempo. Pode-se sugerir ainda que o tempo de avaliação de 6 meses não foi suficiente para o retorno da normalidade do ritmo de proliferação no G_{ABF} na mucosa da borda da língua.

Apesar da existência de diferenças estatisticamente significantes na borda de língua, pode-se observar os gráficos que mostram a evolução individualizada (ANEXO IV) que, mesmo com esta diferença, nota-se que o ritmo de proliferação é variável e apresenta características individuais, reforçando a ideia de Gedoz et al.¹⁶ que sugerem o uso deste monitoramento de forma individual nos grupos de risco.

Foi observada uma redução nos dados do indivíduo tratado de carcinoma espinocelular e foi analisado de forma isolada. No momento da coleta, o mesmo relatou ter tido o tumor há mais de 5 anos, e como não apresentou recidiva foi considerado curado e estava aguardando cirurgia de reconstrução. Os resultados encontrados a partir da média do número de AgNORs e da porcentagem de núcleos com ≥ 3 <5 e ≥ 5 AgNORs presentes na (tabela 3) foram considerados satisfatórios por terem apresentado uma redução tanto no lábio inferior quanto na borda de língua. Os valores encontrados após 6 meses de abandono são compatíveis com o grupo controle, confirmando assim a ausência de aspectos subclínicos que poderiam indicar alguma alteração em decorrência do Carcinoma Espinocelular.

O trabalho de Paiva et al.¹⁵ e o da Gedoz et al.¹⁶ utilizaram a mensuração da área de AgNOR e ambos concluíram que a utilização da média do número de AgNORs por núcleo foi suficiente para avaliar a efetividade de proliferação celular da mucosa bucal nos sítios analisados e sugerem ainda que a avaliação da média da área não foi mais sensível. E para um estudo de população, isto pode ser um empecilho, pois exigiria mais tempo, dedicação e

também utilização de outros *softwares* que podem dificultar o patologista para realizar esta avaliação.^{15, 16}

Os resultados encontrados demonstram que a citopatologia associada à técnica histoquímica de AgNORs é um método que pode ser empregado no monitoramento individual em grupos considerados de risco.

Sugerimos ainda que a análise da mucosa do lábio inferior deve ser realizada em estudos que possam controlar outros fatores que podem influenciar a velocidade de proliferação, preferencialmente de forma isolada.

Os sítios anatômicos avaliados apresentam diferentes padrões de maturação, e a borda de língua apresentou menor taxa de proliferação celular independentemente da exposição ao fumo, quando comparada com o lábio inferior e o assoalho bucal.

Sugere-se também que a borda de língua apresenta maior sensibilidade para os efeitos do fumo e seu abandono no período de 6 meses, considerando os 3 parâmetros analisados.

Podemos ainda concluir que o fumo em avaliação longitudinal promoveu aumento da velocidade de proliferação em borda de língua.

Considerando a variabilidade encontrada nos parâmetros avaliados, sugere-se que o monitoramento deve ser realizado de forma individualizada.

REFERÊNCIAS

1. Garcia M, Jemal A, Ward E, Center M, Hao Y, Siegel R, et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. *Journal* [serial on the Internet]. 2007 Date.
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer. Brasil; 2007 [updated 2007 11/26/2007; cited 10/25/2007]; Capturado 2007 Novembro.2026]. Available from: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324.
3. Vainio H, Weiderpass E, Kleihues P. Smoking cessation in cancer prevention. *Toxicology* 2001;166:47-52.
4. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro RJ; 2004.
5. Squier CA. Smokeless tobacco and oral cancer: a cause for concern? *CA Cancer J Clin* 1984;34:242-247.
6. Braga FL, Meneguzzi RD, Paiva RL, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. *Revista Odonto Ciência - Faculdade de Odontologia PUCRS* 2004;19:157-163.
7. Pinto TAS, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJD. Avaliação Quantitativa de Núcleo/Citoplasma e AgNORs em Células da Mucosa Bucal de Fumantes e Não Fumantes. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*. 2003:12-14.
8. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 2005;578:371-381.
9. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol* 2005;49:265-272.
10. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol* 2001;37:446-454.
11. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000;31:117-120.
12. Schwartz JL, Muscat JE, Baker V, Larios E, Stephenson GD, Guo W, et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral Oncol* 2003;39:842-854.

13. van Oijen MG, Gilsing MM, Rijksen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral Oncol* 1998;34:297-303.
14. Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997;79:2200-2208.
15. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:175-180.
16. Gedoz L, Lauxen Ida S, Sant'Ana MF, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol* 2007;29:231-238.
17. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5-14.
18. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989;158:185-188.
19. Hamadah O, Hepburn S, Thomson PJ. Effects of active non-smoking programmes on smoking behaviour in oral precancer patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:706-711.
20. Khuder SA, Dayal HH, Mutgi AB. Age at smoking onset and its effect on smoking cessation. *Addictive Behaviors* 1999;24:673-677.
21. Anthenelli RM, Blom TJ, McElroy SL, Keck PE, Jr. Preliminary evidence for gender-specific effects of topiramate as a potential aid to smoking cessation. *Addiction* 2008;103:687-694.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da citopatologia agregada á técnica histoquímica de AgNORs mostrou-se eficiente para avaliação da variação da velocidade de proliferação de células epiteliais descamadas da mucosa bucal.

Os dados deste estudo sugerem que o abandono do fumo deve ser preconizado para prevenção do câncer bucal, pois foi possível demonstrar a diminuição no ritmo de proliferação celular em mucosa de borda de língua.

Para avaliação citopatológica do lábio inferior, outros fatores etiológicos devem ser avaliados a fim de buscar uma melhor definição dos irritantes que atuam sobre este sítio anatômico.

Os resultados deste trabalho, assim como trabalhos anteriores, reforçam a ideia de que o monitoramento da mucosa bucal através da quantificação de AgNORs deve ser feito de forma individual em população de risco. Todos os indivíduos expostos aos carcinógenos devem ser considerados de risco e deveriam ser monitorados, uma vez que não existe ainda uma forma eficaz de estabelecer quais indivíduos fumantes irão desenvolver câncer bucal, existe ainda a vantagem secundária de se poder expandir esta observação gerando uma noção epidemiológica deste risco.

Estes resultados sugerem que outros estudos longitudinais de abandono de fumo e com tempo maior de acompanhamento devem ser realizados para estabelecer o período de tempo necessário para as células da mucosa bucal voltarem totalmente ao ritmo considerado normal de proliferação, se é que ele ocorre. A complementação de estudos sobre a velocidade de proliferação com a avaliação do dano genético e sua possível reversão também devem ser considerados.

Este estudo sinalizou que a mucosa da borda de língua é o sítio anatômico mais sensível aos efeitos do fumo e seu abandono, destacando este local como mais susceptível a alterações causadas pelo fumo.

ANEXOS

ANEXO I

TÉCNICA CITOQUÍMICA DE AgNOR

Esta técnica de AgNOR foi desenvolvida baseada na técnica descrita por *Ploton et al* (1986) e seguiu os seguintes passos:

- Fixação em álcool etílico 96%
- Desidratação com álcool etílico absoluto
- Pós-fixação em uma mistura de álcool etílico absoluto e ácido acético (solução 3:1) por 10 minutos
- Lavagem em água destilada
- Impregnação pela Prata, gotejando a solução coloidal sobre as lâminas colocadas em câmara úmida levada a estufa por 20 minutos a 35°C. A solução colóide de Prata é preparada na hora de uso pela dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, misturado numa proporção de 1:2 partes com solução aquosa de nitrato de Prata em concentração de 50%.
- Duas lavagens em água deionizada aquecida a 35°C, para facilitar a remoção da gelatina e uma em água deionizada a temperatura ambiente.
- Desidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Entellan (Merck®).

ANEXO II**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TÍTULO DO PROJETO: ESTUDO DO EFEITO DO FUMO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA SUSPENSÃO DO HÁBITO.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

- Objetos da pesquisa: avaliar, alterações celulares nas células da mucosa bucal obtidas por raspagem.
- Procedimentos que serão realizados: serão realizados raspagem com a utilização de escova (semelhante a uma escova dental) na mucosa bucal de indivíduos não expostos ao fumo. Além disso, 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 e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento, da justificativa e 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 dos procedimentos, riscos, 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 de 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: 33288600 ou 98211599).

Nome e Assinatura do voluntário

Data: _____ Telefone: _____

Nome e assinatura do pesquisador

Data: _____

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

ANEXO III

Aprovação dos comitês de ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-262

Versão do Projeto: 25/06/2008

Versão do TCLE: 25/06/2008

Pesquisadores:

MARLI MARIA KNORST

FABIO VIEIRA DE MIRANDA

PANTELIS VARVAKI RADOS

Título: ESTUDO DO EFEITO DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO HÁBITO TABÁGICO SOBRE A VELOCIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 01 de julho de 2008.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



Universidade Federal do Rio Grande do



Faculdade de Odontologia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

Número: 283/08

Título: ESTUDO DO EFEITO DO FUMO SOBRE A IDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL – AÇÃO DA SUSPENSÃO DO HÁBITO.

Investigador(es) principal(ais): Professor Pantelis Varvaki Rados, Dra. Marli Knorst e CD. Fábio Meira de Miranda.

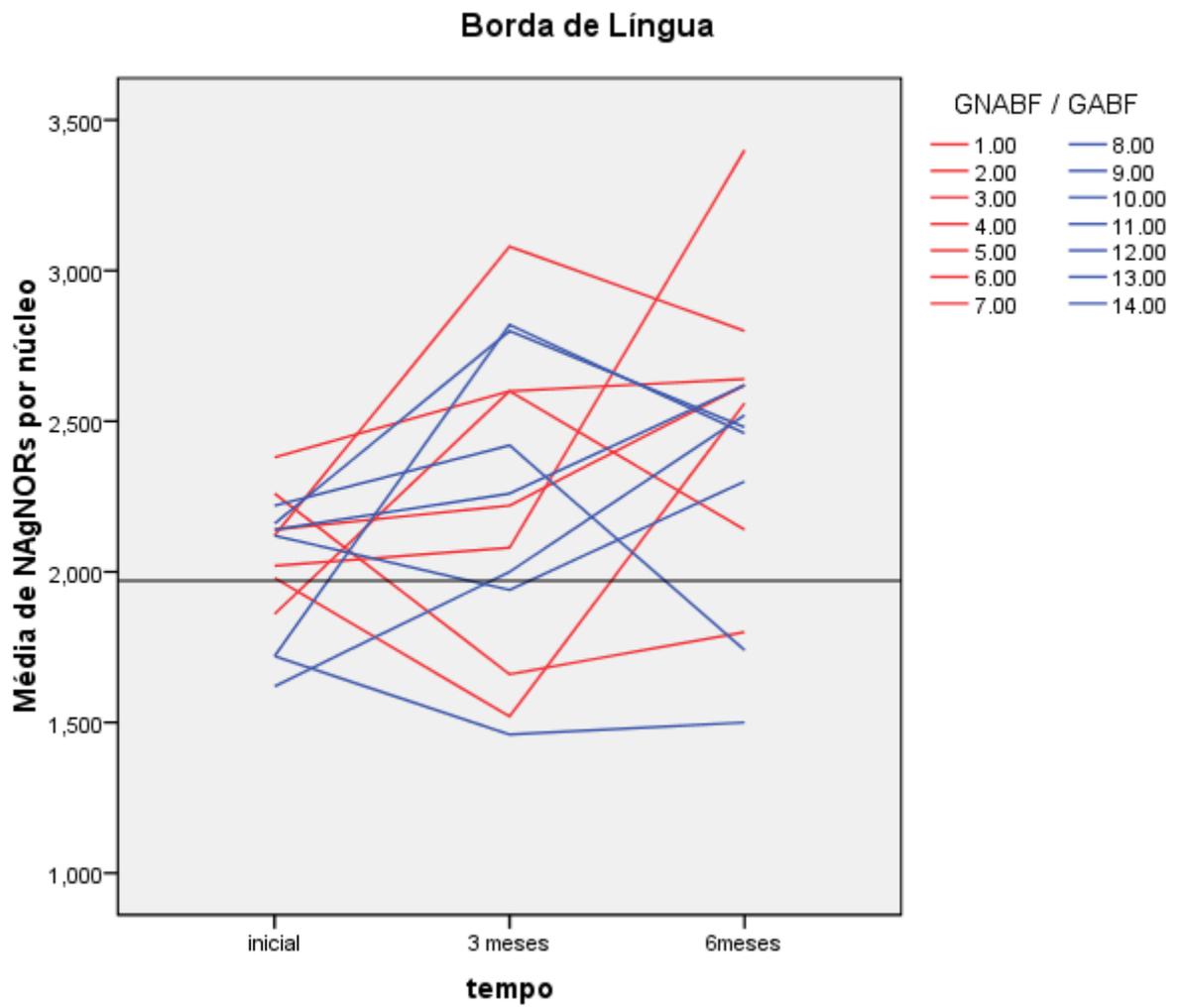
O Projeto foi aprovado na reunião do dia 14/08/2008, Ata nº 08/08 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 15 de agosto de 2008.

Prof^ª. Heloisa Emília Dias da Silveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas

Prof^ª. Deise Ponzoni
Coordenadora da Comissão de Pesquisas

ANEXO IV



Borda de Língua

