

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

MARIA ADRIANA SKEFF DE PAULA MIRANDA

**MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES: UM
TESTE DE PREDIÇÃO PARA O CÂNCER BUCAL.**

FORTALEZA – CE

2006

MARIA ADRIANA SKEFF DE PAULA MIRANDA

**MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES: UM TESTE DE
PREDIÇÃO PARA O CÂNCER BUCAL.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

FORTALEZA-CE

2006

M644d Miranda, Maria Adriana Skeff de Paula

Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal/ Maria Adriana Skeff de Paula Miranda. 2006.

108 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2006.

1. Neoplasias Bucais. 2. Teste para micronúcleos. 3. Tabagismo. 4. Monitoramento. 5. Alcoolismo. I. Rabenhorst, Silvia Helena Barem (Orient.) II. Título.

CDD 616.99431

MARIA ADRIANA SKEFF DE PAULA MIRANDA

**MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES: UM TESTE DE
PREDIÇÃO PARA O CÂNCER BUCAL.**

Aprovada em: 16 de outubro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Eneida Moraes Marcílio Cerqueira
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

Prof. Dr. Eduardo Costa Studart Soares
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Agradecimentos

Aos pacientes que contribuíram para a realização desse trabalho e cujas palavras, pronunciadas às vezes com dificuldade, me tocaram para um sentido mais humanitário no contexto da relação paciente-profissional e que até então eu não vivenciara.

À professora e pesquisadora Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst que além de me presentear com sua amizade não poupou esforços e se dedicou com afinco a essa pesquisa me ensinando com muita disciplina às práticas dentro de um laboratório e a valorização de um trabalho científico.

À médica e professora do departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) Dra. Eneida Moraes Marcílio Cerqueira pelos treinamentos ao microscópio e transmissão dos conhecimentos de fundamental importância sobre os micronúcleos.

À equipe de médicos cirurgiões de cabeça e pescoço da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, em especial ao Dr. Wilson Mourão Farias e de sua auxiliar Conceição que me deram o prazer de acompanhá-los no seu dia a dia de trabalho.

Aos professores cirurgiões dentistas Dr. Sérgio Luz e Dr. Pedro Teixeira por sempre me abrirem suas portas nas inúmeras vezes que precisei bater. Continuarei batendo.

Ao colega de mestrado e cirurgião dentista Dr. Tarcísio Teobaldo pelo companheirismo durante o curso.

Ao programa de Pós-graduação em Patologia, representados pelos professores e demais funcionários em especial ao Francisco José de Queiroz Sousa (Franzé) e João Carlos da Silva do Laboratório de técnicas especiais citohistopatológicas (LABTECH) do DPML da UFC pela ajuda na padronização da técnica de coloração dos esfregaços. Agradeço também à secretária da pós-graduação Paula Palácio que mesmo com tantos afazeres sempre se disponibilizou a ajudar.

Ao técnico em computação da Secretaria de Educação do Estado do Ceará – NUMEA (Núcleo de Material de Ensino e Aprendizagem) José de Ribamar Magalhães pela ajuda na elaboração das figuras.

Às jovens acadêmicas de medicina Ana Maria Sousa e Érica Coutinho pela ajuda nas práticas de laboratório e na participação dos seminários.

À cirurgiã dentista Dra. Fátima Barbosa do Centro de Especialidades Odontológicas (CEO-centro) e à equipe de professores da disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo espaço cedido para a coleta das lesões pré-malignas.

À chefe e colega cirurgiã dentista presidente da UNIODONTO de Fortaleza Dra. Selene Sales Nogueira Caracas de Souza pela ajuda na hora certa.

Ao companheiro de trabalho Fernando Antônio Holanda Lima pela ajuda nas construções e reconstruções dos gráficos.

Aos professores do Laboratório de Estatística e Matemática Aplicada (LEMA) da Universidade Federal do Ceará Dr. Carlos Robson Bezerra de Medeiros, Dra. Rosa Maria Salani Mota e ao aluno Michel Helcias Montoril pela elaboração das análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, pela convivência prazerosa durante essa caminhada.

Ao companheiro Francisco Flávio Rabêlo pela paciência com que permaneceu ao meu lado durante toda essa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – Capes, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

À Fádua, Maurício, Lorena,
Celena, Fabiana e Louise pelo
amor, total apoio e por
estarem sempre ao meu lado.

“O conhecimento nos torna responsáveis...”

Che Guevara.

RESUMO

Os carcinomas espinocelulares são responsáveis por mais de 90% das neoplasias malignas que ocorrem na mucosa bucal e têm como principal fator de risco o uso crônico do tabaco sob suas diversas formas. Comprovadamente o tabaco industrializado contém inúmeros carcinógenos capazes de causar dano cromossômico. Para detectar o dano inicial na mucosa bucal de fumantes foi utilizado o ensaio do Micronúcleo (MN) em células esfoliadas por ser um teste simples, rápido, de baixo custo e que utiliza técnica não invasiva. Com o objetivo de estabelecer um teste de triagem para monitorar pacientes fumantes sob risco de desenvolver carcinoma bucal foram avaliadas as freqüências dos micronúcleos e de outras alterações nucleares em esfregaços de mucosa bucal, utilizando o protocolo adaptado ao de Tolbert *et al.* (1991). Foram analisados os micronúcleos (MNs), as binucleações e outras alterações nucleares indicativas de citotoxicidade e genotoxicidade como cariorréxis, cariólise, cromatina condensada, picnose, falso micronúcleo, *broken-eggs* e vacúolos nucleares. Foi realizada uma comparação intra-individual da região periférica ao tumor (L) e da mucosa do lado oposto (LOL) dos pacientes com carcinoma e uma outra comparação caracterizada como interindividual, pois comparou indivíduos sadios (controle) e pacientes portadores de carcinomas bucais. Observou-se que a mucosa do lado oposto à lesão (LOL) possui alterações nucleares que a caracterizam como mucosa não sadia e que a alteração tipo cariorréxis demonstrou ser melhor biomarcador para o LOL. Através da curva 'ROC' foram verificados os valores de predição das alterações nucleares estatisticamente significativas resultantes da comparação entre sadios e portadores de câncer bucal. A alteração nuclear cariorréxis foi a que obteve maior sensibilidade (80%) e especificidade (80%). A associação entre as alterações nucleares preditoras de lesão maligna e fatores de risco demonstrou resultados mais fortemente significativos para o tabagismo ($p < 0,001$). Neste estudo os micronúcleos e as alterações nucleares cariorréxis, cariólise, binucleações e vacúolos nucleares foram válidas como preditoras para carcinoma bucal.

Palavras-chave: Neoplasias bucais, Teste para Micronúcleos, monitoramento, tabagismo.

ABSTRACT

Squamous cells carcinomas are responsible for more than 90% of all cancer in the mucosa membranes of the mouth and the principal risk factor responsible is tobacco use. Certainly industrialized tobacco contains a lot of carcinogens able to cause chromosome breakage. The Micronucleus Assay in exfoliated cells was used to detect this initial breakage. It is simple, practical, inexpensive and non invasive technique. The objective of this study is to establish a trial text to monitoring smokers with risk to develop oral carcinoma. Epithelial smears was examined following the criteria described by Tolbert *et al.* (1991), micronucleus, binucleation and the cells presenting degenerative phenomena, indicative of cytotoxicity and genotoxicity such as karyorrhexis, karyolysis, pycnosis, condensed chromatin, buds, broken-eggs, and nuclear vacuoles were analyzed. An intra-individual comparison was realized in patients with cancer (periphery of malign lesion and opposite side of lesion) another comparison characterized as interindividual compared healthy people (control group) and patients with oral carcinomas. The study showed that the side opposite of lesion (LOL) is non health mucosa and karyorrhexis is the best biomarker in this side. The specificity and sensibility of nuclear alterations was analyzed using ROC curve. The results show that karyorrhexis is the better specificity (80%) and sensibility (80%) all of them. The association between the nuclear alterations and risk factors show a higher significant statistical for tobacco use ($p < 0,001$). In this study micronucleus, karyorrhexis, karyolysis, binucleation and nuclear vacuoles are valid to predict oral carcinoma.

Keywords: Oral Cancer, Micronucleus Assay, monitoring, tobacco use.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fluxograma mostrando um esquema simplificado da base molecular do câncer.	20
FIGURA 2	Regiões topográficas da boca e orofaringe.	22
FIGURA 3	Efeitos do tabaco na carcinogênese oral.	26
FIGURA 4	Possibilidades de interação entre exposições às genotoxinas e micronutrientes da dieta levando ao reparo ou dano do DNA e as conseqüências para a saúde.	29
FIGURA 5	Formação dos micronúcleos.	31
FIGURA 6	Vias para produção de estruturas contendo DNA extra-nuclear.	34
FIGURA 7	Confecção dos esfregaços e coloração das lâminas.	40
FIGURA 8	Percentual de indivíduos do grupo controle distribuídos quanto ao sexo (n=35)	42
FIGURA 9	Número de indivíduos do grupo controle, distribuídos segundo o sexo e a faixa etária agrupados por década(n=35).	43
FIGURA 10	Percentual de casos de câncer de boca distribuídos segundo a procedência (n=38).	44
FIGURA 11	Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto ao sexo (n=38).	44
FIGURA 12	Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto ao sexo e a faixa etária agrupados por década (n=38).	45
FIGURA 13	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à presença do fator de risco tabagismo (n=73).	46
FIGURA 14	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto ao tempo de uso do tabaco (tempo em anos).	47
FIGURA 15	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à forma de utilização do tabaco.	47
FIGURA 16	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à quantidade de carteiras de cigarros consumida por dia (uma carteira=20 cigarros).	48

FIGURA 17	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto ao consumo de bebidas alcoólicas.	49
FIGURA 18	Percentual de indivíduos dos grupos estudados, distribuídos quanto ao tempo de consumo de bebidas alcoólicas (tempo em anos).	49
FIGURA 19	Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto à presença dos fatores de risco (tabagismo e etilismo) (n=38).	50
FIGURA 20	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de gengivite.	51
FIGURA 21	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de Doença Periodontal.	51
FIGURA 22	Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de cárie dentária.	52
FIGURA 23	Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto à localização anatômica (n=38).	52
FIGURA 24	Percentual de casos de carcinomas estudados, distribuídos quanto à localização anatômica do tumor e quanto à presença dos fatores de risco: tabagismo e etilismo (n=38).	53
FIGURA 25	Profundidade de invasão tumoral (pT) dos carcinomas estudados, distribuídos quanto a localização anatômica (n=38).	55
FIGURA 26	Estadiamento tumoral no grupo dos pacientes com câncer.	55
FIGURA 27	Percentual de casos de cânceres de boca, agrupados por região, de acordo com o estadiamento (n=38).	56
FIGURA 28	Média dos MNs e das alterações nucleares distribuída nos grupos estudados.	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Número e percentual de indivíduos dos grupos controle (sadios) e com câncer de boca, segundo o uso do tabaco.	38
TABELA 2	Número e percentual de indivíduos dos grupos controle e casos de carcinomas bucais, segundo os tipos de lesões diagnosticadas.	54
TABELA 3	Casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos cervicais (pN) e presença de metástases à distância (pM) (n=38).	54
TABELA 4	Estatísticas descritivas das variáveis por grupo.	57
TABELA 5	Resumo das alterações nucleares significativas nos grupos estudados.	60
TABELA 6	Resultados das alterações nucleares preditoras de lesão bucal, valores de predição dos testes e valores de predição positiva e negativa.	60
TABELA 7	Associação entre as variáveis significativas preditoras de lesão e fatores de risco nos indivíduos sadios e com câncer de boca (n=70).	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos	19
Quadro 2	Comparação entre lesão (L) e lado oposto à lesão (LOL) nos pacientes com câncer bucal.	59
Quadro 3	Comparação entre os grupos controle (C) e lado oposto à lesão (LOL).	59
Quadro 4	Comparação entre os grupos controle (C) e lesão (L).	59

O.M.S. – Organização Mundial de Saúde.

UICC – União Internacional Contra o Câncer.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

CA – Câncer.

CEC – Carcinoma espinocelular.

MN – Micronúcleo.

INCA – Instituto Nacional do Câncer.

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

LOL – Lado oposto à lesão.

L – Lesão.

C – Controle.

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Câncer	18
1.2 Etiologia	18
1.3 O câncer de boca	21
1.3.1 Fatores de risco para o câncer de boca	23
Consumo do tabaco	23
Consumo de bebidas alcoólicas	26
Agentes biológicos relacionados ao câncer de boca	27
Estado nutricional e dieta	28
Higiene e saúde bucal	29
Fatores ambientais e ocupacionais	30
1.4 Detecção de lesão do DNA	31
Os micronúcleos	31
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. Materiais e métodos	38
3.1 Casuística	38
3.2 Aspectos éticos	39
3.3 Coleta das células e confecção dos esfregaços	39
3.4 Coloração e montagem das lâminas	40
3.5 Avaliação histopatológica	40
3.6 Análise citogenética	40
3.7 Análise estatística	41
3.8 Programas computacionais	41
4. Resultados	42
4.1 Análise clínico-epidemiológica	42
Caracterização dos grupos	42
4.2 Fatores de risco	45
4.2.1 Consumo do tabaco	45
4.2.2 Consumo de bebidas alcoólicas	48
4.2.3 Associação entre tabaco e álcool	49

4.2.4 Saúde bucal	50
4.3 Sítio anatômico das lesões	52
4.4 Análise histopatológica	53
4.5 Análise das Alterações Nucleares	56
4.5.1 Comparação Intra-individual	58
4.5.2 Comparação interindividual	59
a. Controle e lado oposto à lesão	59
b. Controle e lesão	59
4.5.3 Valores preditivos das alterações nucleares	60
4.5.4 Associação entre alterações nucleares preditoras de lesão maligna e fatores de risco	61
5. Discussão	63
5.1 Análise clínico-epidemiológica	64
5.2 Fatores de Risco	65
5.3 Saúde bucal	65
5.4 Sítio anatômico das lesões	66
5.5 Análise histopatológica	66
5.6 Análise das alterações Nucleares	67
5.6.1 Comparação intra-individual	69
5.6.2 Comparação interindividual	70
5.7 Valores preditivos das alterações nucleares e fatores de riscos	70
6. Conclusões	74
7. Referências Bibliográficas	75
8. Anexos	88
Anexo I - Protocolo de coloração de esfregaço bucal para detecção do micronúcleo (FEUGEN-ROSSEMBECK)	89
Anexo II - Protocolo de preparação do metabissulfito de sódio	90
Anexo III - Protocolo de confecção do Reativo de Schiff	91
Anexo IV - Protocolo de confecção do <i>fast-green</i>	92
Anexo V - Cadastro para dados epidemiológicos dos pacientes	93
Anexo VI - Termo de consentimento do paciente	95
Anexo VII - Aceite do Conselho de Ética	96

Anexo VIII - Análise de Comparações Múltiplas	97
Anexo IX - Curva 'ROC'	98
Anexo X - Gráficos das distribuições das alterações nucleares nos grupos estudados	100
Anexo XI - Apresentação em Congresso	104
Pranchas	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer (CA) é considerado doença genética que ocorre por um acúmulo de mutações responsáveis por alterar pontos específicos do DNA, podendo afetar os genes supressores tumorais, os oncogenes ou os genes comprometidos com o reparo do DNA (CONTRAN *et al.*, 2000).

Na atualidade, o câncer configura-se como um grande problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento. É a segunda principal causa de morte por doença, levando a óbito 12% da população mundial (BRASIL. INCA, 2006).

No Brasil, o câncer ocupa o segundo lugar em mortalidade e as estimativas para 2006 são de que ocorrerão 467.440 casos novos. Para o sexo masculino, são esperados 229.610 novos casos, enquanto que para o sexo feminino são estimados 237.830.

1.2 Etiologia

Os dois principais fatores que atuam conjuntamente na gênese do câncer são os fatores endógenos e as exposições aos fatores exógenos. Os endógenos estão ligados a fatores genéticos, e dependem da capacidade de cada organismo em reagir às agressões externas, por isso apresentam grande variabilidade interindividual. Os exógenos correspondem aos hábitos ou costumes próprios de uma população, ou seja, estão ligados a cultura ou ambiente social. Assim a ação de ambos os fatores inicia os processos de mutagênese e carcinogênese (RIBEIRO, *et al.*, 2003).

O quadro 1 mostra alguns agentes mutagênicos aos quais os indivíduos estão expostos com maior frequência.

Tipo		Exemplos
ENDÓGENOS		Óxido nítrico Radicais livres de oxigênio Formação de nitrosaminas endógenas
EXÓGENOS	Ocupacional	Produtos petroquímicos Produção de energia nuclear Produção de ferro e aço
	Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos Mutágenos gerados no processo de preservação de alimentos
	Radiação	Exposição médica – Raios X para diagnóstico e radioterapia Exposição a lixo nuclear
	Poluição	Efluentes industriais Subprodutos da cloração da água Emissões por motores de veículos Pesticidas usados na agricultura Incineração de lixo
	Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactérias ou parasitas.

Quadro 1. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos (adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2003).

O dano inicial ao DNA de uma célula, como se observa resumidamente na figura 1, traz como conseqüências alterações no processo de divisão celular favorecendo a ação dos carcinógenos químicos que irão iniciar a formação do tumor, passando para os estágios seguintes de promoção onde o processo evolui até constituir-se um tumor

observável. Desse modo, as etapas da carcinogênese foram divididas didaticamente em iniciação, promoção e progressão tumoral (CONTRAN *et al.*, 2000).

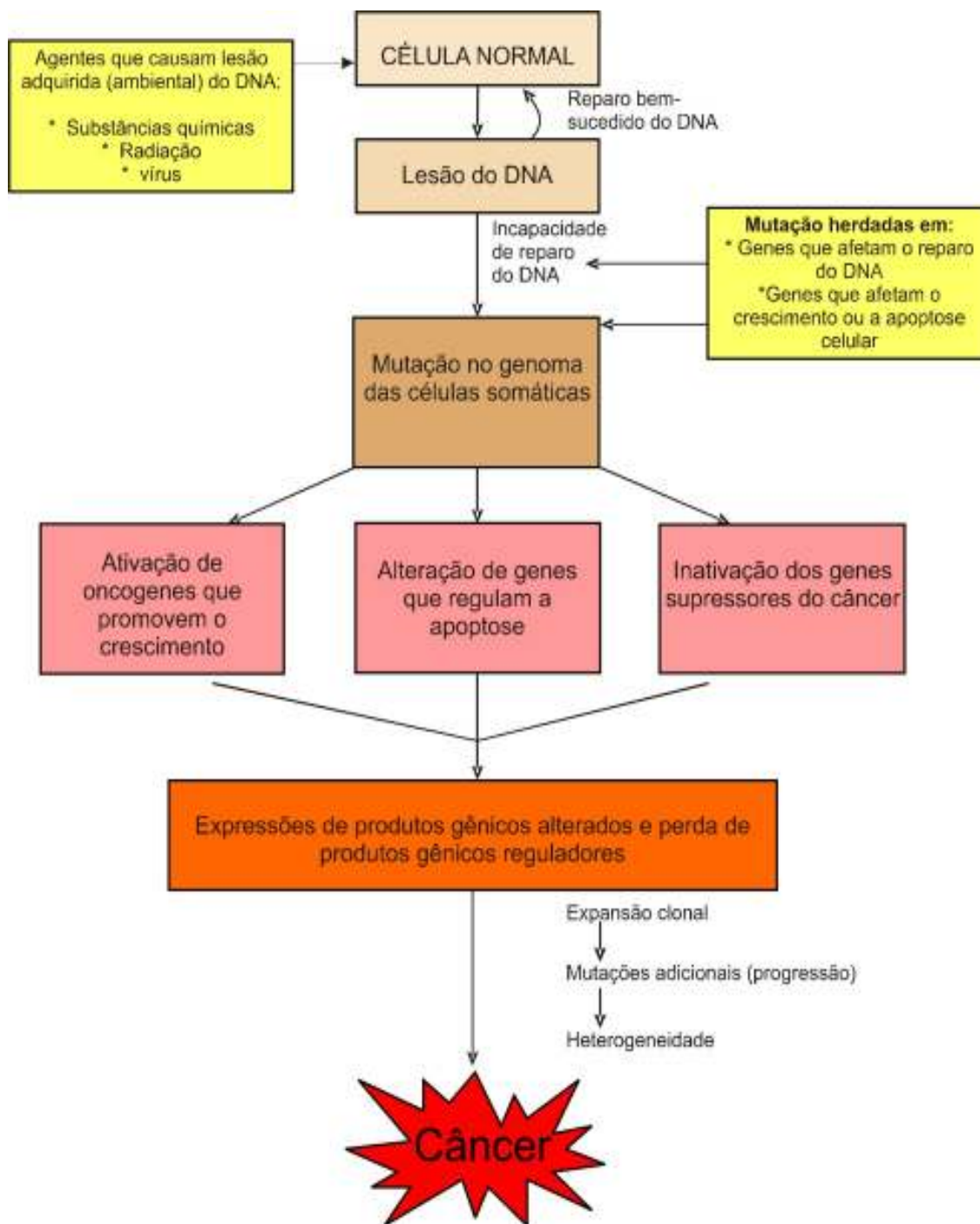


FIGURA 1. Fluxograma mostrando um esquema simplificado da base molecular do câncer (adaptado de CONTRAN *et al.*, 2000).

A constante exposição aos diferentes tipos de misturas químicas presentes no ambiente e que contêm tanto agentes iniciadores como promotores talvez explique o porquê da maioria dos tipos de cânceres, de 80% a 90% dos casos, estarem associados a fatores ambientais (RIBEIRO *et al.*, 2003; HEDDLE *et al.*, 1991).

1.3 O câncer de boca

Mundialmente os cânceres de cabeça e pescoço correspondem a 10% dos tumores malignos e aproximadamente 40% ocorrem na cavidade oral ocupando uma posição de destaque devido a sua alta incidência e comportamento agressivo, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade (DEDIVITIS *et al.*, 2004; COSTA; MIGLIORATI, 2001;).

As estimativas de incidência de câncer para 2006 no Brasil apontam o câncer de boca como o 7º mais freqüente entre os homens (com 10.060 casos estimados) e o 8º entre as mulheres (com 3.410 casos estimados) e embora represente menos de 5% dos cânceres é considerada uma das mais prevalentes do mundo juntamente com alguns países em desenvolvimento do Sudeste Asiático. Nos países desenvolvidos, o câncer de boca é incomum, exceto em algumas regiões da França (BRASIL. INCA, 2006; JOHNSON, 2001).

No Ceará a estimativa para o câncer de boca é de 220 casos entre os homens e 180 casos entre as mulheres. Na cidade de Fortaleza, a expectativa é que existam 110 novos casos, com taxa bruta entre os homens de 80 casos e 30 casos entre as mulheres por 100.000 habitantes, colocando esta Capital em quarto lugar em número de casos entre as capitais do país (BRASIL. INCA, 2006).

A denominação câncer de boca inclui os cânceres de lábios e da cavidade oral: mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, alvéolo e assoalho bucal. Acomete principalmente indivíduos tabagistas e os riscos aumentam quando os mesmos são também usuários de bebidas alcoólicas (SUHAS *et al.*, 2004; BRASIL. INCA, 2006; BRASIL, 2002).

A figura 2 aponta as regiões topográficas da boca e orofaringe.

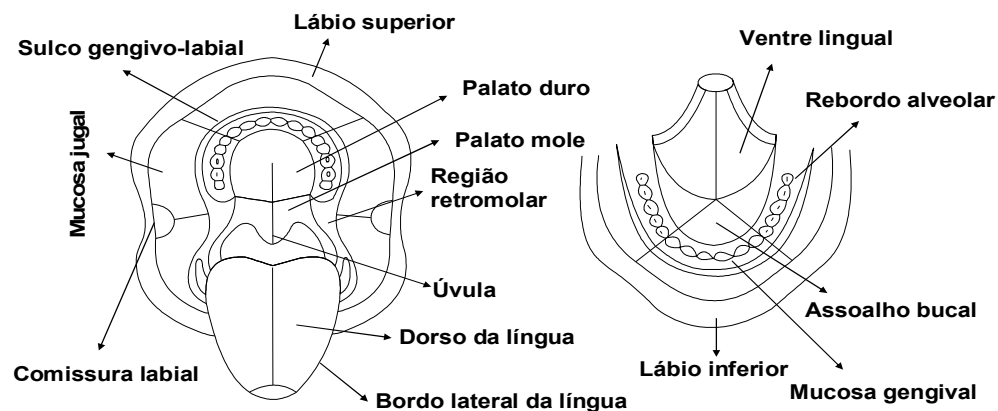


FIGURA 2. Regiões topográficas da boca e orofaringe (adaptado de SUDBØ, J., 2004).

Embora a cavidade oral possa ser acometida por diferentes tipos de neoplasias malignas como os tumores de glândulas salivares (adenocístico, muco-epidermóide, tumor de células acinares e adenocarcinomas), sarcomas e melanomas, o tipo histológico mais freqüente é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC), representando 90% dos tumores malignos dessa região (SOARES *et al.*, 2002; BRASIL, 2002; FENECH *et al.*, 1999).

Quanto à localização, o sítio de maior ocorrência é o lábio, seguido pela língua (bordo lateral) e assoalho bucal (BRASIL. INCA, 2006).

No Brasil o câncer de boca assume maior importância devido às altas taxas de acometimento do lábio, afetando com maior freqüência indivíduos de pele clara, tendo como localização predileta o lábio inferior em relação ao superior. Isso é explicado pelo fato do país ter o clima tropical e ainda permanecer com uma grande quantidade de trabalhadores exercendo atividades rurais se expondo de forma contínua à luz solar (BRASIL. INCA, 2006).

O fato das neoplasias se apresentarem indolores, o atraso no reconhecimento da lesão pelo dentista ou pelo médico e a falta de acesso da população aos serviços de saúde, dificultam o diagnóstico precoce do câncer de boca e de outras lesões pré-

malignas, como as Leucoplasias, que podem preceder o seu aparecimento na boca e que por isso são consideradas precursoras do CEC (SUDBØ, 2004; LEE *et al.*, 2000).

Tendo em vista que no Brasil 65% dos casos de câncer de boca são identificados em fases avançadas, os pesquisadores Leite e Koifman (1998) verificaram que nos pacientes acometidos por câncer de boca, atendidos em hospital de referência no Rio de Janeiro, 50% dos casos foram diagnosticados em estágio IV e somente 8,6% em estágio I. Outro fato que se soma é o atraso na detecção precoce, a demora do diagnóstico e o início do tratamento. Considerando essa problemática relativa ao câncer de boca Costa e Migliorati (2001) avaliaram o tempo decorrido entre a detecção da lesão e o início do tratamento e observaram que os indivíduos acometidos por lesão maligna bucal aguardavam em média 19,3 dias para receberem o diagnóstico de câncer bucal e que, do momento do diagnóstico até o início da terapia decorriam em média 65,7 dias.

Além dos agravantes acima citados, o prognóstico dos tumores de boca também é influenciado negativamente pelos elevados índices de recidivas locais, metástases linfonodais e de segunda lesão primária (BRAAKHUIS *et al.*, 2003; HÁ; CALIFANO, 2003; CARVALHO *et al.*, 2002). Esse fato é bem documentado no estudo de Amar, Franzi e Rapoport (2003) que acompanharam a evolução clínica de 943 pacientes portadores de CEC de boca, faringe e laringe dentre os quais 17% (154) obtiveram recorrência, destes 10% (95) tiveram recorrências isoladas no pescoço, 5% (48) tiveram metástases a distância e 8% (76) desenvolveram um segundo tumor primário.

1.3.1 Fatores de risco para o câncer de boca

Consumo do Tabaco

O tabaco industrializado é considerado o principal fator de risco para o câncer bucal e contém uma grande quantidade de mutágenos e carcinógenos caracterizando-o como um agente cancerígeno completo atuando tanto na iniciação como na promoção e progressão tumoral. Outro agravante em relação ao uso do cigarro é que a ação mecânica produzida pelo atrito com a mucosa somado a agressão térmica devido às altas temperaturas da fumaça aspirada pela boca e pelas vias aéreas provoca inúmeras alterações na mucosa bucal como ressecamento, mudanças no pH, alterações das

respostas imunológicas e alterações da resistência às infecções fúngicas e virais; alterações do epitélio como as leucoplasias, eritroplasias, hiperqueratoses; doença periodontal (aumento de placa e depósitos de cálculos, isquemia e inflamação gengival, bolsa periodontal, recessão gengival e perda óssea); cáries de raiz; alterações gustativas; halitose; manchas nos dentes e nas restaurações e peri-implantites (SHAM *et al.*, 2003; MASHERBERG *et al.*, 1993; KAUGARS *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1989).

O consumo do tabaco está relacionado não só ao aparecimento do câncer da cavidade bucal, mas também ao câncer de faringe, laringe, esôfago, pulmão e brônquios, pâncreas, parênquima renal, pélvis, ureter e bexiga (ABELOFF, 2000).

Embora o cigarro manufaturado ainda seja a forma mais utilizada do tabaco, inúmeras outras formas são utilizadas variando de acordo com os hábitos culturais de cada país (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2005). Jonhson (2001) em trabalho de revisão sobre o uso do tabaco e o câncer bucal cita algumas delas:

- Inalado: cigarros com filtro, cigarro de palha, charuto, cachimbo e cigarro utilizado de forma invertida;
- Aspirado: rapé, que também pode ser usado em contato com a mucosa;
- Mascado (sem fumaça): no Brasil o tabaco usado para mascar é conhecido como “fumo de rolo”, que é a forma como é vendido. Na Ásia, principalmente na Índia, as misturas do bétel¹ são as mais usadas, podendo conter ou não o tabaco, ou ainda ser misturado a diferentes condimentos e ao visgo hidratado². Essas misturas recebem

¹ Palmeira (*areca catechu*) cuja noz é dotada de propriedades tônicas e estimulantes. Encontrada na Índia e no Extremo Oriente. A preparação consiste de uma mistura contendo a noz de bétel, folhas secas dessa palmeira, visgo hidratado e condimentos, podendo conter o tabaco. É considerada o agente etiológico da fibrose submucosa (MAHER *et al.* 1994 apud JONHSON, 2001).

² Substância de pH alcalino utilizada nas preparações do tabaco sem combustão com a finalidade de reter a umidade (NEVILLE *et al.*, 1998).

diferentes denominações de acordo com cada região ou país (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2005; JOHNSON, 2001; SHAM *et al.*, 2003;).

Na Índia e em alguns países da Ásia onde o CA de boca é a neoplasia maligna mais comum e tem relação direta com o tabaco é o responsável por até 50% de todos os casos de cânceres. Nessas regiões as misturas do bétel são mantidas no vestibulo bucal por longos períodos de tempo, apoiando a hipótese de que esses ingredientes combinados possuem propriedades cancerígenas mais potentes que o tabaco quando usado isoladamente (REGESI; SCHIUBBA, 1991).

Comprovadamente mais de 300 carcinógenos já foram identificados no tabaco industrializado. Os mais estudados são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (presentes no alcatrão) e as nitrosaminas. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são formados durante a combustão incompleta da matéria orgânica e, dessa forma, encontram-se presentes na fumaça resultante da combustão do tabaco. As nitrosaminas, presentes tanto na combustão do tabaco como também no tabaco sem fumaça, são absorvidas pelas células que vão dar origem aos queratinócitos (*stem cells*), seguindo para outros tecidos do organismo. As nitrosaminas mais estudadas são as N-nitrosornicotina (NNN) e 4-metilnitrosamina-1-3-piridil-1-butanone (NNK) (JOHNSON, 2001; KARAHALIL *et al.*, 1999).

A nicotina, outra substância também muito estudada e que está presente nas diversas formas do tabaco, embora não tenha propriedade carcinogênica direta, possui elevada toxicidade e funciona como co-fator no processo de carcinogênese (DU *et al.*, 2000). A ação carcinogênica da nicotina foi evidenciada em estudo *in vitro* realizado por Squier e Johnson (1992), onde demonstraram que a nicotina, mesmo em baixas concentrações como a de 2% causa alterações no epitélio da mucosa bucal, deixando-a permeável às substâncias carcinogênicas como as nitrosaminas já citadas anteriormente.

Considera-se que as exposições crônicas aos carcinógenos contidos no tabaco promovam efeitos mutagênicos nas células do epitélio da mucosa bucal levando à instabilidade genômica. Paralelo a esse efeito mutagênico ocorre também a ativação de receptores de proliferação celular. Como consequência desses dois efeitos, mutagênico e proliferativo, os usuários do tabaco poderão desenvolver na mucosa bucal desde lesões pré-malignas até carcinomas invasivos (SUDBØ, 2004).

A figura 03 mostra esquema resumido da carcinogênese oral indicando algumas alterações genéticas relacionadas ao uso do tabaco.

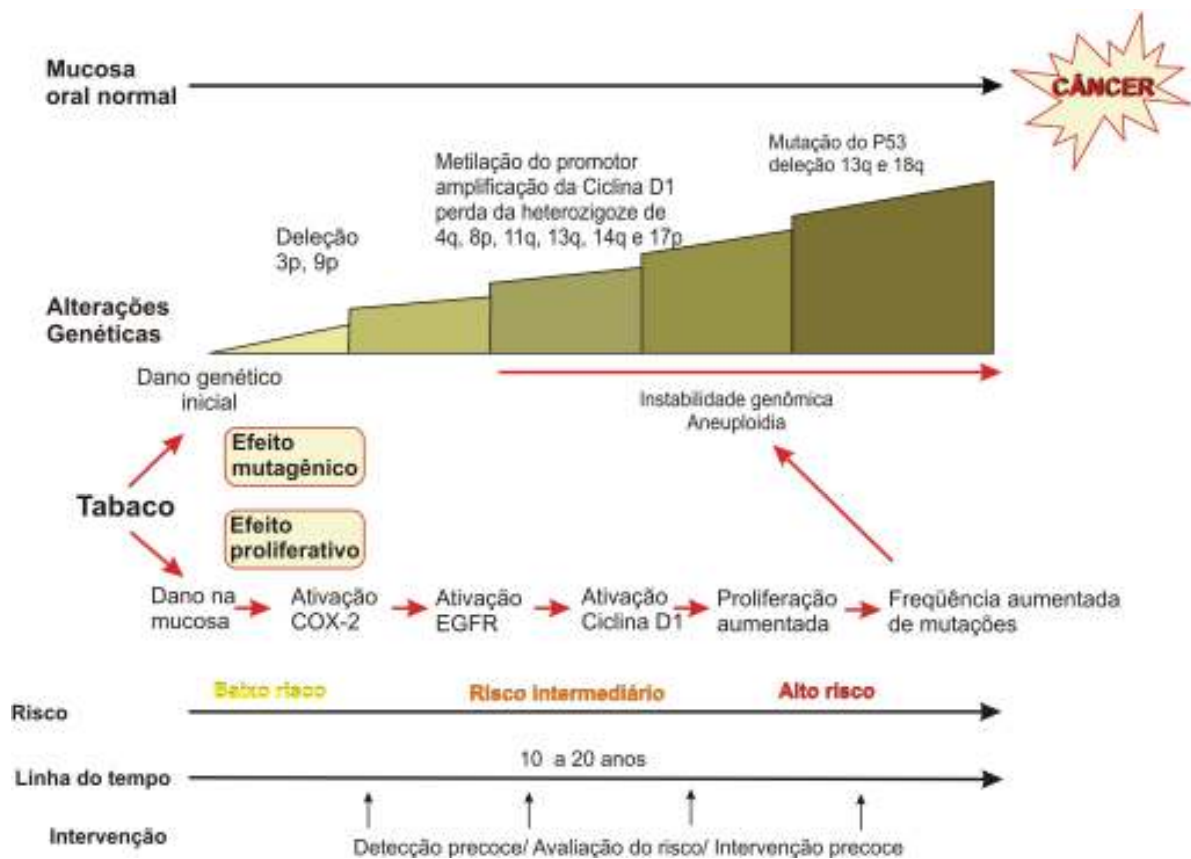


FIGURA 3. Efeitos do tabaco na carcinogênese oral (adaptado de SUDBØ, J., 2004).

Consumo de Bebidas Alcoólicas

O etanol é um dos agentes químicos relacionados ao desenvolvimento de neoplasias do trato gastrointestinal superior e o seu uso abusivo está associado com um risco aumentado de câncer de boca principalmente em sinergismo com o uso do tabaco (RUIZ *et al.*, 2004, STURGIS *et al.*, 2001; ABELOFF, 2000). Não se conhece com exatidão qual o mecanismo responsável por esse aumento de risco já que o etanol por si só não demonstra ser um carcinógeno. Entretanto, estudos como os de Ruiz *et al.* (2004) e Obe e Anderson (1987) citam o acetaldeído, primeiro metabólito do etanol, responsável pelo seu efeito carcinogênico.

O consumo de bebidas alcoólicas tem repercussão no sistema nervoso, cardiovascular, digestório, no desempenho sexual, na medula óssea e principalmente na mucosa bucal, que por ser a primeira parte do organismo a entrar em contato com as bebidas alcoólicas, encontra seus componentes em sua máxima concentração. Assim o etanol é capaz de dissolver o conteúdo lipídico das membranas das células que compõem o tecido epitelial causando um aumento na sua permeabilidade permitindo a penetração dos carcinógenos químicos que irão causar danos ao DNA (RUIZ *et al.*, 2004).

Outro fator agravante é que o álcool por ser rico em calorias, leva os indivíduos alcoólicos crônicos a apresentarem supressão do apetite acarretando uma dieta desequilibrada que, por fim, gera deficiências nutricionais e comprometimento das respostas imunológicas, tornando o organismo predisposto a qualquer tipo de doença. Nos indivíduos alcoólicos crônicos as alterações bucais mais frequentes são: maior índice de cáries, cálculos, alterações nas glândulas salivares, bruxismo, leucoplasia, eritroplasia e também pode estar implicado no processo de transformação maligna do líquen plano oral (RUIZ *et al.*, 2004; JOHNSON, 2001; ABELOFF, 2000).

O uso abusivo do álcool também está relacionado à deficiência na absorção do folato pelo organismo. O folato participa do processo de síntese e reparo do DNA, dessa maneira indivíduos com deficiência de folato teriam um risco aumentado para o câncer bucal (PELUCCHI *et al.*, 2003).

No Brasil o elevado consumo da cachaça (bebida popular fabricada a partir da cana-de-açúcar) é considerado um importante fator de risco para o câncer bucal entre os brasileiros (WÜNSCH-FILHO, 2002).

Agentes biológicos relacionados ao câncer de boca

Segundo Heyden *et al.* 1991, *apud* Oliveira *et al.*, (2002) os vírus que causam tumores contribuem para o desenvolvimento de 20% das neoplasias em humanos, apesar dos mecanismos envolvidos ainda não estarem totalmente esclarecidos.

Um dos vírus mais bem estudados é o Papilomavírus Humano (HPV). Quando associado à outros carcinógenos como fumo e álcool é o principal vírus suspeito de estar relacionado ao aparecimento de lesões benignas, pré-malignas e malignas da cavidade

bucal. É um vírus ubíquo de DNA, pertencente à família Papovaviridae, epiteliotrópico e que tem como principais sítios de infecção a pele e as mucosas (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

São também suspeitos de serem indutores ou promotores do câncer bucal, o vírus do herpes tipo 6 (HSV), vírus do Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus, vírus tipo “C” da hepatite, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da leucemia e do linfoma “T” do ser humano (HTLV) (BRASIL, 2002).

Somado aos vírus, as estomatites crônicas causadas por *Candida albicans* em áreas traumatizadas por próteses mal adaptadas, podem predispor a mucosa ao aparecimento do câncer bucal. Existe ainda associação entre o *Helicobacter pylori* e o linfoma M.A.L.T. (desenvolvido em tecido linfóide encontrado em mucosa) na boca (JOHNSON, 2001).

Estado nutricional e dieta

Estudos recentes têm associado à deficiência de alguns micronutrientes da dieta como os carotenóides, vitaminas C, E e B12, folato, ferro, magnésio, niacina, manganês e zinco à instabilidade genômica. A importância desses micronutrientes se deve ao fato de serem de fundamental importância para o metabolismo e reparo do DNA já que agem como co-fatores e substratos e são necessários também para detoxificação de carcinógenos e apoptose. Quando estão em baixas concentrações produzem desordens genéticas capazes de alterar o genoma de células somáticas e germinativas, e conseqüentemente causarem neoplasias (FENECH, 2005; FENECH *et al.*, 2005; FENECH, 2002a; FENECH, 2002b).

A importância dos carotenóides foi evidenciada em estudos com indivíduos que utilizavam o tabaco sob suas diversas formas e é hoje utilizada como um dos agentes quimiopreventivos mais eficazes (FENECH, 2002b; KAUGARS *et al.* 1992).

A figura 04 mostra como as deficiências dos micronutrientes da dieta e as exposições às genotoxinas podem interferir no reparo do DNA gerando conseqüências para o organismo.

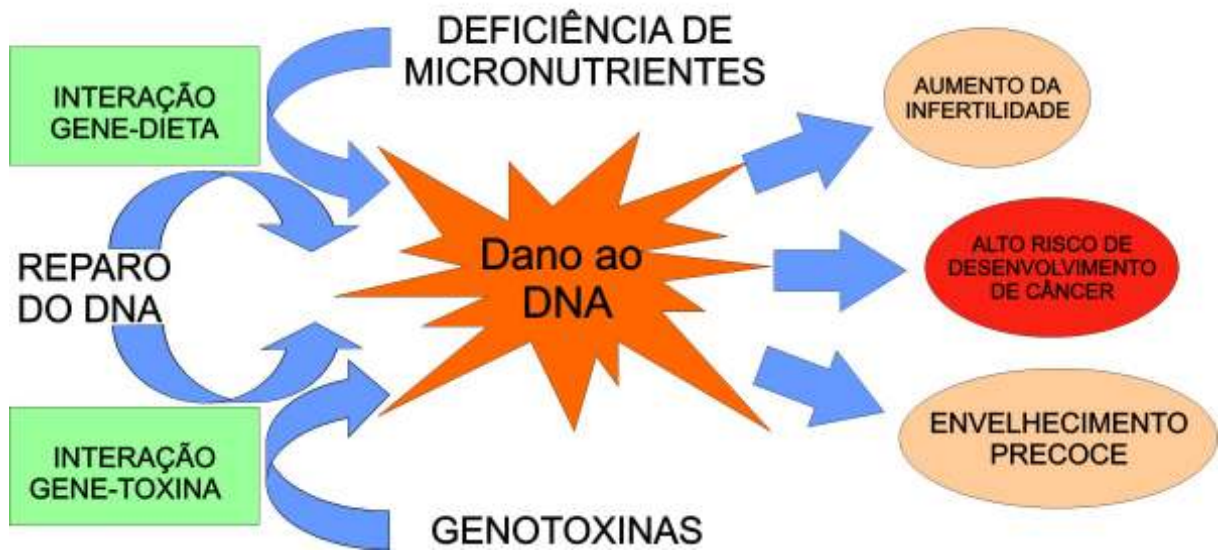


FIGURA 4. Possibilidades de interação entre exposições às genotoxinas e micronutrientes da dieta levando ao reparo ou dano do DNA e as conseqüências para a saúde (adaptado de FENECH, 2002b).

No Brasil estima-se que 11% dos adultos sofram de deficiências nutricionais crônicas, principalmente nas zonas rurais das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste. Esse fato talvez explique o porquê da elevada incidência e mortalidade do câncer de boca nas baixas camadas sociais (MONTEIRO *et al.*, 2000).

Higiene e saúde bucal

A associação entre câncer bucal e higiene oral tem sido relatada em alguns estudos tipo caso-controle, como os de Moreno-López *et al.*, (2000) realizado na Espanha, e o de Franco *et al.*, (1989) realizado no Brasil, onde ambos concluíram que a remoção mecânica da placa bacteriana realizada através da escovação dentária diária, promove a redução de microorganismos e protege o indivíduo contra o risco de desenvolvimento do câncer bucal.

Quanto ao uso de próteses totais ou próteses parciais removíveis, as ulcerações crônicas, causadas pela má adaptação das mesmas, podem funcionar como fatores de

risco quando associadas a outros fatores de risco como, fumo e álcool (BRASIL. INCA, 2005; VELLY *et al.* 1998 apud JOHNSON, 2001).

Fatores ambientais e ocupacionais

Muitos estudos investigam o câncer de boca e à exposição a fatores de risco ambientais e ocupacionais. Como foi visto no quadro 1 é grande a quantidade de mutágenos ambientais aos quais as populações estão expostas.

Tem sido reportado o risco às exposições ambientais às substâncias como aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, formaldeído, benzeno, cromo, cobalto e níquel (ALMEIDA SANTOS *et al.*, 2005; ÇELIK *et al.*, 2003; KARAHALIL *et al.*, 1999).

A radiação solar também é comprovadamente considerado importante fator de risco pela grande capacidade de provocar dano ao DNA. Os indivíduos que estão expostos à radiação actínica têm um risco elevado de desenvolver câncer de lábio, principalmente nos países onde há grande incidência de radiação ultravioleta (AWDE *et al.*, 1996).

O mercúrio, metal altamente tóxico, muito utilizado em consultórios odontológicos para confecção de restaurações de amálgama e que são responsáveis pela contaminação ambiental e exposição profissional foi objeto de estudo de Roth *et al.* (2002) que observaram, ao examinar a mucosa bucal de cirurgiões-dentistas expostos aos vapores de mercúrios, que o dano inicial ao DNA nas células esfoliadas era três vezes mais elevada que nos indivíduos não expostos.

Outra forma de exposição muito estudada e que também está relacionada ao câncer, é a exposição às radiações ionizantes, por causarem mutações gênicas e também aberrações cromossômicas em células somáticas e germinativas. Apesar desse tipo de exposição, foi realizada monitoração citogenética, em um grupo de cirurgiões-dentistas brasileiros. O grupo estava exposto a baixos níveis de radiação X há dez anos. Não foi detectada diferença entre a frequência de células com aberração cromossômica entre o grupo exposto e o grupo controle (MIYAJI; CÓLUS, 2002).

Atualmente as radiografias panorâmicas têm sido muito utilizadas na rotina da clínica odontológica como meio auxiliar no diagnóstico de lesões e fraturas faciais, e também como exame complementar de rotina nos tratamentos ortodônticos. Tendo em

vista esse uso crescente Cerqueira *et al.*, (2004) observaram elevados níveis de genotoxicidade (apoptose) e citotoxicidade (necrose) nas células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos submetidos a esse tipo de exame.

1.4 Detecção de lesão do DNA

Os Micronúcleos

Os micronúcleos (MNs) são estruturas visíveis no citoplasma de células interfásicas, resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem às fibras do fuso no processo de divisão celular, não são incluídas no núcleo das células filhas (HEDDLE *et al.*, 1983).

A figura 5 mostra como se formam os MNs.

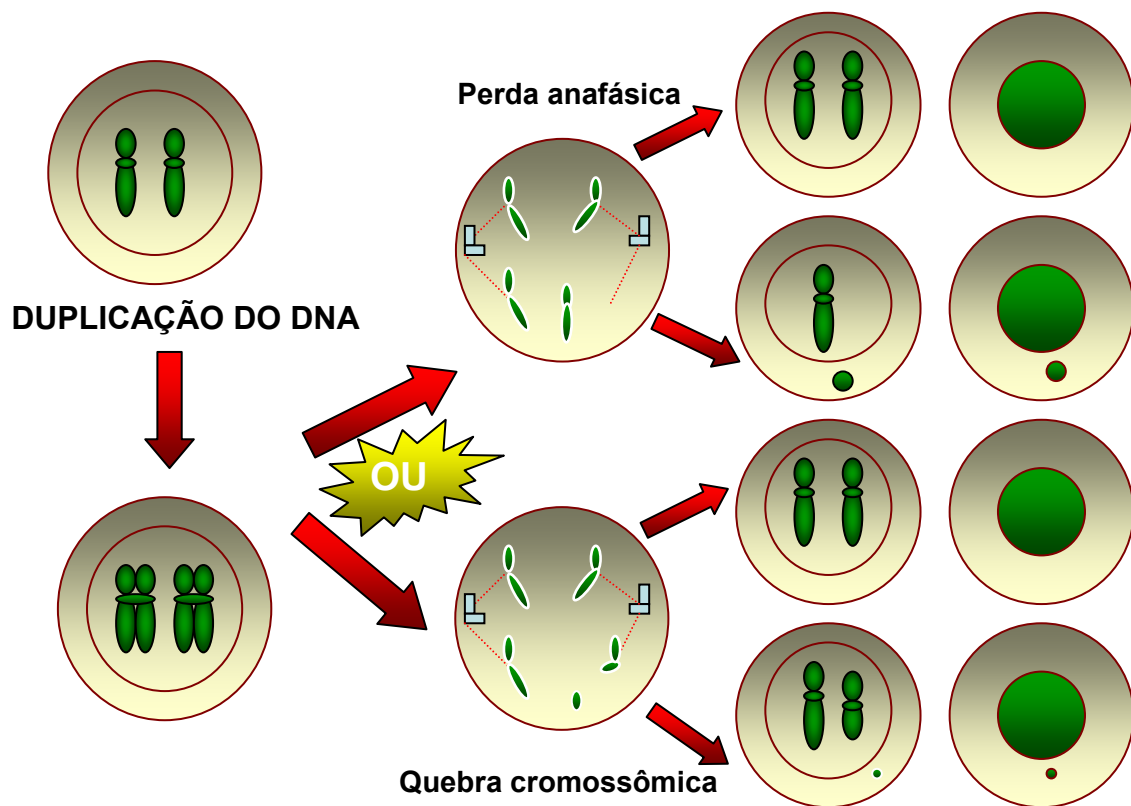


FIGURA 5. Formação dos micronúcleos (cedida por Dra. Eneida M. Marcílio Cerqueira, M.D., Ph.D., Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana).

Por volta de 1900, os micronúcleos foram observados por Howell no citoplasma de eritrócitos que os designou “fragmento de material nuclear”. Jolly, outro pesquisador, usou o termo “corpúsculos intraglobulares” para designá-los. Homenageando estes dois pesquisadores os hematologistas que vivenciaram essa época denominaram os micronúcleos de *Howell-Jolly bodies*. Em 1959, Evans e colaboradores utilizaram os micronúcleos como marcadores de dano citogenético quando irradiaram *in vitro* raízes de cebola (*Vicia faba*) para verificar dano mutagênico. Alguns anos depois, por volta de 1970, K. Boller e W. Schmid utilizaram pela primeira vez a designação Teste do Micronúcleo. Aplicaram-no *in vivo* em medula óssea de roedores (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

O estudo histórico que desenvolveu o procedimento original foi realizado pelos pesquisadores Von Ledebur e W. Schmid em 1973 *in vivo* em medula óssea de roedores. Eles estudaram os micronúcleos em eritrócitos jovens com a finalidade de avaliar danos citogenéticos (HEDDLE *et al.*, 1983; RABELLO-GAY, 1991).

No mesmo ano P. Countryman e J. Heddle mudaram o procedimento original proposto por Schmid e colaboradores. Neste novo procedimento os MNs eram produzidos *in vitro* em cultura de linfócitos tentando medir a normalidade cromossômica. Assim estabeleceram que os MNs são capazes de indicar dano cromossômico e que por isso o teste é potencialmente sensíveis para monitoramento biológico de danos ao DNA (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). Heddle assinalou diversas vantagens e desvantagens do teste:

Vantagens:

- Os micronúcleos podem ser observados em células interfásicas;
- São facilmente reconhecidos;
- O tempo de coleta é menos crítico, pois os micronúcleos formados durante a divisão celular persistem pelo menos através da próxima interfase;
- A frequência espontânea é baixa;
- É um teste claro que mesmo necessitando de interpretação é menos laborioso que outros testes como o de troca de cromátides irmãs;
- Detecta a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos.

Desvantagens:

- Os micronúcleos só aparecem quando a célula alvo se divide e é inteiramente dependente da divisão celular;
- Não detecta não-disjunção mitótica, quando não há perdas de cromossomos na anáfase;
- Aberrações que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos acêntricos, tais como translocações ou inversões, não são detectadas;
- Somente com a frequência de micronúcleos, é difícil distinguir os efeitos clastogênicos daqueles que resultam da perda cromossômica por lesão do fuso (HEDDLE *et al.*, 1983).

Em 1985 Michael Fenech e A. Morley, utilizaram pela primeira vez a citocalasina B, que ao promover o bloqueio da citocinese, restringe a contagem dos micronúcleos em células que passaram por apenas um ciclo de divisão celular. Com essa metodologia os micronúcleos são contados apenas nas células binucleadas reduzindo a limitação do teste *in vitro* onde a cultura de linfócitos continha células que passaram por mais de um ciclo de divisão o que refletia na análise subestimada da frequência de danos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Em células esfoliadas o Teste do Micronúcleo foi aplicado pela primeira vez por Stich e colaboradores em 1982. Desde então inúmeras pesquisas em diversos laboratórios têm investigado os MNs em epitélios expostos a agentes carcinogênicos com o intuito de avaliar dano cromossômico.

A partir da publicação de Tolbert, Shy e Allen (1991) o Teste do Micronúcleo, em células esfoliadas de mucosa bucal exposta, foi considerado capaz de detectar quebra cromossômica e interferências na mitose, fenômenos importantes na carcinogênese e que, nesses epitélios, seria mais vantajoso a sua aplicação em relação ao Teste quando aplicado em linfócitos. Tem as vantagens de ser um teste simples, rápido, econômico, atraumático (não invasivo) e quando aplicado em células esfoliadas é capaz de detectar direto no tecido alvo a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (STICH; ROSIN, 1983; TOLBET *et al.*, 1991). Propuseram um novo protocolo, onde além dos MNs seriam incluídas outras anomalias nucleares como:

- cariorréxis, cromatina condensada e picnose: associadas à citotoxicidade (necrose e queratinização) e genotoxicidade (apoptose);
- cariólise: associada à necrose e queratinização;
- binucleação: provavelmente resultante de interferências em estágios tardios da divisão celular;
- *broken-eggs*: descrito primeiramente por Sarto *et al.* (1987), mas de origem e significado desconhecidos.

A figura 6 mostra o diagrama dessas alterações nucleares.

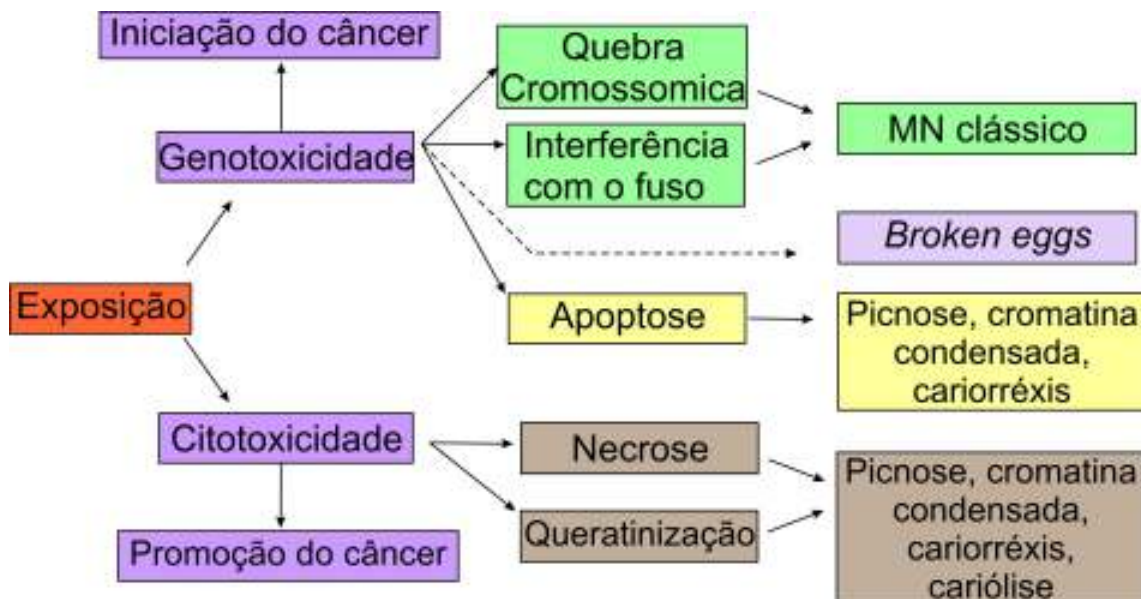


FIGURA 6 – Vias para produção de estruturas contendo DNA extra-nuclear (adaptado de TOLBERT *et al.*, 1992).

Atualmente pesquisas realizadas em diversos laboratórios utilizam esse ensaio. Michael Fenech (Austrália), Stefano Bonassi (Itália), Wushou Chang (Tailândia), Micheline Kirsch-Volders (Bélgica), Nina Holand e Errol Zeiger (Estados Unidos da América) desde 1999 uniram-se em torno de um projeto internacional denominado HUMN (*HUMAN MicroNucleus Project*). O HUMN coleta e organiza informações sobre as frequências dos MNs em diferentes populações, analisa os fatores de variância e assim compara as diversas técnicas empregadas de utilização do Teste em linfócitos do sangue periférico, em células esfoliadas, em eritrócitos e em fibroblasto. O intuito principal está sendo a padronização de protocolos e a realização de estudos prospectivos que permita estudar os MNs como biomarcadores de risco para o câncer e outras doenças crônicas. Estão envolvidos nesse projeto mais de 40 laboratórios da Ásia, Europa e América do Norte.

Hoje se sabe que o ensaio do MN, como também é conhecido, em células esfoliadas permite observar direto no tecido alvo a ação de diversos agentes genotóxicos nas mucosas expostas ao tabaco, álcool, aditivos alimentares, pesticidas, drogas antineoplásicas e radiação (FENECH *et al.*, 1999).

A frequência aumentada dos MNs em células esfoliadas da mucosa bucal foi encontrada nos usuários do Bidi (cigarro muito utilizado na Índia semelhante ao cigarro de palha consumido entre os brasileiros da zona rural), do tabaco sem combustão (rapé e tabaco mascado) e nos que associam tabaco e bebidas alcoólicas (SUHAS *et al.*, 2004; KAUGARS *et al.*, 1992; GHOSE; PARIDA., 1995).

Outra possível aplicação para o Teste do MN seria na avaliação da radiosensibilidade de células humanas. Apoiando essa hipótese Battathiri *et al.*, (1996) e Kolotas *et al.* (1999) avaliaram a presença dos MNs e sua relação com a radiosensibilidade de cânceres de boca em pacientes submetidos a radioterapia. Observaram um aumento na frequência dos MNs nas lesões sensíveis à radioterapia, sugerindo a credibilidade da análise dos MNs como teste de radiosensibilidade.

Há registro na literatura de inúmeros trabalhos utilizando também o ensaio do MN em grupos de indivíduos sob risco biológico, ou seja, ocupacionalmente expostos à substâncias químicas, já citadas anteriormente, tais como: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno, cromo, cobalto, níquel, pesticidas e outros (ALMEIDA SANTOS *et*

al., 2005; ÇELIK *et al.*, 2003; BURGAZ *et al.*, 2002; ROTH *et al.*, 2002; LUCERO *et al.*, 2000; KARAHALIL *et al.*, 1999).

A relevância do estudo dos MNs se deve ainda, ao fato de serem produzidos em eventos iniciais nos processos carcinogênicos humanos, principalmente na região bucal já que a frequência espontânea é baixa em mucosa não exposta (RAMIREZ; SALDANHA, 2002; ROBERTS, 1997; DESAI *et al.*, 1996; GHOSE; PARIDA, 1995; BENNER *et al.*, 1994; STICH; ROSIN, 1983; STICH *et al.*, 1982).

Como consequência de todos esses estudos, o Teste do MN é o ensaio *in vivo* que mais amplamente se utiliza para detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos e o que mais se aplica em Genética Toxicológica. É comprovadamente capaz de detectar a ação de agentes mutagênicos identificando estágios iniciais do processo carcinogênico (RAMIREZ; SALDANHA, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2003; GATTÁS *et al.*, 1992).

Sabendo da elevada incidência do CA de boca na população cearense, da falta de consolidação de parâmetros que avaliem o risco do desenvolvimento desse tipo de neoplasia bem como da ineficácia de sua identificação precoce, constatamos a necessidade da utilização de um biomarcador de exposição. Baseado na eficiência e nas vantagens do Teste do Micronúcleo optou-se por utilizá-lo nesse trabalho. O ensaio foi aplicado em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos portadores de carcinomas bucais, consumidores crônicos do tabaco e do álcool, e de indivíduos clinicamente sadios para avaliar dano cromossômico através das frequências dos micronúcleos e outras alterações nucleares indicativas de genotoxicidade e citotoxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a frequência dos micronúcleos e alterações nucleares como cariorréxis, cariólise, cromatina condensada, *broken-eggs*, falso-micronúcleo, picnose, binucleação e vacúolos nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos clinicamente saudáveis e portadores de carcinomas bucais.

2.2 Objetivos Específicos

1. Comparar a frequência dos micronúcleos e alterações nucleares como cariorréxis, cariólise, cromatina condensada, *broken-eggs*, falso-micronúcleo, picnose, binucleação e vacúolos nucleares na mucosa bucal de indivíduos clinicamente saudáveis e portadores de carcinomas bucais;
2. Verificar se a mucosa do lado oposto à lesão dos pacientes com carcinomas bucais encontrava-se alterada;
3. Revalidar o protocolo padronizado por Tolbert *et al.* (1991);
4. Verificar o poder de predição das alterações nucleares avaliando sensibilidade e especificidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Seleção dos grupos

A casuística deste trabalho incluiu de 73 indivíduos. Trinta e cinco (35) eram tabagistas portadores de neoplasias malignas da cavidade bucal e três (03) não tabagistas atendidos no ambulatório de Oncologia da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza no período entre maio de 2004 e setembro de 2005. Como população controle, trinta e cinco (35) indivíduos não tabagistas clinicamente saudáveis. A tabela 1 distribui os grupos de acordo com o uso do tabaco.

Tabela 1 – Número e percentual de indivíduos grupo controle (sadios) e com câncer de boca, segundo o uso do tabaco.

GRUPO	Uso do tabaco	Nº de indivíduos	Percentual
Controle	Não	35	100,0
Pacientes com câncer de boca	Não	3	7,9
	Sim	35	92,1
	Total	38	100,0

Os dados clínico-epidemiológicos foram coletados em entrevista semi-estruturada e acompanhados de exame bucal cujo cadastro encontra-se no anexo V.

Foram considerados tabagistas os indivíduos que faziam ou fizeram uso de quaisquer das formas do tabaco por dez anos, independente do fato de ter ou não abandonado o hábito. Foram considerados etilistas os indivíduos que consumiam de 350 a 700 mL de bebida alcoólica destilada no mínimo duas vezes por semana. Foram definidos como indivíduos que bebiam socialmente os que consumiam menos de duas vezes por semana essa mesma quantidade de quaisquer tipos de bebida.

Os dados referentes à localização e estadiamento das lesões foram obtidos através do laudo histopatológico contido no prontuário. A classificação utilizada foi de acordo com os parâmetros estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (NEVILLE *et al.*, 1998) (anexo V).

Todas as informações contidas no cadastro foram tabuladas no banco de dados do software *Microsoft Office Excel 2003*.

Critérios de exclusão

Não participaram deste trabalho os pacientes que se encontravam realizando tratamento quimioterápico ou radioterápico. Foram excluídos da análise estatística os três (03) pacientes não tabagistas portadores de neoplasia maligna da cavidade bucal.

3.2 Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE), vinculado ao CONEP, sob o número 06/02 de 28 de fevereiro de 2002 (anexo VII). Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa foram informados e esclarecidos sobre os objetivos do trabalho quando receberam e assinaram o Termo de Consentimento (anexo VI).

3.3 Coleta das células e confecção dos esfregaços

Nos pacientes com câncer de boca foram realizadas coletas de duas regiões distintas da mucosa bucal: região periférica ao tumor (L), já que o centro do tumor contém grande quantidade de células necróticas, e mucosa jugal clinicamente saudável oposta ao tumor (LOL). Nos indivíduos sadios (controles) a coleta foi feita apenas da região de mucosa jugal próxima ao ducto de Stenon por haver maior lubrificação.

O material foi colhido com escova citológica de cerdas macias das regiões acima descritas, feito o esfregaço em lâminas de vidro previamente limpas e acondicionadas em borréis de plástico contendo a solução fixadora de metanol/ácido acético (3:1) durante 15 (quinze) minutos. Depois de fixadas todas as lâminas contendo o esfregaço foram transportadas ao Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) onde foi realizada a coloração após um período mínimo de 24 horas.

3.4 Coloração e montagem das lâminas

As lâminas foram coradas pela técnica de Feulgen-Rossembeck e contra-coradas com *fast green* 1%. Os métodos de coloração e de confecção das soluções e corantes estão descritos nos anexos I a IV. Após a coloração as lâminas foram montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá.



FIGURA 7 – Confecção dos esfregaços e coloração das lâminas.

3.5 Avaliação Histopatológica

Com relação à classificação histopatológica, dos tumores malignos 97,3% (37) eram carcinomas espinocelulares e apenas um foi classificado como carcinoma adenóide cístico.

3.6 Análise citogenética

A análise foi realizada com microscopia óptica com iluminação simples utilizando as objetivas de 40X e a de imersão a óleo. Utilizou-se na contagem o protocolo sugerido por Tolbert *et al.* (1991) incluindo os vacúolos nucleares. Portanto, além dos micronúcleos foram computadas outras alterações nucleares como cariorréxis, cromatina condensada, cariólise, picnose, falso-micronúcleo, *broken-eggs*, células binucleadas e vacúolos nucleares.

Foram analisadas 3.000 células de cada região, computando um total de 333.000 células. A contagem foi feita por um único indivíduo e as alterações confirmadas por dois indivíduos. Foram incluídas na contagem as células cujos citoplasmas estavam intactos e sem sobreposições com outras células.

Foram considerados micronúcleos as estruturas arredondadas que apresentavam 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal, localizadas próximas ao núcleo principal e possuísem a mesma intensidade de coloração e mesmo plano focal deste.

3.7 Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados foram:

- Teste de Shapiro-Wilk para verificar se as variáveis tinham distribuição normal;
 - Correlação de Spearman para verificar a correlação entre os grupos;
 - Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon para verificar a existência de diferença entre grupos dependentes (comparação intra-individual dos pacientes com câncer bucal);
 - Teste das Somas dos Postos de Wilcoxon para verificar a existência de diferença entre grupos independentes (grupo controle e LOL);
 - Teste de Krustal-Wallis para comparar grupos independentes (grupo controle e L);
 - Teste Exato de Fisher para verificar associação entre variáveis;
 - Curvas 'ROC' para determinar pontos de corte e variáveis com poder de predição de doença;
 - Teste de McNemar para comparar sensibilidade e especificidade entre as variáveis.
- (AGRESTI, A.,1996; CAMPOS, H. 1983; SIEGEL, S.1975).

3.8 Programas computacionais

Microsoft Word 2003 (Microsoft®, EUA)

Microsoft Excel 2003 (Microsoft®, EUA)

R: A Language and Environment for Statistical Computing, versão 2.2.1 2005
(Copyright© Microsoft Corporation, EUA).

Corel Draw 11 (Corel®, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Clínico-Epidemiológica

Caracterização dos grupos

Grupo controle

Constatou-se que a procedência dos indivíduos deste grupo era na sua totalidade do município de Fortaleza.

Em relação à atividade profissional verificou-se que 34,2% (12) possuíam nível superior completo, 17,1% (6) exerciam atividade doméstica, 8,5% (3) eram faxineiro, 22,8% (8) eram técnico com nível médio, 11,4% (4) eram estudante, 5,7% (2) eram aposentado e 2,8% (1) era comerciante (anexo XI).

Quanto à distribuição por sexo e idade, mais da metade dos indivíduos era do sexo feminino, e embora a faixa etária tenha variado dos 21 aos 87 anos (média de 42 anos), a maioria tinha idade inferior aos 50 anos (figura 8 e 9).

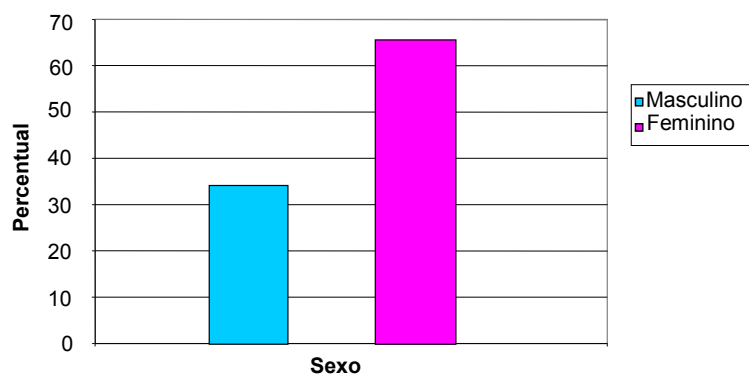


FIGURA 8 – Percentual de indivíduos do grupo controle, distribuídos quanto ao sexo (n=35) (p=0,03).

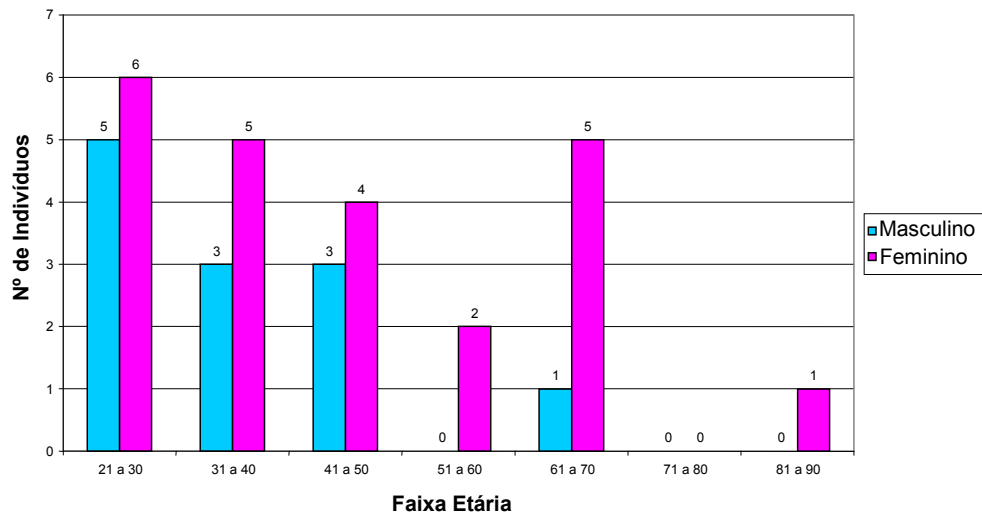


FIGURA 9 – Número de indivíduos do grupo controle, distribuídos segundo o sexo e a faixa etária agrupados por década (n=35).

Nos indivíduos do grupo controle apenas em um foi diagnosticado pequena lesão tipo erosão na mucosa jugal pelo hábito de mordiscar.

Pacientes com câncer bucal.

Quanto à procedência, a maioria dos pacientes deste grupo procedia de municípios do interior do Estado, destacando-se o município de Quixeramobim com 7.9% dos casos (figura 10).

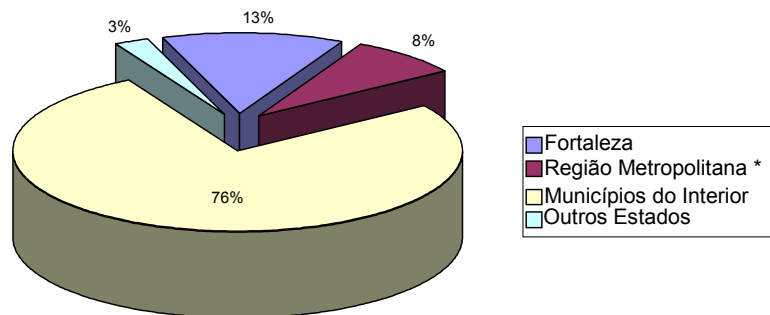


FIGURA 10 – Percentual de casos de câncer de boca, distribuídos segundo a procedência (n=38).

* Regiões definidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A respeito da atividade profissional dos pacientes com câncer, verificou-se que eram constituídos predominantemente por agricultores (25,94%), seguidos de indivíduos que não exerciam nenhuma atividade ocupacional (18,4%) e a mesma quantidade para aposentados (7,8%) e domésticas (7,8%). Apenas um único indivíduo possuía nível superior completo (anexo XI).

Quanto à distribuição por sexo e idade, 63% (24) eram do sexo masculino e 37% (14) do sexo feminino como mostra a figura 14. A idade variou entre 34 e 87 anos (média de 61,6 anos). Para o sexo masculino a idade mais atingida foi acima dos 51 anos e para o sexo feminino acima dos 70 anos (figuras 11 e 12).

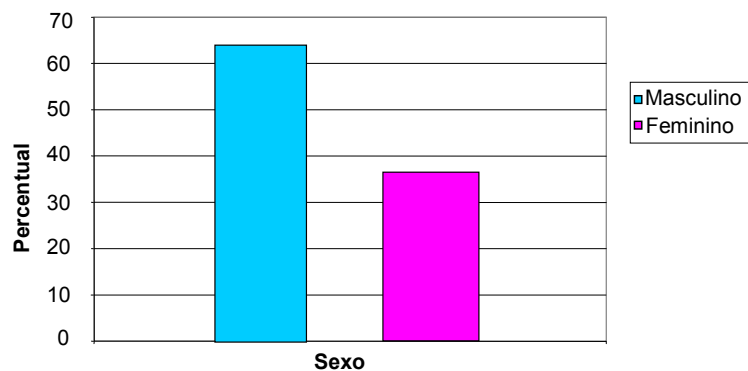


FIGURA 11 – Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto ao sexo (n=38) (p=0,01).

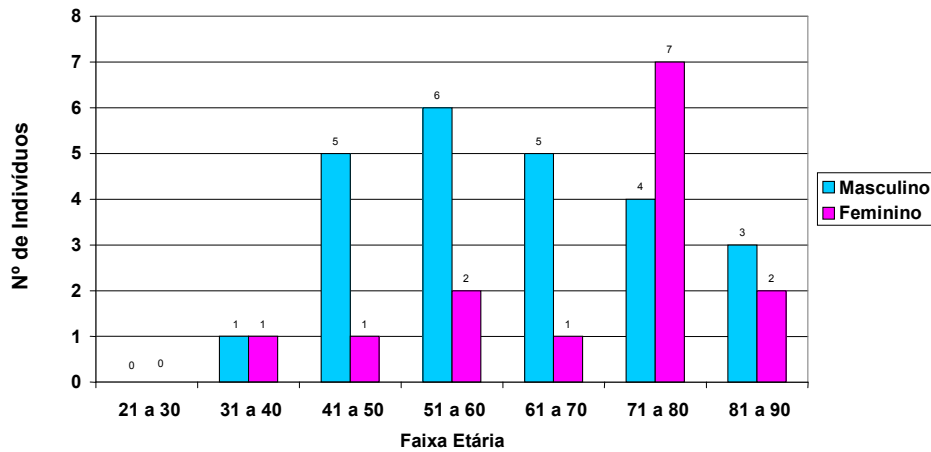


FIGURA 12 – Percentual dos casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos segundo o sexo e faixa etária agrupados por década (n=38).

4.2 Fatores de risco

Apesar de diversos fatores de risco terem sido obtidos através da entrevista, não foi possível analisá-los devido à baixa ocorrência dos mesmos. Dessa forma, segue a análise descritiva dos mais relevantes.

4.2.1 Consumo do tabaco

Grupo controle

Todos os indivíduos do grupo controle eram não tabagistas como pode ser visto na figura13.

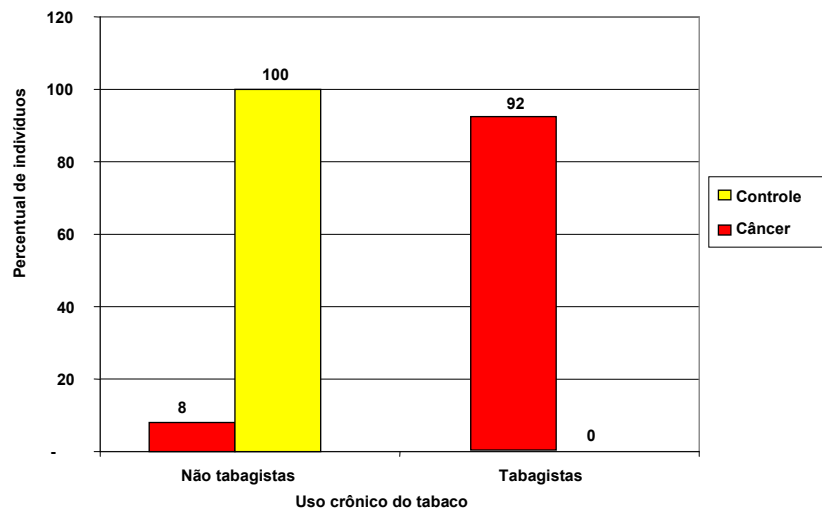


FIGURA 13 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à presença do fator de risco tabagismo (n=73).

Grupo dos pacientes com câncer bucal

Dos pacientes com câncer de boca, 35 faziam uso do tabaco há pelo menos 10 anos e três deles nunca haviam consumido. Dentre os tabagistas, doze deles mesmo tendo parado há menos de dois anos foram considerados tabagistas pelo critério pré-estabelecido, onde se considerou tabagista os que mantiveram o hábito durante 10 anos. Mais da metade dos casos (21 pacientes) utilizou o tabaco durante 21 a 40 anos (figura 14). Quanto às formas de utilização, a maioria utilizava apenas 1 tipo estando assim distribuídos (figura 15):

- Usavam um único tipo: vinte e oito pacientes (14 usavam cigarro com filtro, sete usavam cigarro de palha e 7 usavam o cachimbo);
- Usavam dois tipos: três pacientes (dois usavam cigarro com filtro e de palha e 1 usava cigarro de palha e cachimbo);
- Usavam três tipos: dois pacientes (um usava cigarro com filtro, cigarro de palha e tabaco mascado e o outro cigarro de palha, cachimbo e tabaco mascado);
- Usavam quatro tipos: um paciente (cigarro com filtro, sem filtro, charuto e tabaco mascado);
- Usavam cinco tipos: um paciente (cigarro com filtro, sem filtro, de palha, charuto e tabaco mascado).

A figura 16 mostra que neste grupo, 27 pacientes usavam meia a uma carteira de cigarros (10 a 20 cigarros), sete pacientes consumiam uma a duas carteiras e apenas um consumia acima de 40 cigarros por dia.

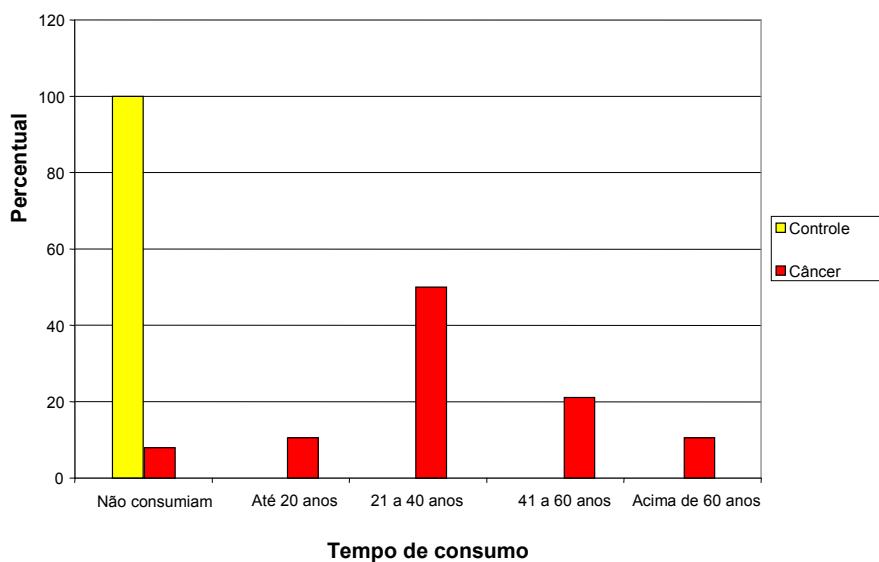


FIGURA 14 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto ao tempo de uso do tabaco (tempo em anos).

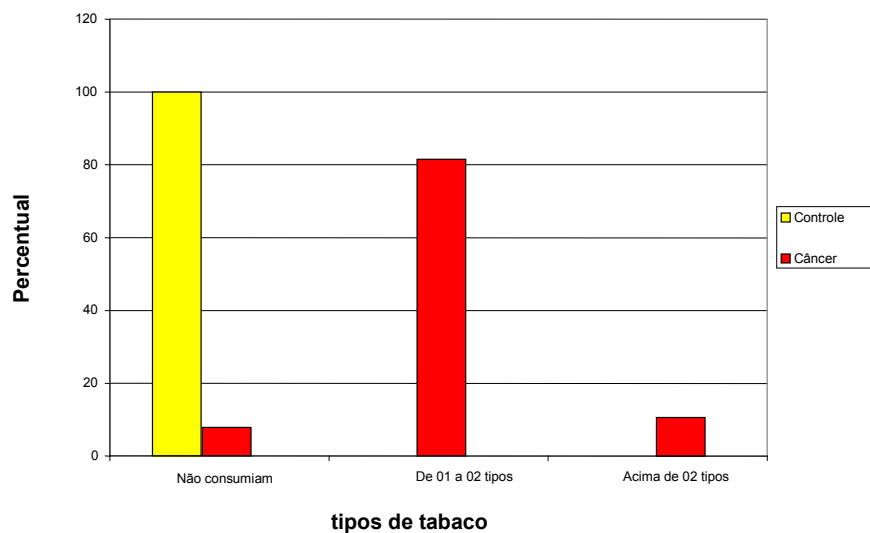


FIGURA 15 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à forma de utilização do tabaco.

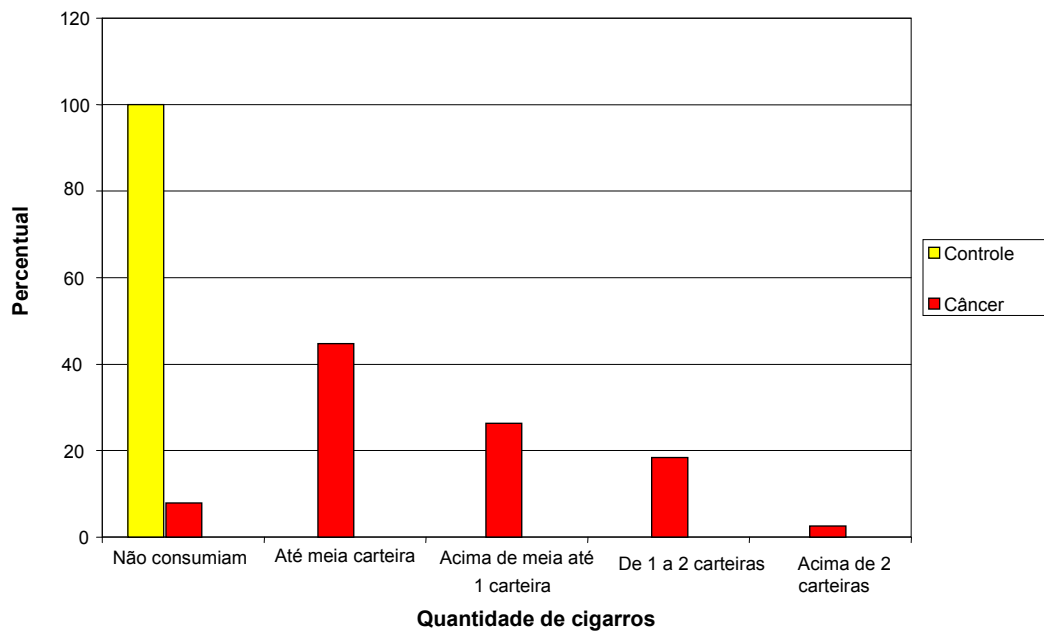


FIGURA 16 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à quantidade de carteiras de cigarros consumida por dia (uma carteira=20 cigarros).

4.2.2 Consumo de bebidas alcoólicas

Grupo controle

Dentre os indivíduos do grupo controle apenas três informaram beber socialmente (menos de duas vezes por semana) e por isso foram considerados não etilistas (figura 17).

Grupo dos pacientes com câncer bucal

Nos pacientes com câncer de boca, como pode ser visto nas figuras 17 e 18, 50% foram definidos com etilistas, pois todos faziam o uso de bebidas alcoólicas tipo destilada (cachaça) no mínimo há dez (10) anos. No entanto três deles informaram consumir tanto bebida destilada quanto fermentada. Todos estes pacientes eram do sexo masculino.

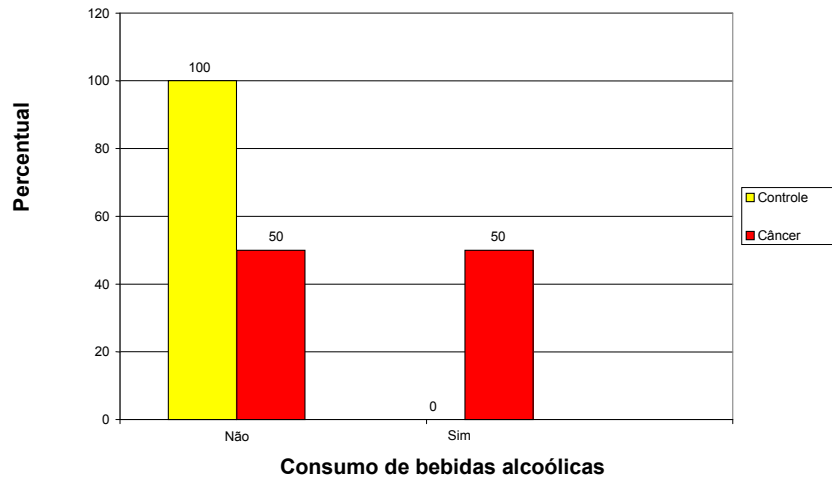


FIGURA 17 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto ao consumo de bebidas alcoólicas.

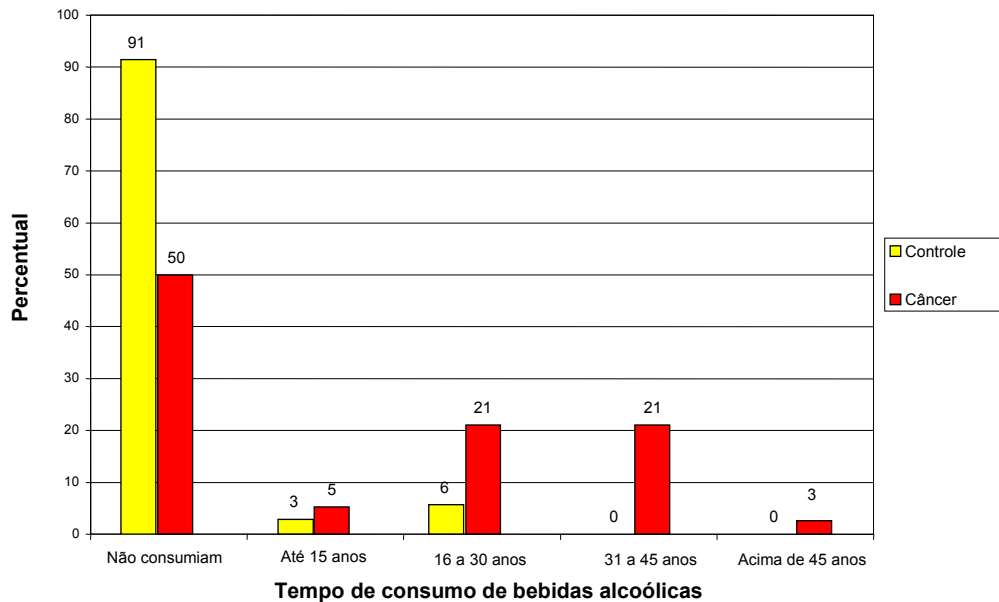


FIGURA 18 – Percentual de indivíduos dos grupos estudados, distribuídos quanto ao tempo de consumo de bebidas alcoólicas (tempo em anos). Todos os pacientes com câncer que consumiam bebidas alcoólicas eram também tabagistas.

4.2.3 Associação entre tabaco e álcool

Foi observado que metade dos casos dos pacientes com câncer bucal esta associação se fez presente (figura 19).

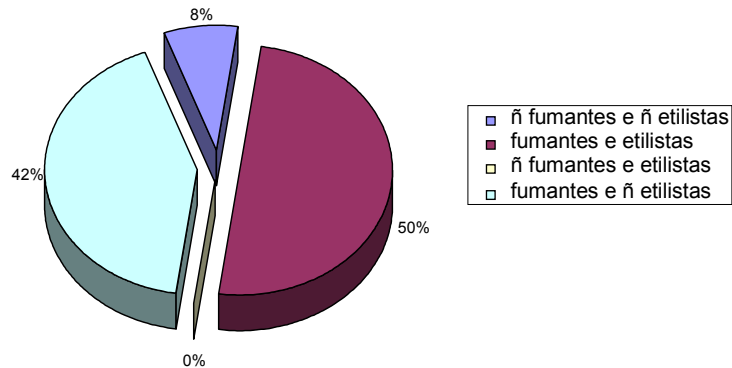


FIGURA 19 – Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto à presença dos fatores de risco (tabagismo e etilismo) (n=38).

4.2.4 Saúde bucal

Escovação dentária, cárie dentária, gengivite, doença periodontal e uso de próteses dentárias.

No grupo controle mais da metade dos indivíduos realizava acima de duas escovações semanais. Neste grupo dez indivíduos apresentaram gengivite, dentre os quais metade era portador de doença periodontal. Em relação à atividade de cárie, apenas em dois indivíduos foi diagnosticada a doença. Neste grupo apenas 20% era portador de prótese dentária (figuras 20, 21 e 22).

No grupo dos pacientes com câncer de boca, dezesseis pacientes relataram não realizar a prática de escovação dentária, dezessete realizavam de 1 a 15 escovações semanais e cinco realizavam entre 15 a 30 escovações semanais. Dos 16 pacientes desdentados dez relataram higienizar a cavidade bucal com dentífrico, anti-séptico bucal, casca de aroeira ou outras substâncias. Constatou-se, depois de realizado o exame clínico bucal, que 84,2% (32) apresentava gengivite e 36,8% (14) era portador de doença periodontal. Neste grupo 42% (16) apresentava também dentes cariados. Quanto à ausência dentária e o uso de próteses dentárias, dos 38 pacientes com carcinomas bucais 42,1% (16) eram desdentado, dentre estes 75% (9) portavam somente prótese total superior, 25% (3) eram portadores de prótese parcial em acrílico e 10,5% (4) não usavam nenhum tipo de prótese (anexo XI).

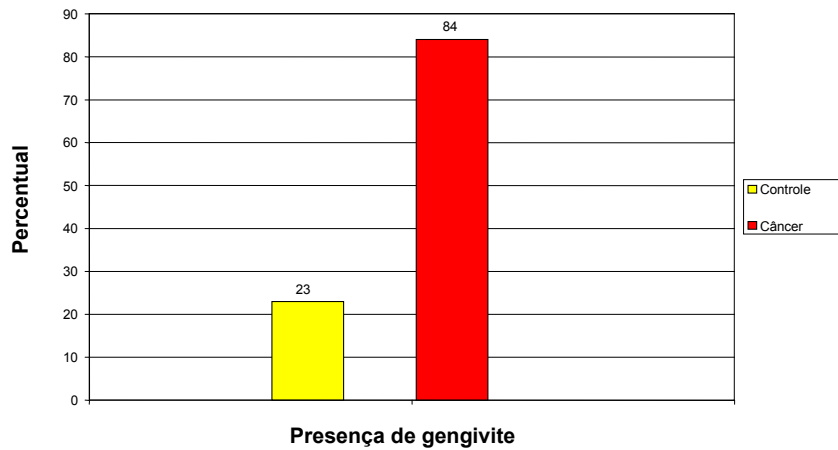


FIGURA 20 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de gengivite.

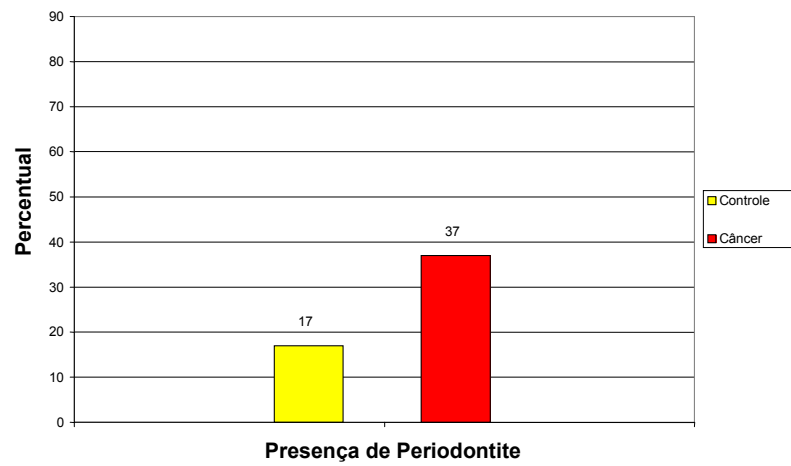


FIGURA 21 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de Doença Periodontal.

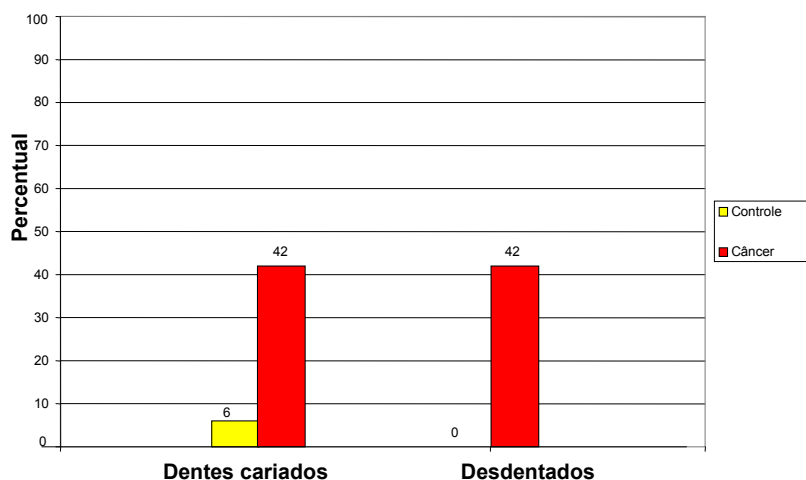


FIGURA 22 – Percentual de indivíduos nos grupos estudados, distribuídos quanto à ocorrência de cárie dentária.

4.3 Sítio anatômico das lesões

Nos pacientes com câncer bucal a língua foi o sítio de maior freqüência, com 10 casos, seguidos pelo assoalho bucal, palato duro, rebordo alveolar, região retromolar e lábio inferior, como pode ser visto na figura 23.

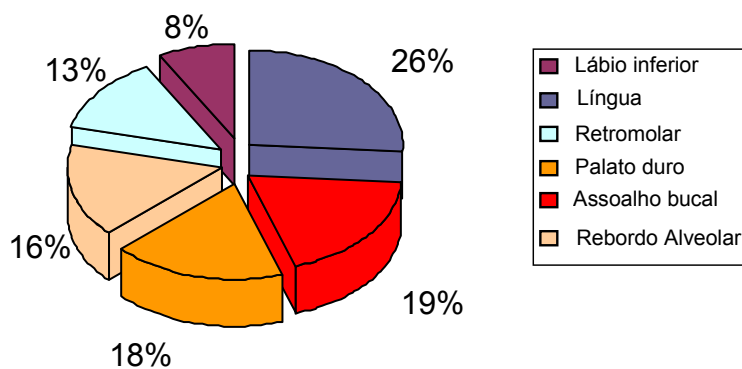


FIGURA 23 – Percentual de casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos quanto à localização anatômica (n=38).

Quando verificada a relação entre o sítio anatômico e os fatores de risco tabagismo e alcoolismo, observou-se que os pacientes que apresentavam tumores se estendendo por duas regiões da boca associavam os dois fatores de risco tabagismo e etilismo (figura 24).

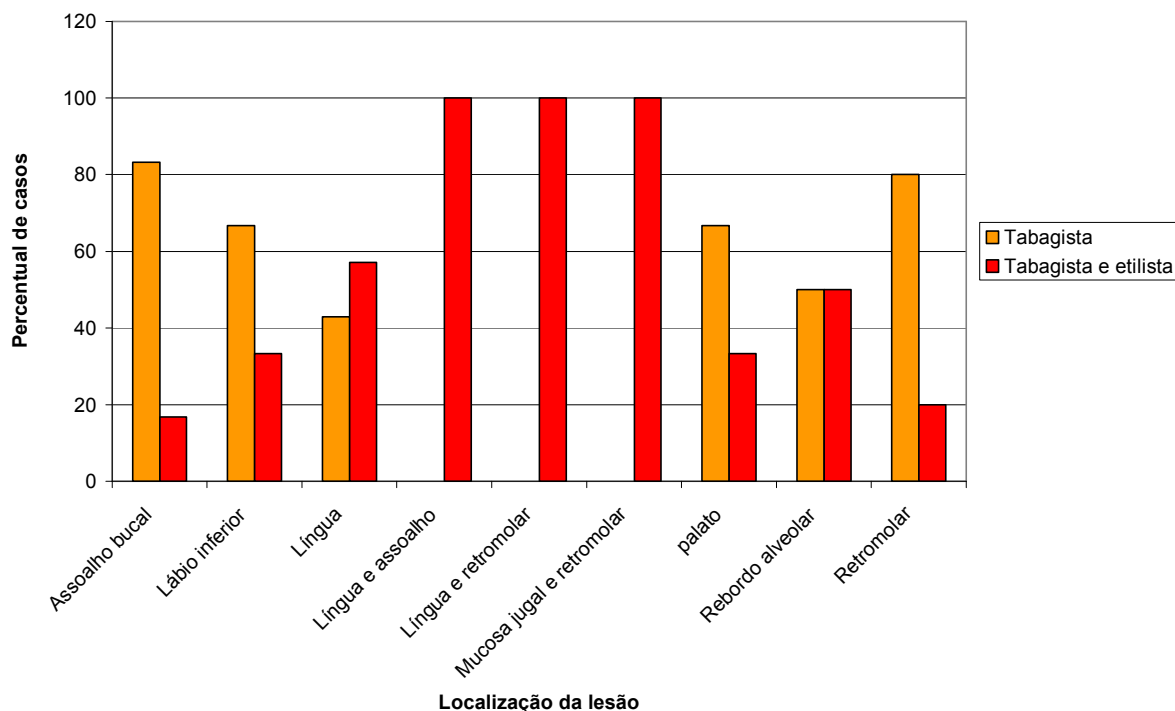


FIGURA 24 – Percentual de casos de carcinomas estudados, distribuídos quanto à localização anatômica do tumor e quanto à presença dos fatores de risco: tabagismo e etilismo (n=38).

4.4 Análise Histopatológica

Nos cânceres bucais, excetuando um, todas foram diagnosticados como carcinoma espinocelular.

Tabela 2 – Número e percentual de indivíduos dos grupos controle e casos de carcinomas bucais, segundo os tipos de lesões diagnosticadas.

GRUPO	Tipo de lesão	Nº de indivíduos	Percentual
Controle	Sem lesão	34	97,1
	Erosão de mucosa jugal	1	2,9
	Total	35	100,0
Pacientes com câncer bucal	Carcinoma Adenóide Cístico	1	2,6
	Carcinoma Espinocelular – CEC	37	97,4
	Total	38	100,0

A tabela 3 relaciona os dados referentes à profundidade de invasão, acometimento de linfonodos cervicais e metástases dos tumores estudados. Observa-se que quase na metade dos casos (42,1%) a neoplasia invade estruturas adjacentes. A figura 25 mostra que os tumores mais invasivos T3 e T4 localizaram-se preferencialmente na língua e palato duro, respectivamente. Dos pacientes tabagistas dois eram portadores de tumores que recidivaram, onde um foi classificado como T3N0M0 e o outro como T4N0N0. Um único paciente era portador de segundo tumor primário T3N0M0. Nos casos dos pacientes não tabagistas todos os três tumores eram T2N0M0. Não houve nenhum caso de metástase à distância.

Tabela 3 – Casos de carcinomas bucais estudados, distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos cervicais (pN) e presença de metástases à distância (pM) (n=38).

INVASÃO (pT)			LINFONODOS (pN)			METÁSTASES (pM)	
Nº de casos	%		Nº de casos	%		Nº de casos	%
T1	5	13,2	N0	20	52,6	MO	0
T2	8	21,0	N1	10	26,3	M1	0
T3	9	23,7	N2	2	5,3		
T4	16	42,1	N3	6	15,8		
Total	38	100,0	Total	38	100,0	Total	0

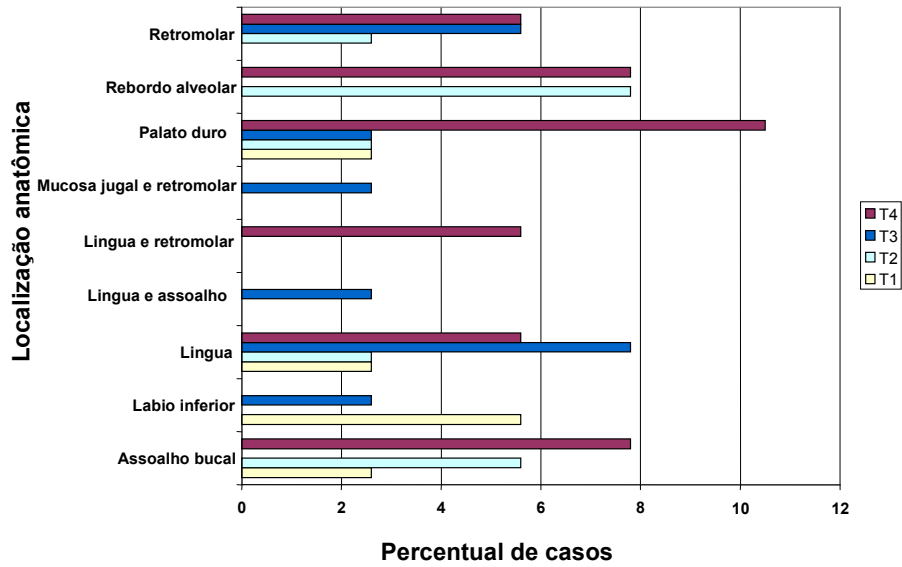


FIGURA 25 – Profundidade de invasão tumoral (pT) dos carcinomas estudados, distribuídos quanto a localização anatômica (n=38).

Quanto ao estadiamento tumoral, a amostra era constituída na sua maioria por tumores estágio IV localizados na língua e região retromolar (figuras 26 e 27).

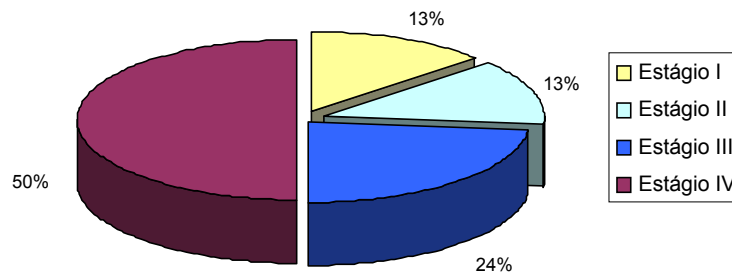


FIGURA 26 – Estadiamento tumoral no grupo dos pacientes com câncer.

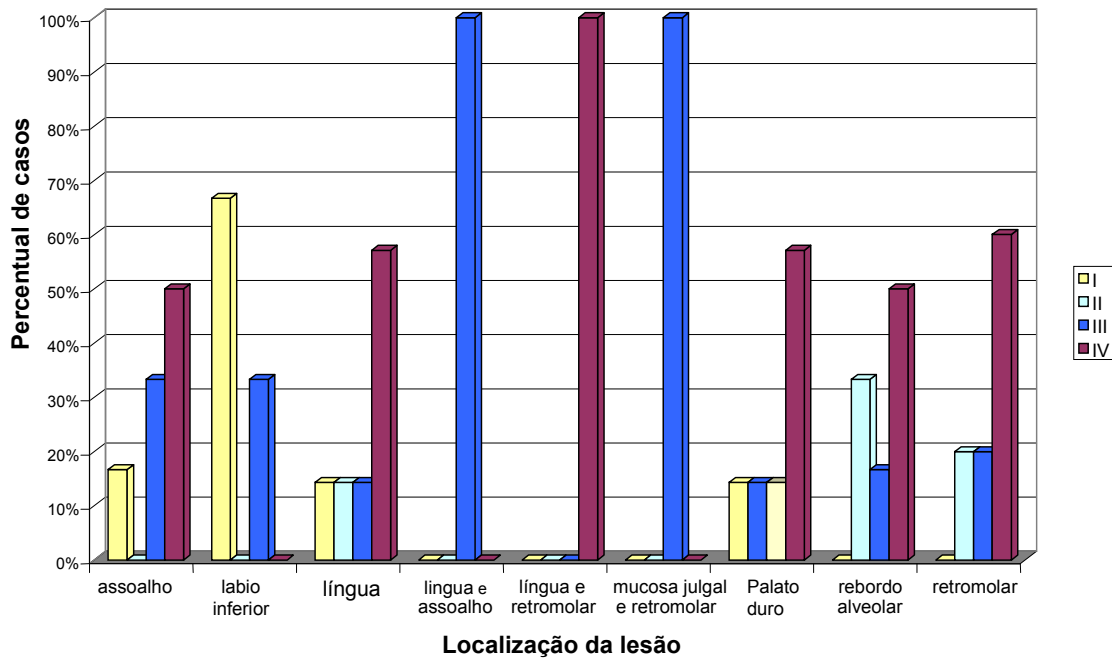


Figura 27 – Percentual de casos de cânceres de boca, agrupados por região, de acordo com o estadiamento (n=38).

4.5 Análise das alterações nucleares

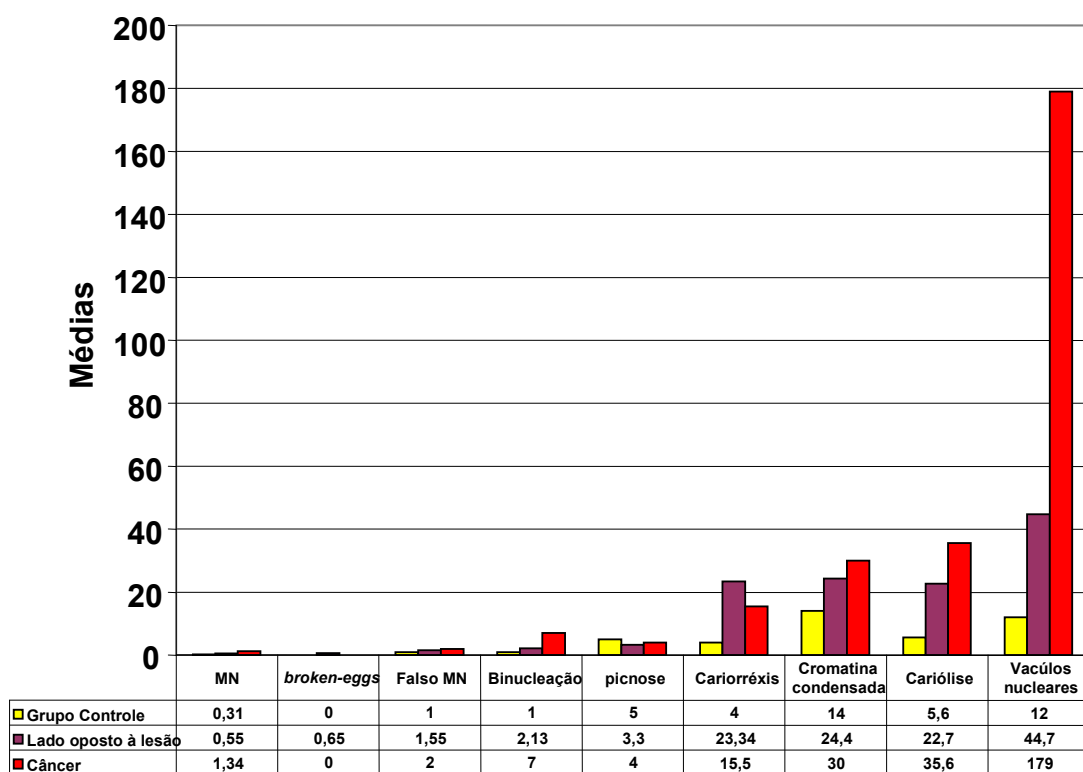
Foram excluídos da análise estatística os casos de câncer de boca não tabagistas devido a sua reduzida quantidade. Em todos os testes utilizados o nível de significância foi de 5%.

A tabela 4 mostra a análise descritiva: valores, médias e o desvio padrão dos micronúcleos e das demais alterações nucleares estudadas por grupo.

Tabela 4 – Estatísticas descritivas das variáveis por grupo.

Variáveis	Grupos	Num	Min	Max	Média	Desv. Pad
Binucleadas	Controle	35	0	6	1,343	1,349
	LOL	35	0	9	2,171	2,584
	Lesão	35	0	35	6,765	7,628
<i>Broken eggs</i>	Controle	35	0	3	0,429	0,884
	LOL	35	0	18	0,686	3,056
	Lesão	35	0	6	0,485	1,121
Cariólise	Controle	35	0	18	5,6	4,23
	LOL	35	0	245	24,257	43,599
	Lesão	35	0	426	36,543	74,575
Cariorréxis	Controle	35	0	47	4	9,026
	LOL	35	0	66	10,657	15,156
	Lesão	35	0	65	15,771	15,594
Crom. Condens	Controle	35	0	65	13,886	14,55
	LOL	35	0	251	25,029	44,315
	Lesão	35	0	206	27,143	44,586
Falso MN	Controle	35	0	4	0,771	1,031
	LOL	35	0	11	1,514	2,369
	Lesão	35	0	14	1,794	2,962
MN	Controle	35	0	5	0,314	0,932
	LOL	35	0	4	0,486	0,951
	Lesão	35	0	11	1,364	2,089
Picnose	Controle	35	0	20	4,6	5,031
	LOL	35	0	17	3,571	4,104
	Lesão	35	0	24	4,324	4,797
Vacúolos	Controle	35	0	92	11,857	21,106
	LOL	35	0	374	48,571	80,06
	Lesão	35	0	1449	195,03	292,302

Segue o gráfico das médias das alterações nucleares distribuídas por grupo (figura 28).



MN e alterações nucleares

Figura 28 – Média dos MNs e das alterações nucleares distribuída nos grupos estudados.

4.5.1 Comparação intra-individual: lesão e lado oposto à lesão

A comparação entre as médias do lado oposto à lesão (LOL) e da lesão (L) nos pacientes com câncer bucal caracterizou-se como um auto-emparelhamento por se tratar de uma comparação intra-individual.

Como pode ser visto pela análise do quadro 2 o LOL diferiu da lesão nas alterações cariorréxis, MN, binucleadas e vacúolos nucleares, com destaque para os vacúolos ($p < 0,001$).

Quadro 2. Comparação entre lesão (L) e lado oposto à lesão (LOL) nos pacientes com câncer bucal.

Variáveis	Nível Descritivo
Cariorréxis	0,017
MN	0,044
Binucleadas	0,001
Vacúolos	< 0,001

Teste da soma dos postos sinalizados de Wilcoxon.

4.5.2 Comparação interindividual:

a. Controle e lado oposto à lesão

O quadro 3 evidencia que nestes grupos somente as variáveis cariorréxis e cariólise diferiram estatisticamente.

Quadro 3. Comparação entre os grupos controle (C) e lado oposto à lesão (LOL).

Variáveis	Nível Descritivo
Cariorréxis	0,003
Cariólise	0,003

Teste da soma dos postos de Wilcoxon.

b. Controle e lesão

Observou-se que as variáveis cariorréxis, cariólise, MN, binucleadas e vacúolos diferiram significativamente entre os grupos (quadro 4).

Quadro 4. Comparação entre os grupos controle (C) e lesão (L).

Variáveis	Nível Descritivo
Cariorréxis	<0,001
Cariólise	<0,001
MN	<0,001
Binucleadas	<0,001
Vacúolos	<0,001

Teste de Krustal-Wallis.

A tabela 5 resume as alterações nucleares estatisticamente significativas nas comparações entre os grupos.

Tabela 5 – Resumo das alterações nucleares significativas nos grupos estudados. CR=cariorréxis, CL=cariólise, MN=micronúcleo, BN=binucleação, VN=vacúolos nucleares, C=controle/sadios, LOL=mucosa do lado oposto à lesão, L=lesão/câncer.

Alterações Nucleares/Grupos	C X LOL	C X L	LOL X L
CR	X	X	X
CL	X	X	
MN		X	X
BN		X	X
VN		X	X

4.5.3 Valores preditivos das alterações nucleares

Seguem na tabela 6 os resultados obtidos para as variáveis significativas como preditoras de lesão bucal, os percentuais referentes aos valores de predição do teste (chance de se acertar o diagnóstico de lesão maligna bucal), aos valores de predição positiva (chance do indivíduo ter de fato lesão maligna quando o teste for positivo) e aos valores de predição negativa (chance de quando no teste o resultado for negativo o indivíduo não ter lesão maligna bucal).

Tabela 6 – Resultados das alterações nucleares preditoras de lesão bucal, valores de predição dos testes e valores de predição positiva e negativa.

Alterações nucleares	Implicações	Valor de predição do teste	Valores de predição positiva	Valores de predição negativa
Cariorréxis ≥ 4	Teste positivo	80%	17,39%	98,7%
Cariólise ≥ 11	Teste positivo	90%	27,85%	97,91%
MN ≥ 2	Teste positivo	93,57%	32,80%	96,21%
Binucleadas ≥ 7	Teste positivo	96,62	100%	96,56%
Vacúolos: ≥ 77	Teste positivo	95,01	50,12%	96,60%

4.5.4 Associação entre alterações nucleares preditoras de lesão maligna e fatores de risco.

O resultado das associações entre as variáveis significativas (cariorréxis, cariólise, MN, binucleadas e vacúolos) e fatores de risco nos grupos controle e pacientes com câncer obtidas pelo teste exato de Fisher estão descritas na tabela 7.

Tabela 7– Associação entre as variáveis significativas preditoras de lesão e fatores de risco nos indivíduos sadios e com câncer de boca (n=70).

Cariorréxis	Gengivite	p=0,002
	Cárie dentária	p=0,017
	Consumo do tabaco	p<0,001
	Consumo de bebidas alcoólicas	p=0,07
Cariólise	Gengivite	p=0,012
	Cárie dentária	p=0,046
	Consumo do tabaco	p<0,001
	Consumo de bebidas alcoólicas	p=0,034
MN	Cárie dentária	p=0,022
	Consumo do tabaco	p=0,045
	Consumo de bebidas alcoólicas	p=0,088
	Consumo de alimentos quentes	p=0,004
	Exposição ao sol	p=0,006
Binucleadas	Cárie dentária	p=0,008
	Consumo do tabaco	p<0,001
	Consumo de bebidas alcoólicas	p=0,088
	Exposição ao sol	p=0,005
	Exposição aos inseticidas	p=0,002
Vacúolos	Gengivite	p=0,003
	Consumo do tabaco	p<0,001
	Consumo de bebidas alcoólicas	p=0,021

A tabela 7 mostra que o consumo do tabaco e de bebidas alcoólicas possui associação com todas as alterações nucleares. No entanto a associação mais fraca foi entre MN e tabagismo (p=0,045). Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas a associação mais forte foi para os vacúolos nucleares (p=0,021) encontrando-se para as variáveis binucleadas e MN uma significância marginal (p=0,088).

Em relação à saúde bucal, para cárie dentária e gengivite a associação mais forte foi com binucleação ($p=0,008$) e cariorréxis ($p<0,002$), respectivamente. Confirmando que cariorréxis seja um forte indicativo de citotoxicidade já que a gengivite tem como etiologia o acúmulo de microorganismos (biofilme) desencadeando mediadores inflamatórios.

5. DISCUSSÃO

A importância do estudo do câncer de boca vem do fato dele ser no Brasil um problema de saúde pública devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo responsável por 6% do total das mortes por cânceres (FONTES *et al.*, 2004).

Com relação à etiologia do câncer de boca as agressões locais desencadeadas por fatores exógenos tais como consumo crônico do tabaco e do álcool é considerado de suma importância. Estes hábitos são comuns nas populações justificando o aumento na incidência deste tipo de neoplasia e a implantação e validação de testes que possam monitorar o seu aparecimento. Na atualidade os pesquisadores empenham-se em determinar biomarcadores que permitam avaliar quais indivíduos expostos a esses fatores de risco, seriam mais ou menos propensos a desenvolver neoplasia oral (SARTO *et al.*, 1987; STICH *et al.*, 1982; STICH; ROSIN, 1983; TOLBERT *et al.*, 1991; CASARTELLI *et al.*, 2000; RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

Vários testes como o de aberrações cromossômicas, teste do Cometa e tipagens de genótipos têm sido utilizados no estudo das populações sob risco de desenvolvimento de câncer, no entanto são dispendiosos e de técnicas mais dificultosas quando comparado ao teste do Micronúcleo. Este é de simples execução, utiliza técnica não invasiva e de baixo custo, tornando-o apropriado para o diagnóstico precoce de lesões malignas da cavidade bucal. Este ensaio pode ser utilizado quando se deseja informações a respeito do risco aumentado de indivíduos expostos e utiliza os micronúcleos que possuem comprovada eficácia como biomarcador para avaliação de injúrias genéticas detectando danos precocemente (WÜNSCH-FILHO; GATTÁS, 2001).

Associando a problemática de um rastreamento para detecção do câncer de boca e a comprovada eficácia do teste do Micronúcleo este estudo foi realizado visando o estabelecimento de um teste de triagem para monitorar pacientes fumantes crônicos sob risco de desenvolver carcinoma bucal. Foram incluídos nas análises além das alterações nucleares categorizadas por Tolbert *et al.* (1991) os vacúolos nucleares por serem freqüentemente observados no material estudado.

Com o intuito de se obter um teste com maior sensibilidade diagnóstica foram analisadas 3.000 células de cada região, totalizando 333.000, pois segundo Freitas *et al.*

(2003) quanto maior a quantidade de células analisadas maior a sensibilidade obtida na citologia esfoliativa quando se deseja diagnosticar precocemente o câncer.

5.1. Análise clínico-epidemiológica

No presente estudo, em relação à procedência dos indivíduos, a maioria dos casos de CA de boca (76%) residiam do Interior do Estado o que denota a importância dos serviços da Santa Casa de Misericórdia como centro de referência tanto para a capital quanto para o interior. Estes pacientes chegavam para realizar o tratamento já em estágios avançados da doença, evidenciando a necessidade da implantação de programas de rastreamento precoce nos espaços sociais de risco bem como a realização de atividades de capacitação para os profissionais de saúde com a finalidade de identificar, encaminhar e cadastrar as lesões suspeitas para os Centros de Referência.

No que se refere à atividade profissional, o fato dos casos de câncer de boca possuir apenas um único indivíduo com nível superior completo, caracteriza o atendimento do SUS às baixas classes sociais e reforça a sugestão de Wunsch-Filho (2002) de que nos países em desenvolvimento, como o Brasil, os indivíduos de baixa renda serem mais acometidos por este tipo de neoplasia maligna.

Quanto ao sexo dos indivíduos, nos pacientes com câncer mais de 60% eram homens com idade acima dos 40 anos. O fato destas lesões serem detectadas em faixas etárias mais precoces nos homens se equipara ao estudo de Johnson (2001) o qual afirma que 98% dos tumores malignos da boca afetam indivíduos do sexo masculino e acima dos 40 anos. A maior frequência dos tumores nas mulheres em idades mais avançadas é justificado por Llewellyn *et al.* (2004) e Dedivitis *et al.* (2004) que atribuem o fato a menor exposição aos fatores de risco entre as mulheres.

Considerando a amostra total, a proporção entre os sexos foi de 2:1 igualando estes achados tanto às previsões do INCA para o estado do Ceará quanto às encontradas nos países desenvolvidos como os Estados Unidos da América e corrobora o fato deste ser o sétimo tipo de câncer mais prevalente entre os homens e o oitavo entre as mulheres (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

5.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco envolvidos na gênese do câncer de boca, tabagismo e etilismo, já foram bem estabelecidos em vários estudos (GUERRA *et al.*, 2005; DEDIVITIS *et al.*, 2004, RUIZ *et al.*, 2004; SHAM *et al.*, 2003, MASHERBERG *et al.*, 1993).

Na amostra estudada, excetuando três pacientes, todos os pacientes portadores de CA de boca eram tabagistas. No entanto não houve associação estatisticamente significativa entre os tipos de tabaco utilizados, a quantidade consumida e o tempo de consumo, diferente do estudo de Franco *et al.* (1989) e Kaugars *et al.* (1992) onde constataram existir uma inter-relação entre quantidade e tempo de consumo do tabaco e risco aumentado para lesões bucais.

Não foi possível avaliar o consumo de bebidas alcoólicas como fator de risco independente, pois na amostra estudada todos os pacientes portadores de câncer que consumiam o álcool cronicamente eram também consumidores do tabaco.

Quanto à associação dos fatores de risco tabagismo e etilismo, embora o uso do tabaco tenha demonstrado maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca que o uso crônico do álcool, o tempo de consumo das bebidas alcoólicas pareceu influenciar o aparecimento das lesões malignas bucais, visto que os pacientes que associaram estes dois fatores (figura 18) apresentaram lesões ao longo do tempo. Dessa maneira o uso abusivo do álcool parece ter efeito sinérgico quando associado ao consumo do tabaco. Estudos como os de Stich (1987) e Ghose e Parida (1995) evidenciaram este sinergismo quando avaliaram a freqüência dos MNs e constataram que estava aumentando nos usuários que consumiam simultaneamente tabaco e álcool.

5.3 Saúde bucal

A má higiene bucal, devido à baixa freqüência de escovações dentárias, ocasionando gengivite e periodontite foi verificada neste estudo tanto nos pacientes com CA de boca. Esta associação também foi constatada por Moreno-López *et al.* (2000) e Franco *et al.* (1989) que observaram a baixa freqüência de escovação entre pacientes acometidos por neoplasias bucais.

Outro fator de risco comumente citado na literatura seria o uso de próteses dentárias mal adaptadas que causam ulcerações crônicas da mucosa bucal (JONHSON, 2001). Nos pacientes portadores de câncer apenas 31,6% faziam uso de próteses. Sabe-se que as mesmas sendo confeccionadas por pessoas incapacitadas e não por cirurgiões-dentistas torna factível de se considerar esses agravos como co-fatores na etiologia do CA de boca, no entanto faltam estudos com maiores evidências na literatura.

5.4 Sítio anatômico das lesões

Quanto à distribuição anatômica nos pacientes com CA de boca, embora a amostra tenha sido constituída na sua maioria por agricultores e o sítio esperado fosse o lábio, a localização anatômica neste estudo mostrou-se mais freqüente na língua (26%) seguido pelo assoalho bucal (19%). Essa divergência poderia ser explicada pela maioria da população cearense ser constituída de indivíduos de cor parda, tendo como protetor natural a melanina. A língua como sítio mais freqüente está de acordo com o estudo de Lucena (2002) sobre a prevalência do câncer de boca realizado em uma instituição de referência em câncer no Ceará que encontrou freqüência de 25,7%. Segundo o *National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology* (2006) 30% das neoplasias bucais se originam na língua e 14% no assoalho bucal. Na Itália, o estudo de Nicotera *et al.* (2003) acharam incidência de 88% na língua e 13,5% no assoalho, no Brasil, os pesquisadores Leite e Koifman (1998) encontraram incidência de 40% na língua.

Foi também observado que houve grande variação quanto à localização anatômica dos tumores. Como 50% da amostra eram consumidores crônicos do álcool, principalmente cachaça, estes achados vêm reforçar os de Franco *et al.* (1989) quando explicam que essa variação se deve ao consumo da cachaça.

5.5 Análise histopatológica

A freqüência dos casos de carcinomas demonstrou similaridade com a descrita na literatura, acima de 90% (COSTA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2002). No entanto, durante a coleta outros tipos de neoplasias bucais foram diagnosticados, tais como sarcomas e melanomas.

Em relação ao estadiamento tumoral, 42% dos carcinomas bucais estudados acometeram estruturas adjacentes (pT4) denotando o padrão invasivo destes tumores e sua malignidade. Muitos destes pacientes relataram durante a entrevista que quando notaram a lesão usaram primeiramente remédios caseiros, depois procuraram o dentista e estes prescreveram medicamentos mais de uma vez antes do encaminhamento. Esse fato evidencia o atraso no diagnóstico precoce do CA de boca pelos dentistas e a falta de conhecimento dos pacientes sobre esta doença o que também é discutido no estudo realizado por Costa e Migliorati (2001).

A malignidade dessas neoplasias é também notória quando se observa que 47,4% tinha comprometimento dos linfonodos cervicais e 50% dos casos era estágio IV. Relato similar é encontrado no estudo de Amar *et al.* (2003) onde 49% da amostra estudada era também estágio IV. Como em outros cânceres estes são de difícil tratamento os quais deverão incluir além das cirurgias sessões de radioterapia e, em alguns casos, a quimioterapia (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

O estudo da correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica de 120 carcinomas epidermóides realizado por Costa *et al.* (2002) na cidade de Natal evidenciou como neste estudo que os tumores de lábio eram os menores (T1) enquanto os que acometeram a língua eram os maiores (T3 e T4) implicando em um pior prognóstico. Os tumores de maior tamanho acarretam seqüelas cirúrgicas para o paciente como desfigurações em partes expostas da face com comprometimento do sistema estomatognato, afastando-o do convívio social e gerando também problemas familiares. Deve ser ressaltado o elevado custo destas cirurgias para o SUS em virtude também do maior tempo de internação hospitalar. Essa problemática vem reforçar a necessidade de marcadores no biomonitoramento de indivíduos expostos, que tenham poderes preditivos para lesão maligna bucal e que possam ser utilizados rotineiramente no ambulatório.

5.6 Análise das alterações nucleares

Os micronúcleos têm sido usados no monitoramento de indivíduos com risco de exposições ocupacionais, ambientais, nos consumidores crônicos do tabaco e do álcool, na observação da ação de substâncias quimiopreventivas e na verificação da

radiossensibilidade dos tecidos (SUHAS *et al.*, 2004; MIYAJI; CÓLUS, 2002; RAMIREZ; SALDANHA, 2002; BENNER *et al.*, 1994; SARTO *et al.* 1987; ÇELIK *et al.*, 2003; BHATTATHIRI *et al.*, 1996; ROSIN, 1992). Esses estudos demonstraram serem os micronúcleos bons biomarcadores quando aplicados em células esfoliadas da mucosa bucal e por isto vêm sendo largamente utilizado para verificar os efeitos do tabaco sob suas diversas formas (STICH; ROSIN, 1983; STICH *et al.*, 1982;).

No presente estudo devido à baixa frequência de indivíduos não tabagistas com neoplasias, apenas três, estes foram excluídos, pois não foi possível realizar análise estatística comparativa.

Foram analisados os micronúcleos e oito outras alterações nucleares. Como já foi dito os micronúcleos são capazes de identificar agentes clastogênicos e aneugênicos detectando danos iniciais no processo de carcinogênese em indivíduos expostos sob risco de desenvolver neoplasia. Quanto às outras alterações nucleares analisadas algumas são indicativas de fenômenos celulares degenerativos como células com picnose, cariólise, cariorréxis e cromatina condensada que quando elevadas são indicativas de citotoxicidade (necrose e queratinização) e genotoxicidade (apoptose). As células binucleadas provavelmente são resultantes de interferências em estágios tardios da divisão celular. As alterações tipo *broken-eggs* são projeções nucleares descritas primeiramente por Sarto *et al.* (1987) de origem e significados desconhecidos (TOLBERT *et al.*, 1991). Os falsos MNs são estruturas semelhantes aos MNs, mas que permanecem ligados ao núcleo principal.

Segundo Takahash (1982) as células com picnose, cariorréxis e cariólise também indicam estágios finais de degeneração, ou seja, morte celular. As células binucleadas estão presentes com maior frequência em displasias e os vacúolos nucleares (espaços claros entre a cromatina) são sinais de necrobiose, encontrados com maior frequência nos carcinomas. Por serem estas alterações nucleares características de respostas do organismo às agressões externas e considerando que a cavidade bucal pode apresentar fenômenos inflamatórios os mais variados elas foram incluídas nas análises.

A maioria das pesquisas tanto da literatura mundial como no Brasil analisam apenas os MNs. Com a finalidade de revalidar o protocolo de Tolbert *et al.* (1991) foi verificado neste estudo a sensibilidade e a especificidade das citadas alterações nucleares.

5.6.1 Comparação intra-individual

Nos pacientes com neoplasia bucal foi comparado dois lados: lesão (L) e mucosa clinicamente saudável oposta à lesão (LOL), pois segundo a teoria do campo de cancerização de Slaughter, a mucosa bucal estaria alterada, implicando em recidivas e aparecimento de um segundo tumor primário (BRAAKHUIS *et al.*, 2003).

Das nove alterações analisadas quatro (cariorréxis, MN, binucleadas e vacúolos nucleares) diferiram estatisticamente quando comparado os dois lados da mucosa dos pacientes com câncer. A semelhança em ambos os lados para cinco das alterações nucleares (cariólise, picnose, cromatina condensada, falso MN e *broken-eggs*) denota um caráter de não normalidade da mucosa do lado oposto à lesão dos pacientes portadores de carcinomas.

Considerando todas as alterações nucleares analisadas, embora o LOL tenha se assemelhado mais ao controle que à lesão, para a alteração nuclear tipo cariorréxis, indicativo de citotoxicidade e genotoxicidade, este grupo diferiu tanto da lesão (L) quanto do controle (C) demonstrando ser melhor biomarcador do LOL. Outra evidência da não normalidade do LOL foi verificada quando se analisou a alteração nuclear tipo cariólise, indicativa de necrose e queratinização, que diferiu estatisticamente entre LOL e mucosa sadia (controle).

Adicionalmente as alterações já citadas acrescentam-se os achados quanto à presença dos vacúolos nucleares na mucosa do lado oposto à lesão (LOL), pois foram menos freqüentes do que nas lesões (L), entretanto mais freqüentes do que nos sadios (controle). Estes achados são relevantes, pois não se achou relato na literatura de comparação intra-individual em pacientes com CA de boca que analisasse estas mesmas alterações nucleares.

Em relação aos micronúcleos foram verificadas semelhanças entre o lado oposto à lesão (LOL) com a mucosa sadia (controle). No entanto entre LOL e lesão (L), e entre controle e lesão (L) os MNs diferiram estatisticamente, denotando a ocorrência de diferentes níveis de genotoxicidade entre estes grupos.

5.6.2 Comparações interindividuais

Quando comparado controle e lesão foram observadas diferenças estatísticas para algumas das alterações nucleares validando o uso do protocolo utilizado nas análises.

As alterações mais freqüentes e que caracterizaram a lesão (L) foram MN, células binucleadas e vacúolos nucleares, pois diferiram significativamente tanto do lado oposto à lesão (LOL) como dos controles (C).

5.7 Valores preditivos das alterações nucleares e fatores de risco

Foram verificados a sensibilidade e a especificidade das alterações nucleares significativas através da curva 'ROC' (*Receiver Operating Characteristic Curve*) pela qual foi possível se escolher pontos de corte limítrofes para sadios e doentes (anexo IX).

A sensibilidade de um teste poderia ser definida como a chance de um indivíduo doente ser identificado como doente, ou seja, a medida de quão exatamente um método diagnóstico é capaz de identificar corretamente indivíduos com doença. Enquanto a especificidade seria a chance de um indivíduo sadio ser diagnosticado como sadio ou ainda, a medida de quão exatamente um método diagnóstico é capaz de identificar corretamente indivíduos sem doença.

Levando em considerações as estatísticas sobre incidência e prevalência do câncer de boca, optou-se por testes mais específicos implicando em poucos falsos positivos.

Dentre todas as alterações nucleares cariorréxis demonstrou maior poder como preditora de lesão bucal com altas especificidade e sensibilidade e com ponte de corte ≥ 4 células indicando lesão bucal. Na literatura os MNs são os mais freqüentemente encontrados provavelmente devido ao fato de não levarem em consideração as outras alterações nucleares. Uma exceção foi o estudo de Bohrer *et al.* (2005) que encontraram uma quantidade maior de células com cariorréxis no lábio inferior de usuários do tabaco quando comparado aos não usuários e o estudo de Çelik *et al.* (2003) que acharam elevada freqüência de células com cariorréxis nos trabalhadores de uma estação de petróleo expostos ao benzeno e que eram também tabagistas. Estes estudos somados ao aqui apresentado reforçam a idéia de acrescentar nas análises esta alteração.

Quando o tabagismo foi associado com as alterações nucleares observou-se que embora todas as variáveis significativas para lesão maligna tenham sido também significativas quando associadas ao consumo do tabaco, a associação mais forte foi para cariorréxis, confirmando o que foi dito no parágrafo anterior, que esta alteração possui melhor poder de predição no diagnóstico de carcinomas da cavidade oral (tabela 7).

Apesar de Ramirez e Saldanha (2002) encontrarem a alteração nuclear tipo cariorréxis em grande quantidade em pacientes alcoólatras portadores de carcinomas bucais, este achado foi característico das áreas menos expostas (sulco gengivo-labial) o contrário deste trabalho em que foi encontrada mais em mucosa bucal exposta e do esperado já que a frequência aumentada de células com cariorréxis é indicativo de exposição a agentes genotóxicos e citotóxicos.

Para a alteração nuclear tipo cariólise, ponto final da degeneração (morte celular) e indicativa de necrose e queratinização estabeleceu-se o ponto de corte ≥ 11 células implicando em lesão bucal. Encontrou-se também uma alta especificidade (91,43%) e uma boa sensibilidade (62,86%) embora não tão sensível quanto cariorréxis. Tolbert *et al.* (1992) caracterizam esta alteração nuclear junto com cariorréxis como indicativas de citotoxicidade e relacionadas com a promoção do câncer. O trabalho já citado de Çelik *et al.* (2003) também encontraram frequência elevada de células com cariólise em trabalhadores expostos ao benzeno e que usavam o tabaco reforçando a caracterização de que quando aumentadas esta alteração resulta da ação de agentes citotóxicos.

Em relação aos MNs, obteve-se alta especificidade (97,06%) e baixa sensibilidade (27,27%) com ponto de corte ≥ 2 implicando em lesão bucal. A maioria dos estudos que aplica o teste do Micronúcleo compara a mucosa bucal de indivíduos tabagistas e não tabagistas (SUHAS *et al.*, 2004; MAJER *et al.*, 2001; KAUGARS *et al.*, 1992; STICH; ROSIN, 1983), no entanto poucos analisam os MNs nos tumores. Neste estudo os MNs não foram evidenciados tão bons marcadores de lesão bucal quando comparado com a alteração nuclear cariorréxis, talvez porque são produzidos nos estágios iniciais da carcinogênese o que se contrapõe a amostra estudada cujos indivíduos eram portadoras de lesões já avançadas. No entanto o estudo de Carvalho *et al.* (2002) que tentaram testar a hipótese de que os MNs pudessem ser empregados como preditivos de recidivas ou segundo tumor primário demonstraram uma elevada frequência dos MNs em tumores

T3 e T4 em relação aos tumores T1 e T2. Interessante informar que dentre todas as alterações nucleares analisadas o MN foi a única alteração significativa ($p=0,006$) quando associada ao fator de risco exposição ao sol, confirmando serem indicativos de genotoxicidade (tabela 7).

Os dados que foram encontrados com relação aos vacúolos nucleares mostraram alta especificidade (97,14%) e boa sensibilidade (54,55%) com ponto de corte ≥ 77 implicando em lesão bucal. Esta alteração nuclear foi a que mais se relacionou com o consumo de bebidas alcoólicas parecendo haver relação entre este tipo de alteração e o álcool, no entanto estudos mais amplos a este respeito se fazem necessários, pois não se encontrou na literatura nenhum estudo analisando os vacúolos nucleares. A confirmação de que o consumo de bebidas alcoólicas é realmente um fator de risco foi confirmado pela associação significativa com todas as alterações nucleares preditoras de lesão maligna (tabela 6).

As células binucleadas freqüentemente encontradas em displasias (TAKAHASHI, 1982) com ponto de corte ≥ 7 implicando em lesão bucal, obteve a mais alta especificidade (100%) e baixa sensibilidade (32,35%) enfatizando a importância da inclusão da contagem de células com essas alterações conforme defendido por alguns autores (TOLBERT *et al.*, 1992; SARTO *et al.*, 1987). Çelik *et al.* (2003) também encontraram freqüência aumentada de células binucleadas nos tabagistas expostos ao benzeno.

Outros fatores de risco além do tabagismo foram relacionados com as alterações nucleares. A cárie dentária foi estatisticamente significativa quando associada a quatro (cariorréxis, cariólise, MN e binucleadas) das alterações nucleares preditoras de lesão maligna. Quanto à gengivite houve resultados estatisticamente significantes com relação a três das alterações nucleares (cariorréxis, cariólise e vacúolos nucleares). Estes achados evidenciam a importância da higiene bucal como co-fator na etiologia destas lesões. Diante dessas análises verifica-se a aplicabilidade do estudo não só dos micronúcleos como também das demais alterações nucleares aqui analisadas como ferramentas para a identificação precoce de lesões bucais de pacientes expostos a fatores de risco.

Alguns problemas foram enfrentados durante a realização deste trabalho, tais como falta de informações nos prontuários, não acompanhamento dos pacientes após cirurgia e/ou radioterapia para que fossem observados recidivas e segundo tumor primário e falta de ambulatório especializado para detecção precoce de lesões bucais. Dessa maneira foi possível chegar a algumas conclusões relevantes que poderão ser utilizadas na triagem de pacientes com risco para o câncer de boca.

6. CONCLUSÕES

- As alterações nucleares cariorréxis, cariólise, micronúcleos, binucleadas e vacúolos nucleares possuem sensibilidade e especificidade capazes de serem utilizadas como preditoras de carcinomas da cavidade bucal.
- A mucosa do lado oposto à lesão dos pacientes com carcinomas bucais possui alterações nucleares que a caracterizam como mucosa não sadia.
- O teste do Micronúcleo deve incluir além das alterações nucleares categorizadas por Tolbert *et. al.* (1991) os vacúolos nucleares e pode ser usado no monitoramento de indivíduos sob risco de desenvolvimento de carcinomas bucais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELOFF. Multifactorial etiology: epidemiology of cancers of the upper aerodigestive tract and lung. **Clinical Oncology**, 2nd ed. Churchill Livingstone Inc, 2000.

AGRESTI, A. **Introduction to categorical data analysis**. Ed. John Wiley e Sons: New York, USA, 1996.

ALMEIDA SANTOS, M. F. M.; FERRARI, I; LUNA, H. Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. **Environ. Research**, v. 97, p. 330-334, 2005.

AMAR, A.; FRANZI, S. A.; RAPOPORT, A. Evolution os patients with squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract. **São Paulo Med. J.**, v. 121, n. 4, p. 155-158, 2003.

AWDE, J. D.; KOGON, S. L.; MORIN, R. J. Lip cancer: a review. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 62, n. 8, p. 634-6, 1996

BENNER, S. E.; LIPPMAN, S. M.; WARCOVICH, M.; LEE, J. J.; VELASCO, M.; MARTIN, J. W. Micronuclei, a biomarker for chemopreventive trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. **Int. J. Cancer**, v. 59, p. 457-459, May.1994.

BHATTATHIRI, V. N.; BINDU, L.; REMANI, P.; CHANDRALEKHA, B.; DAVIS, C. A.; NAIR, M. K. Serial cytological assay of micronucleus induction: a new tool to predict human cancer radiosensitivity. **Radiotherapy and Oncology**, v. 41, p. 139-142, 1996.

BOHRER, P. L.; SANT'ANA FILHO, M.; PAIVA, R. L.; DA SILVA, I. L.; RADOS, P. V. Assessment of micronucleus frequency in normal mucosa of patients exposed to carcinogens. **Acta Cytol.**, v. 49, n. 3, p. 265-272, 2005.

BRAAKHUIS, J. M. B.; TABOR, P. M.; KUMMER, J. A.; LEEMANS, R. C.; BRAKENHOFF, H. R. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Research**, v. 63, p. 1727-1730, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer de boca**. Rio de Janeiro: INCA, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 12 fev. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 15 fev. 2006.

BURGAZ, S.; DEMIRCIGIL, G. Ç.; YILMAZER, M.; ERTAS, N.; KEMALOGU, Y.; BURGAZ, Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. **Mutation Research**, v. 521, p. 47-56, 2002.

CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**. Ed. Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, 1983.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁZ, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; BARAÚNA NETO, J. C.; CURIONI, O. A. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de

carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CASARTELLI, G; BONATTI, S; DE FERRARI, M; SCALA, M.; MEREU, P.; MARGARINO, G; ABBONDANDOLO, A. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 22, n. 6, p.486-492, Dec. 2000.

ÇELIK, A.; CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol saturation attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 417-421, 2003.

CERQUEIRA, E. M. M.; GOMES-FILHO, I. S.; TRINDADE, S.; LOPES, M. A.; PASSOS, J. S.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutation Research**, v. 562, p. 111-117, 2004.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.). **Robbins-Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COSTA, E. D.; MIGLIORATI, C. A. Câncer bucal: avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 283-289, 2001.

COSTA, A. L. L; PEREIRA, J. C.; NUNES, A. A. F.; ARRUDA, M. L. S. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 16, n 3, p. 216-220, 2002.

DEDIVITIS, R. A.; FRANÇA, C. M.; MAFRA, A. C. B.; GUIMARÃES, F. T.; GUIMARÃES, A. V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 35-40, Jan-Fev. 2004.

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

DU, X.; SQUIER, C. A.; KREMER, M. J.; WERTZ, P. W. Penetration of N-nitrosocotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, p. 80-85, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, P. W.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428 p. 271-283, 1999.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Research Focus**, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002a.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1113-1117, 2002b.

FENECH, M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 255-269, July 2005.

FENECH, M; BAGHURST, P; LUDERER, W.; TURNER, J.; RECORD, S.; CEPPI, M.; BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotine acid, vitamin E, retinol, β -carotene and high intake of panthothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability – results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 991-999, 2005.

FONTES, P. C.; SOUSA, F. A. C. G; ROSA, L. E. B. Correlação entre o consumo de tabaco e a incidência de câncer bucal. **Rev. Bras. de Patologia Oral**, v.3, n. 3. Jul/Ag/Set. 2004.

FRANCO, E. L.; KOWALSKI, L. P.; OLIVEIRA, B. V.; CURADO, M. P.; PEREIRA, R. N.; SILVA, M. E.; FAVA, A. S.; TORLONI, H. Risk factors for oral câncer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, v. 43, p. 992-1000, 1989.

FREITAS, M. D.; GARCÍA-GARCÍA, A; CARNEIRO, J. L. M.; CRESPO-ABELEIRA, A.; GANDARA-REY, J. M. Citologia esfoliativa da mucosa oral: comparação citomorfológica da mucosa oral normal em pacientes com câncer oral e indivíduos saudáveis. **Rev. Bras. de Patologia Oral**, v. 2, n. 4, p. 2-6, Out/Dez, 2003.

GATTÁS, G. J. F.; LONGATTO FILHO, A.; MAEDA M. Y. S.; SANTOS, D. R.; De ANDREA FILHO, A. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticos: correlação dos métodos de Papanicolaou e Feulgen-fast-green. **Folha Med. Bras.** v. 104, n. 3, p. 57-59, 1992.

GHOSE, U. R.; PARIDA, B. B. Cythological study of exfoliated buccal mucosa cells of tribes in Orissa State (India) with high risk for oral cancer. **Indian J. of Cancer**, v. 32, p. 95-99, 1995.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HA, P. K.; CALIFANO, J. A. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, n. 5, p. 363-369, 2003.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. A report os the environmental protection agency gene-tox program, **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P. H.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environ. and Mol. Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.

JOHNSON, N. Tobacco use and oral cancer: a global perspectiva. **J. of Dent. Education**, v. 65, n. 4, p. 328-339, 2001.

KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A.; BURGAZ, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: aplication to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutation Research**, v. 442, p. 29-35, 1999.

KAUGARS, G. E.; RILEY, W. T.; BRANDT, R. B.; BURNS, J. C.; SVIRSKY, J. A. The prevalence of oral lesions in smokeless tobacco users and an evaluation of risk factors. **Cancer**, v. 70, n. 11, p. 2579-2585, 1992.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE Jr., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p. 153-163, 2003.

KOLOTAS, C.; TONUS, C.; BALTAS, D.; CERNEA, M.; VOGT, H.; MARTIN, T.; STRASSMANN, G.; ZAMBOGLOU, N. Clinical relevance of tumor ploidy and micronucleus formation for oral cavity cancer. **Tumori**, v. 85, p. 253-258, 1999.

LEE, J. J.; KI HONG, W; HITTELMAN, W. N.; MAO, L.; LOTAN, R.; SHIN, D. M.; BENNER, S. E.; XU, X; LEE, J. S.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V. M.; GEYER, C.; PEREZ, C.; MARTIN, J. W.; EL-NAGGAR, A. K.; LIPPMAN, S. M, Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 1702-1710, 2000.

LEITE, I.C.G.; KOIFMAN, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncology**, v. 34, p. 347-52, 1998.

LLEWELLYN, C. D.; LINKLATER, K; BELL, J, JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, S. An analysis of risk factors for oral cancer in yang people: a case-control study. **Oral Oncology**, v. 40, p. 304-313, 2004.

LUCENA, R. G. R. de. **Prevalência do câncer de boca e perfil epidemiológico dos pacientes em uma instituição de referência em câncer no Ceará. 2002.** 112f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

LUCERO, L.; PASTOR, S.; SUÁREZ, S.; DURBÁN, R.; GÓMEZ, C.; PARRÓN, T.; CREUS, A.; MARCOS, R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. **Mutation Research**, v. 464, p. 255-262, 2000.

MASHERBERG, A; BOFFETTA, P.; WINKELMAN, R.; GARFINKEL, L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. **Cancer**, v. 72, n. 4, p. 1369-1375. August. 1993.

MAJER, B. J.; LAKY, N.; KNASMULLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.

MIYAJI, C. K.; CÓLUS, I. M. S. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian dentists occupationally exposed to low doses of X-radiation. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 16, n. 3, p. 196-201, 2002.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; COSTA, R. B. L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Rev. Saúde Pública.**, v. 34, n. 3, p. 251-58, 2000.

MORENO-LÓPEZ, L. A.; ESPARZA-GÓMEZ, G. C.; GÓNZALEZ-NAVARRO, A.; CERERO-LAPIEDRA, R.; GÓNZALES-HERNÁNDEZ, M. J.; DOMÍNGUEZ-ROJAS, V. **Oral Oncology**, v. 36, p. 170-174, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Finding cancer statistics**. Disponível em: <http://seercancer.gov>. Acesso em: 08 Jun. 2006

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia oral e maxilo-facial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998.

NICOTERA, G.; GNISCI, F.; BIANCO, A.; ANGELILLO, I. F. Dental hygienists and oral cancer prevention. **Oral Oncology**, v. 1, n. 3, p. 1010-1016, 2004.

OBE, G.; ANDERSON, D. Genetic effects of ethanol. **Mutation Research**, v. 186, p. 177-200., 1987.

OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; COSTA, A. L. Ação oncogênica do papilomavírus humano. **Rev. Bras. de Patologia Oral**, v. 1, n. 1, p. 29-38, out./dez. 2002.

OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. L. L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, n. 4, p. 553-559, 2003.

PELUCCHI, C.; TALAMINI, R., NEGRI, E., LEVI, F.; CONTI, E.; FRANCESCHI, S.; LA VECHIA. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 1677-1681. July. 2003.

RABELLO-GAY, M. N. Teste do micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** São Paulo: FCA, 1991.

RAMIREZ, A; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

REGESI, J. A.; SCHIUBBA, J. J. **Patologia bucal correlações clinicopatológicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1991.

RIBEIRO, V. L.; SALVATORI, M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental.** 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003.

ROBERTS, D. M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. **Acta Cytol.**, v. 41, n. 4, p. 1008-014, 1997.

ROSIN, M. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in human: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 267, p. 265-276, 1992.

ROTH, M. D.; ZECHLINSKI, G.; MARTINO-ROTH, M. G. Avaliação da genotoxicidade em cirurgiões-dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v. 10, n. 4, p. 209-14, 2002.

RUIZ, F. E., PELÁEZ, A. A. C., LAPIEDRA, R. C., G, GÓMEZ, G. E., LÓPEZ, L. A. M. Efectos del consumo de alcohol em la cavidad oral: relación com el câncer oral. **Oral Medicine and Pathology**, v. 9, p. 14-23, 2004.

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.

SHAM, A. S. K.; CHEUNG, L. K.; JIN, I. J.; CORBET, E. F. The effect of tobacco use on oral health. **Hong Kong Med. J.**, v. 9, p. 271-277, 2003.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para ciências do comportamento**. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, Brasil, 1975.

SQUIER, C.A.; JOHNSON, G. K. Role of nicotine as cofactor in smokeless tobacco carcinogenesis. Smokeless tobacco or health an international perspective U.S. Dept. of Health and Human Service, **NIH Publication**, n. 93, p. 153-74. September. 1992.

SOARES, C. P.; MALVAZI, I.; DOS REIS, R. I.; NEVES, K. A.; ZUANON, J. A. S.; BENATTI NETO, C.; SPOLIDÓRIO, L. C.; OLIVEIRA, M. R. B. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 5, p. 439-444, set./out. 2002.

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

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**, v. 31, p. 305-308, 1983.

STICH, H. F. Micronucleated exfoliated cells as indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials. **J. of Nutrition, Growth and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 9-18, 1987.

STURGIS, E. M.; DAHLSTROM, K. R.; GUAN, Y.; EICHER, S. A.; STROM, S. S.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Alcohol dehydrogenase 3 genotype is not associated with risk of squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 273-275, 2001.

SUDBØ, J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. **Clinical Medicine & Research**, v. 2, n. 4, p. 233-242, 2004.

SUHAS, S.; GANAPATHY, K. S.; GAYATRI DEVI, M.; RAMESH, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutation Research**, v. 561, n. ½, p. 15-21, July 2004.

TAKAHASHI, M. **Atlas colorido de citologia do câncer**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Manoele LTDA, 1982.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 69-77, Feb. 1992.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **American J. of Epidemiology**, v. 134, n. 8, p. 840-850, 1991.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncology**, v. 41, p. 244-260, 2005.


WÜNSCH-FILHO, V.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n.3, p. 467-480, Jun. 2001.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**, v. 38, p. 737-746, 2002.

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo de coloração de esfregaço bucal para detecção do micronúcleo (FEULGEN-ROSSEMBECK)

1. Hidrólise das lâminas com o esfregaço pelo HCl 1N.
 - 8,7 mL de HCl concentrado e 91,3 mL de água destilada, ou seja, 100 mL;
 - Pré-aqueça os 100 mL de HCl 1N em potencia média no microondas por 40 segundos até atingir 60°C.
2. Mergulhe as lâminas dentro de um borrel contendo o HCl 1N a 60°C e deixe na estufa pré-aquecida também a 60°C por 4 minutos.
3. Lave as lâminas em água destilada. Utilize uma piseta.
4. Seque as lâminas.
5. Pingue o reativo de Schiff sobre as lâminas com uma pipeta de vidro de maneira a formar um filme sobre a lâmina. Tenha o cuidado para não tornar a colocar a pipeta novamente no frasco do corante para não contaminá-lo (90 minutos).
6. Mergulhe as lâminas no metabissulfito (três imersões de 2 minutos cada) para retirar o excesso do reativo. Utilize um borrel.
7. Lave as lâminas com água destilada. Utilize uma piseta.
8. Contracore com “fast-green” (30 segundos). Utilize um borrel.
Lave as lâminas conforme item 3 para retirar o excesso.
9. Mergulhe as lâminas em três banhos de álcool e três de xilol.
10. Monte a lâmina pingando o bálsamo do Canadá e coloque a lamínula
 O corante *fast-green* poderá ser reutilizado se filtrado.

ANEXO II

Protocolo de preparação do metabissulfito de sódio

- Pese 5g de metabissulfito de sódio e coloque em 500 mL de água destilada.
Guarde de preferência na geladeira.

🧊 Guarde de preferência na geladeira.

ANEXO III

Protocolo de confecção do Reativo de Schiff

✚ Separar e conferir material: água destilada, béquer, termômetro, pipeta de 5 mL, HCl concentrado, papel de filtro, funil, papel alumínio, baqueta, vidro escuro.

✚ Pesar os materiais: fucsina básica (1g), metabissulfito de sódio (2g) e carvão ativado (0,5g)

1. Aquecer 200 mL de água destilada até entrar em ebulição
2. Junte a água em ebulição com a fucsina e deixe esfriar até 50°C. Nessa etapa a solução é vinho escuro e opaco.
3. Adicione 1mL de HCl concentrado à solução de água destilada + fucsina e deixe agitando por 10 minutos.
4. Adicione agora 2g do metabissulfito e deixe agitando por mais 10 minutos. Agora a solução fica mais clara.
5. Deixe em repouso em vidro escuro por 24h.
6. Coloque o carvão ativado (0,5g) e deixe agitando por 10 minutos.
7. Filtre a solução que estará incolor ou de cor alaranjada e guarde em vidro escuro na geladeira.

ANEXO IV

Protocolo de confecção do “fast-green”

1. Separe 30 mL de água destilada, use uma proveta.
2. Junte os 30 mL de água destilada à 70 mL de etanol absoluto e adicione 1g de “fast-green”.

 Guarde em frasco envolto em papel alumínio.

ANEXO V

Cadastro Para Dados Epidemiológicos do Projeto: Danos Genéticos em Esfregaço de Mucosas Bucal: Correlação com o Hábito de Fumar na Progressão à Transformação Maligna.

Prontuário Número: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____

Sexo: 1. () M 2. () F Data do Nascimento: ____/____/____

Procedência: _____ () 1. Fortaleza () 2. Interior do Ceará () 3. Outros

Ocupação: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Estado Civil: 1. () casado(a) 2. () solteiro(a) 3. () Outros

1. DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS:

Renda familiar: _____

2. CONDIÇÃO BUCAL:

2.1. Usa prótese dentária?

1. () sim Tipo: 1. () prótese total 2. () prótese parcial removível 3. () prótese parcial
2. () não

2.2. Gengiva: 1. () clinicamente saudável 2. () inflamada

2.3. Periodontite: 1. () sim 2. () não

2.4. Dentes cariados: 1. () presentes 2. () ausentes 3. desdentados

2.5. Lesão de mucosa: 1. () sim 2. () não Tipo: _____

Localização: _____ Estadiamento: _____

2.6. Escovação dentária (Quantas vezes por semana?) _____

1. não escova 2. 01-15 escovações 3. 15-30 escovações 4. acima de 30 escovações

2.7. Faz uso de anti-séptico bucal: 1. () sim 2. () não

Tipo: () 1. Cepacol () 2. Listerine () 3. Aroeira () 4. Outros

3. HÁBITO DE FUMAR

3.1. Fumante?

1. () sim 2. () não (Se já fumou há quanto tempo parou? _____)

3.2. Qual tipo de fumo?

1. () cigarro com filtro 2. () cigarro sem filtro 3. () cigarro de palha

4. () charuto 5. () cachimbo 6. () fumo mascado

Outros _____

1 - () De 01-02 tipos de fumo

2 - () Acima de 02 tipos de fumo

3.3. Há quanto tempo? _____

1. () 20 anos 2. () 20-40 anos 3. () 40-60 anos 4. () Acima de 60 anos

3.4. Quantos cigarros por dia? _____

1. () menos ou igual a ½ carteira 2. () ½ a 01 carteira 3. () 01 a 02 carteiras 4. () mais que 02 carteiras

3.5. Fumante passivo? 1. () sim 2. () não

4. USO DE DROGAS

4.1. Está fazendo uso de alguma medicação?

1. () sim 2. () não

Qual:

1. Vitamina (s) 2. Antiácido 3. Antihipertensivo 4. Hormônios (s) 5. Outros

4.3. Uso de drogas:

1. () sim 2. () não Qual: _____

5. HÁBITOS ALIMENTARES

5.1. Café:

a. () sim Quantas xícaras (pequena) por dia? _____

b. () não

5.2. Alimentos quentes: 1. () sim 2. () não

5.3. Alimentos picantes: 1. () sim 2. () não

5.4. Ingestão de bebidas alcoólicas: 1. () sim 2. () não

5.4.1. Há quanto tempo bebe? _____

1. () 01-15 anos 2. () 15-30 anos 3. () 30-45 anos 4. () Acima de 45 anos

5.4.2. Frequência (semanal):

1. () De 01 a 02 vezes por semana 2. () De 03 a 05 vezes por semana 3. () Todos os dias

5.4.3. Quantidade (semanal):

1. () 350-700 mL 2. () 1L 3. () Acima de 1L

5.4.3. Qual tipo de bebida? 1. () fermentada 2. () destilada 3. ambos

Outros: _____

6. EXPOSIÇÃO A AGENTES FÍSICOS

6.1. Sol: 1. () sim 2. () não

6.2. Radiação/radiografia: 1. () sim 2. () não

6.3. Inseticida: 1. () sim 2. () não

ANEXO VI

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Instituição: Departamento de Patologia e Medicina Legal – Laboratório de Genética Molecular

Endereço: Faculdade de Medicina, Rua Monsenhor Furtado S/N. Bairro: Rodolfo Teófilo

Investigador responsável: Maria Adriana Skeff de Paula Miranda

Título: “Danos genéticos em esfregaços de mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar na progressão à transformação maligna”.

Eu, _____ por este meio, fui informado (a), em detalhes, sobre o estudo intitulado: “Danos genéticos em esfregaços de mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar na progressão à transformação maligna”. Eu serei um (a) dos (as) participantes deste estudo. A pesquisa em questão pretende fazer um estudo dos fatores de risco para o desenvolvimento de transformações malignas na mucosa bucal, de modo a efetuar medidas preventivas, para obter o máximo de benefícios para o paciente. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária. Todos os dados da minha participação serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos nesse estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário. Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se eu tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar _____ no telefone _____.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do investigador: _____

Data: _____ .

ANEXO VII



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 59/02

Fortaleza, 07 de março de 2002

Protocolo n° 06/02

Pesquisador responsável: Maria Adriana Skeff de Paula Miranda

Dept°./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: "Danos genéticos em esfregaços de mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar na progressão à transformação maligna"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 28 de fevereiro de 2002.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando R. Frota Siqueira
Coordenador Adjunto do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

ANEXO VIII

Tabela das Comparações Múltiplas para as variáveis significativas no teste de Kruskal-Wallis

Variáveis		Controle vs. Lesão maligna
Cariorréxis	Dif	31,429 *
	dms 5%	14,95
Cariólise	Dif	26,014 *
	dms 5%	14,95
Falso MN	Dif	8,163
	dms 5%	14,894
MN	Dif	20,470 *
	dms 5%	14,840
Binucleadas	Dif	29,550 *
	dms 5%	14,894
Vacúolos	Dif	25,174 *
	dms 5%	14,840

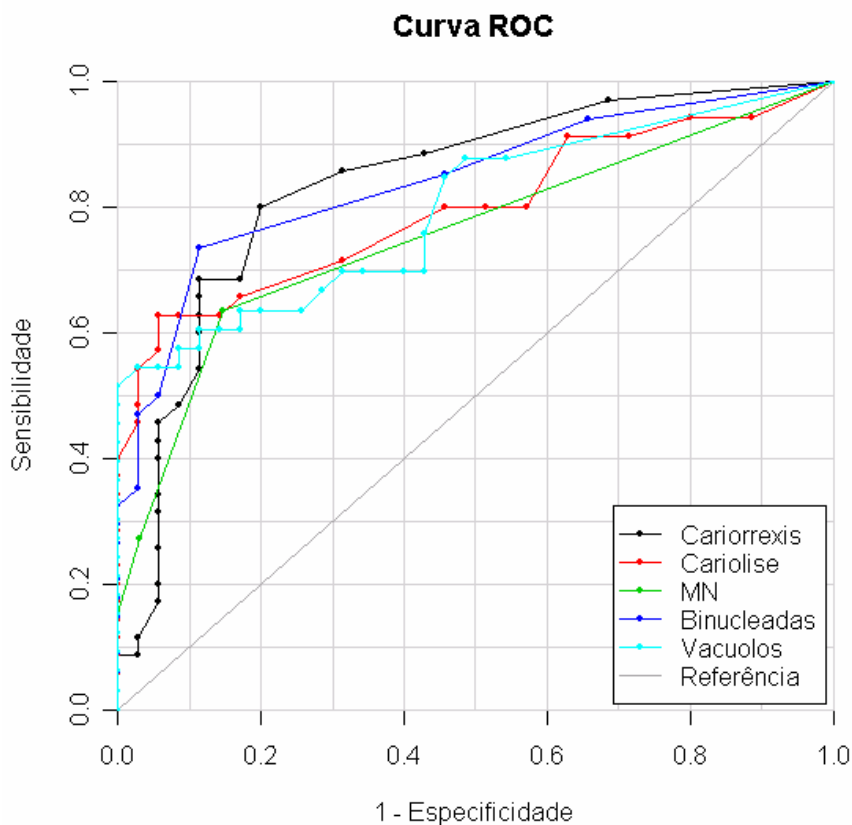
Dif: Valor absoluto da diferença entre as médias dos postos (*ranks*) dos grupos em questão.

dms (Diferença mínima significativa): Valor a partir do qual se considera-se os grupos estatisticamente diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Pelo quadro acima, observa-se que as variáveis cariorréxis, cariólise, MN, binucleadas e vacúolos nucleares, o grupo dos pacientes com carcinomas difere significativamente dos demais. Todas as comparações múltiplas foram feitas ao nível de 5% de significância.

ANEXO IX

Curvas de 'ROC' para Cariorréxis, Cariólise, Micronúcleos, Binucleadas e Vacúolos.



Estatísticas descritivas e testes relativos as curvas de ROC.

				Intervalo de Confiança	
Variáveis	Area	EP	N,Desc	Inf	Sup
Binucleadas	0,843	0,048	< 0,001	0,749	0,938
Cariorrexis	0,838	0,050	< 0,001	0,741	0,935
Vacuolos	0,797	0,055	< 0,001	0,689	0,905
Cariolise	0,797	0,055	< 0,001	0,689	0,904
MN	0,758	0,060	< 0,001	0,639	0,876

Observa-se na tabela acima que todas as variáveis são significativas como preditoras da doença, sendo a variável binucleadas a que obteve maior área sob a curva ROC, seguida de forma bastante aproximada por Cariorréxis.

Tomando como ponto de corte para diagnóstico os valores abaixo:

Cariorrexis: ≥ 4 implicando em teste positivo (com lesão maligna)

Cariólise: ≥ 11 implicando em teste positivo (com lesão maligna)

MN: ≥ 2 implicando em teste positivo (com lesão maligna)

Binucleadas: ≥ 7 implicando em teste positivo (com lesão maligna)

Vacúolos: ≥ 77 implicando em teste positivo (com lesão maligna)

obtem-se a tabela a seguir:

Variáveis	Sensib (%)	Especif (%)	VPT (%)	VPP (%)	FP (%)	VPN (%)	FN (%)	RVP	RVN
Cariorrexis	80,00	80,00	80,00	17,39	82,61	98,70	1,30	4,00	0,25
Cariólise	62,86	91,43	90,00	27,85	72,15	97,91	2,09	7,33	0,41
MN	27,27	97,06	93,57	32,80	67,20	96,21	3,79	9,27	0,75
Binucleadas	32,35	100,00	96,62	100,00	0,00	96,56	3,44	-----	0,68
Vacuolos	54,55	97,14	95,01	50,12	49,88	97,60	2,40	19,09	0,47

VPT: Valor de predição do teste. VPP: Valor de predição positiva. FP: Falsos positivos.

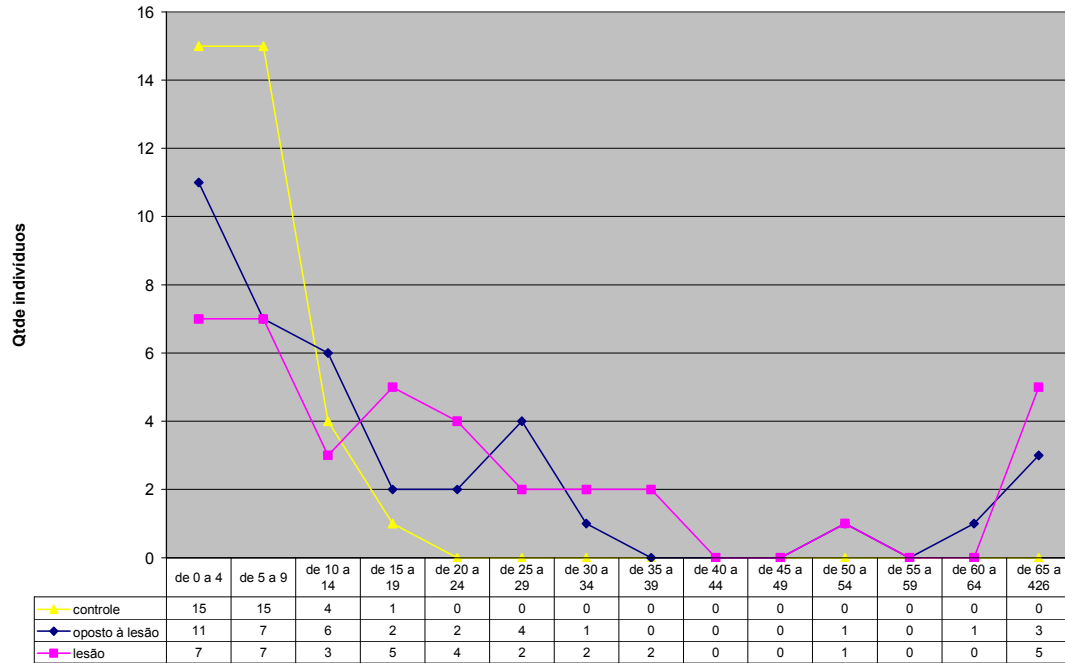
VPN: Valor de predição negativa. FN: Falsos negativos. RVP: Razão de verossimilhança positiva.

RVN: Razão de verossimilhança negativa.

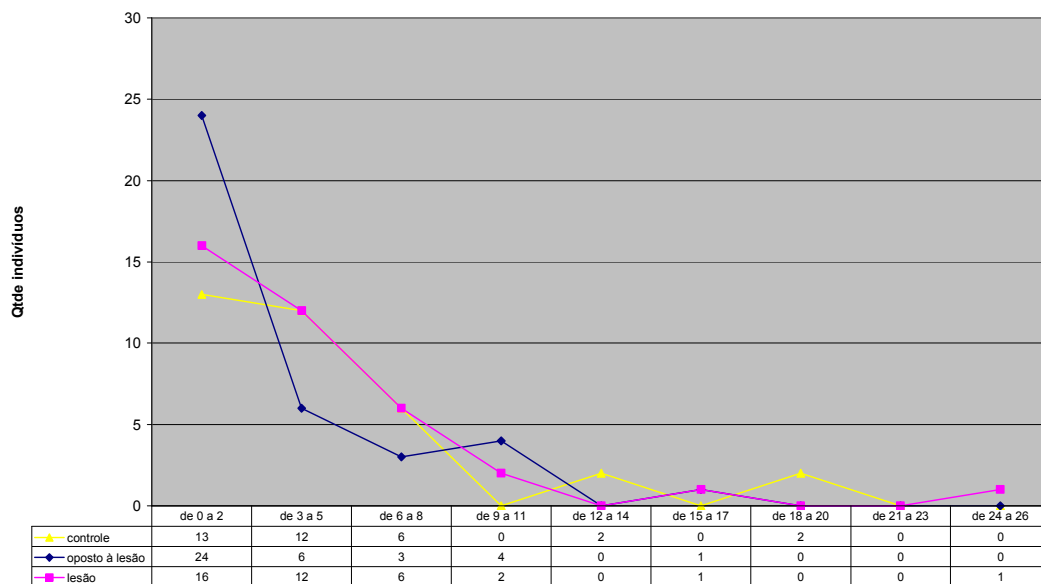
ANEXO X

Distribuição das alterações nucleares nos grupos estudados.

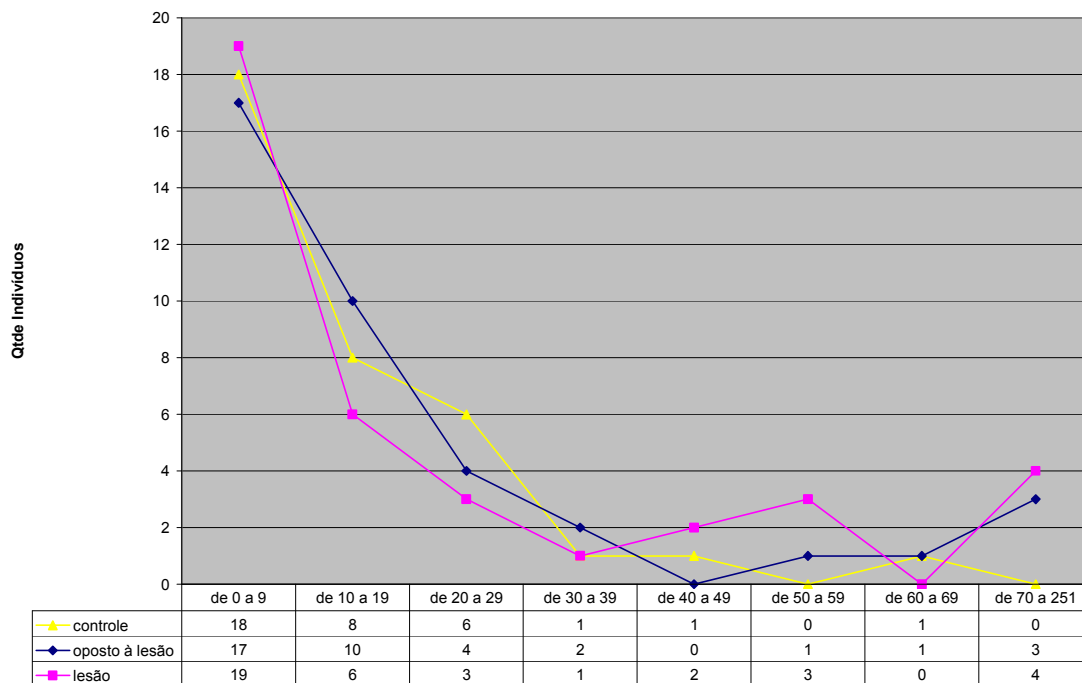
Distribuição de alteração do tipo Cariólise



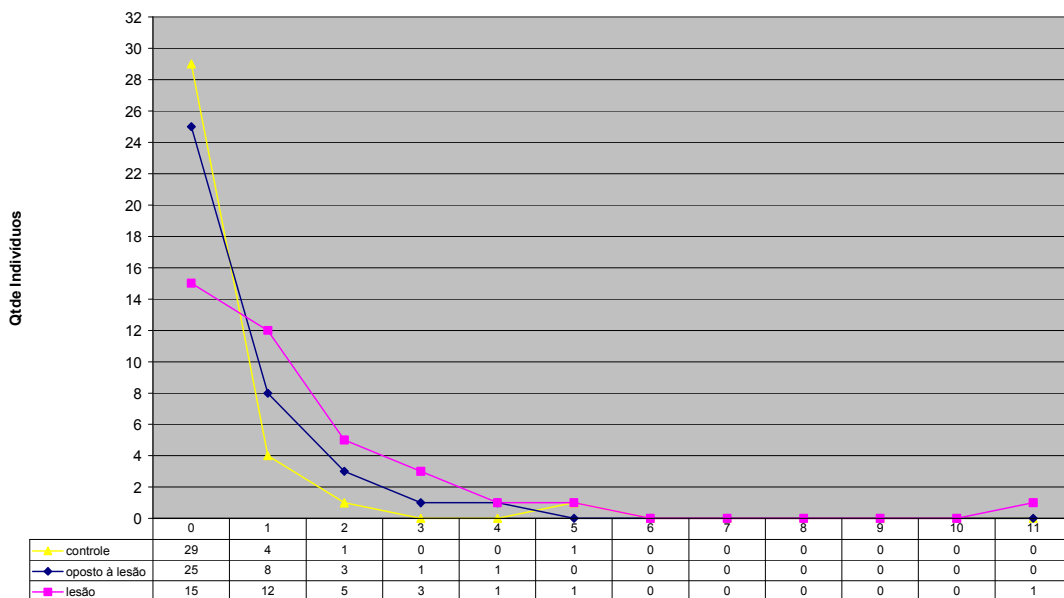
Distribuição de alteração do tipo Picnose



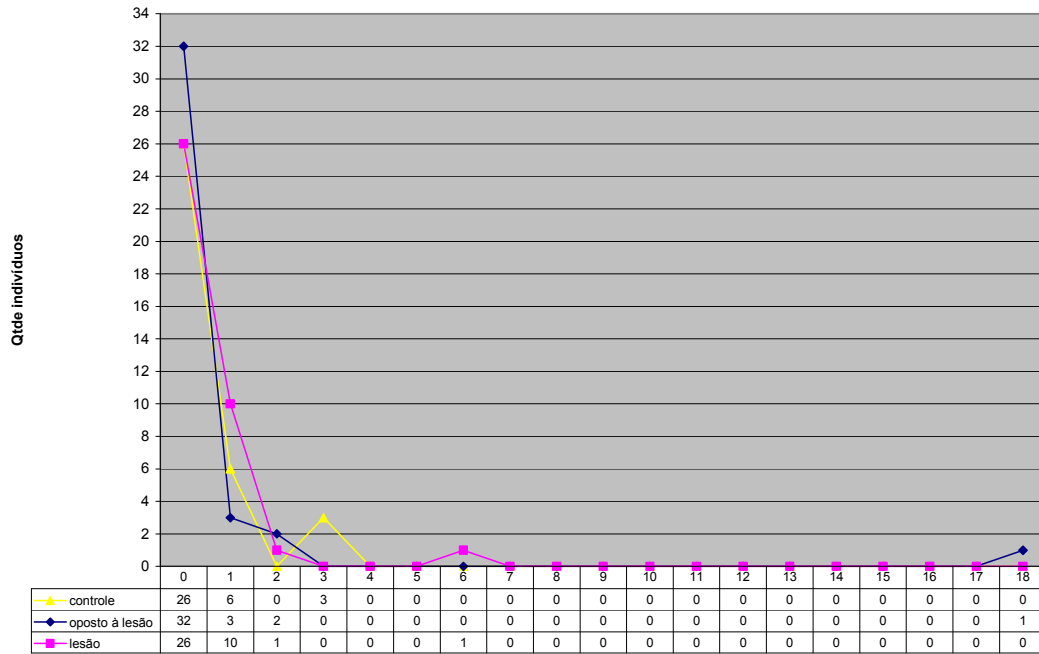
Distribuição de alteração tipo Cromatina Condensada



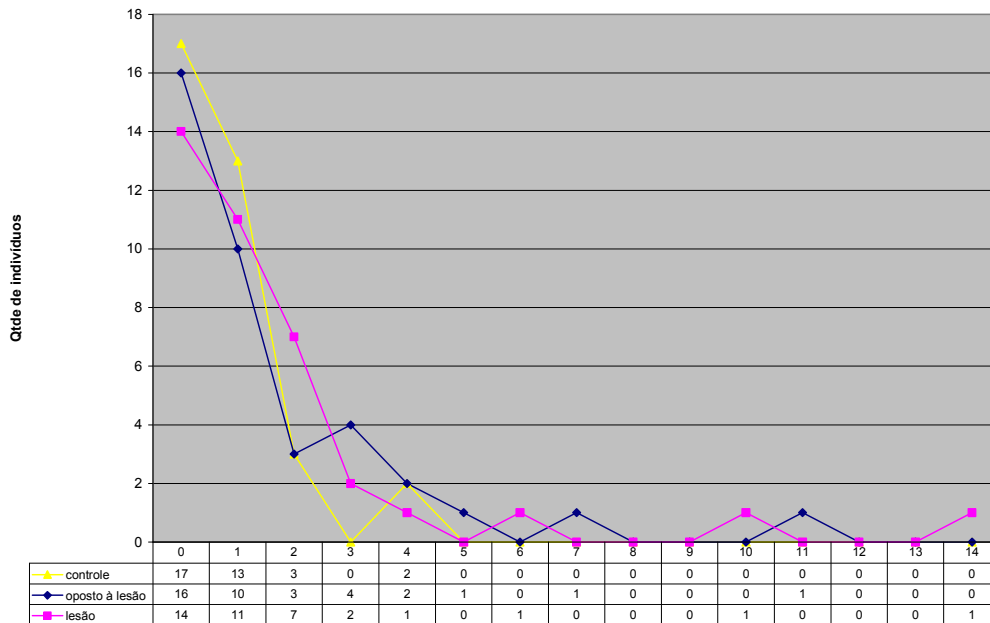
Distribuição de alteração do tipo Micronúcleo



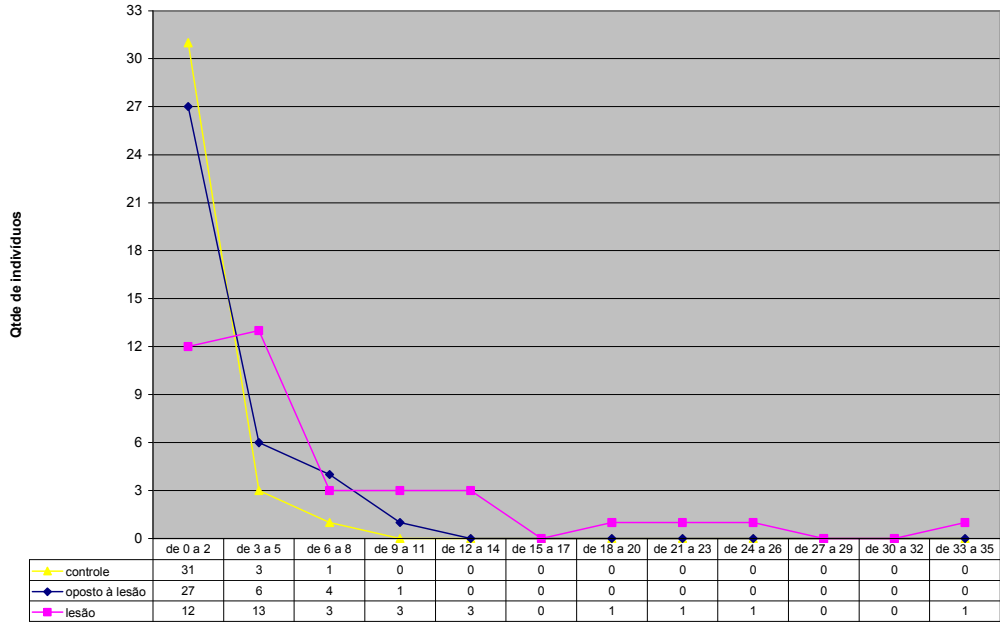
Distribuição de alteração tipo "Broken-eggs"



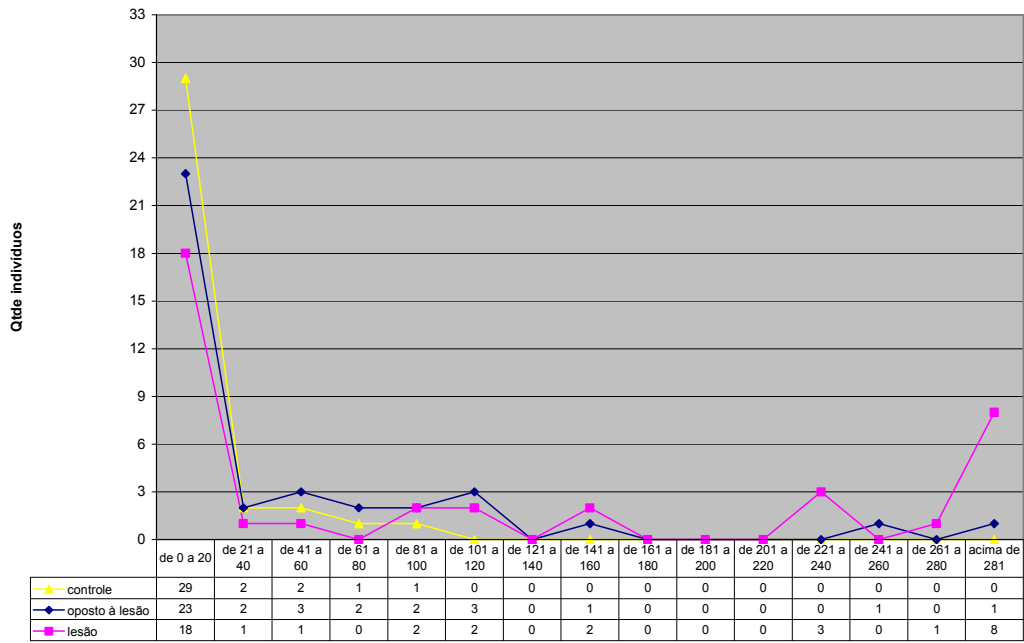
Distribuição de alteração do tipo Falso Micronúcleo



Distribuição de alteração tipo Binucleação



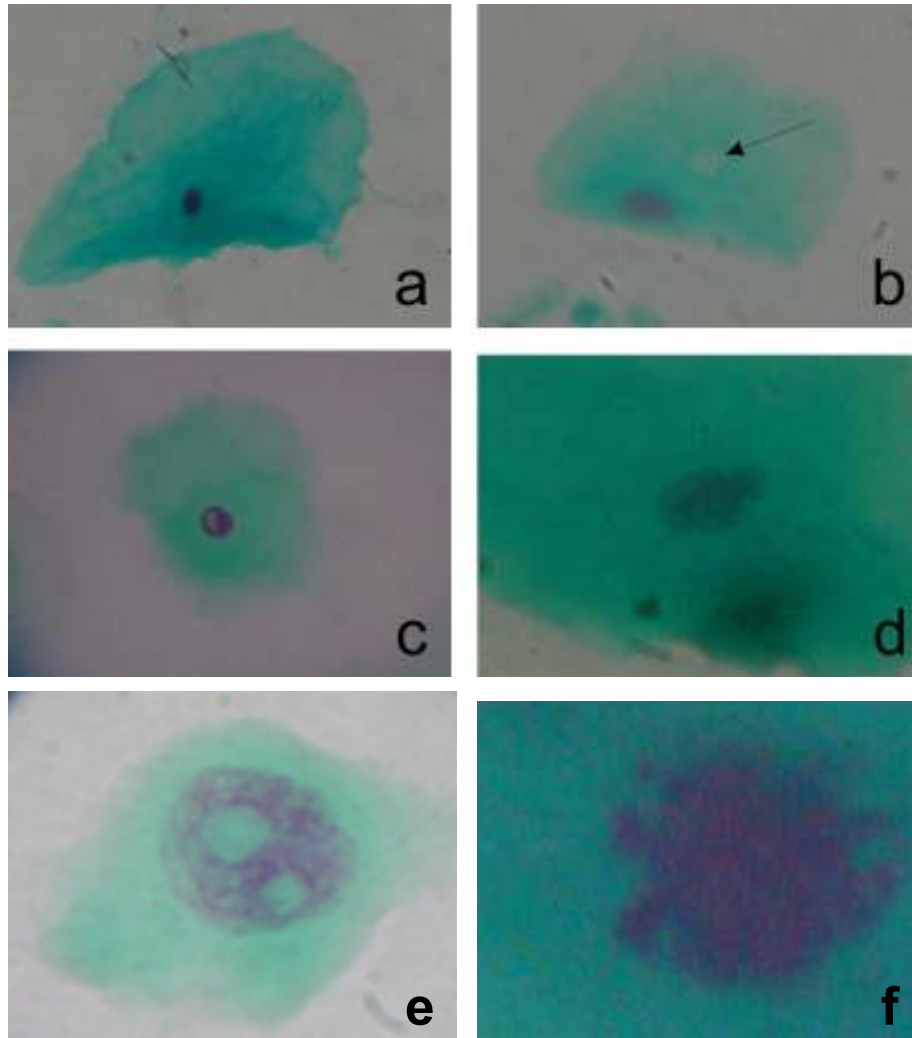
Distribuição de alteração do tipo Vacúolos Nucleares



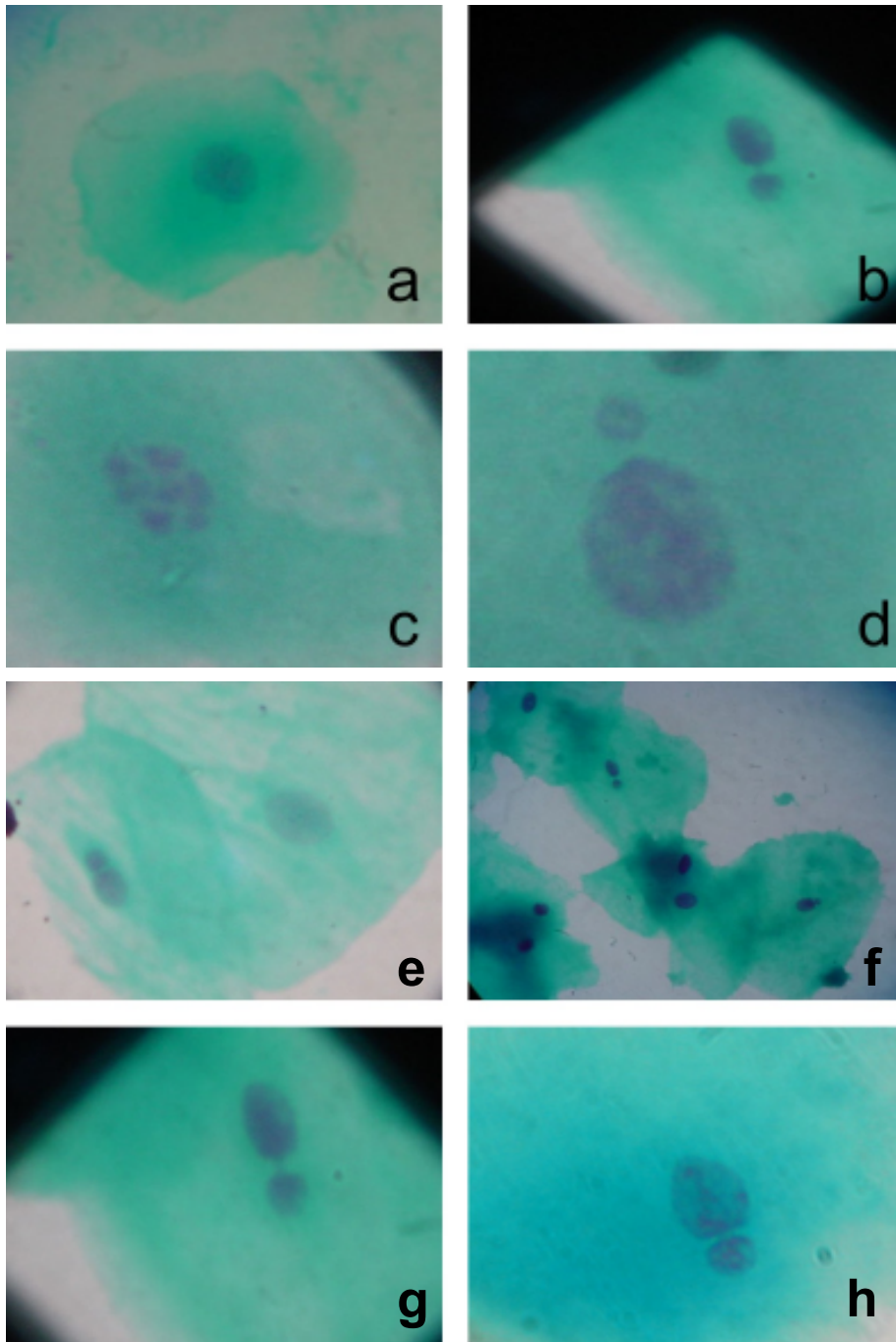
ANEXO XI Apresentação em congresso



Pranchas



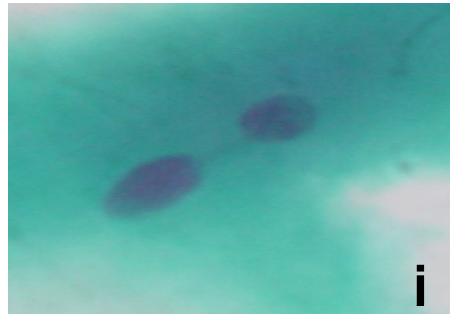
a- Picnose b- Cariólise c- Cromatina condensada d- falso MN e- Vacúolos nucleares f- Núcleo de célula neoplásica



a- Binucleação b- *Broken-eggs* c- Cariorréxis d- Micronúcleo e, f, g, h- *Broken-eggs*



i- Alteração nuclear desconhecida



j- Núcleos interligados