

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

ALESSANDRA DUTRA DA SILVA

**Análise do padrão de maturação, atividade proliferativa e expressão
imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e involucrina na
mucosa bucal exposta a carcinógenos, com leucoplasia e câncer bucal**

PORTO ALEGRE
2016

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

ALESSANDRA DUTRA DA SILVA

**Análise do padrão de maturação, atividade proliferativa e expressão
imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e involucrina na
mucosa bucal exposta a carcinógenos, com leucoplasia e câncer bucal**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como parte dos requisitos para obtenção de
título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Dutra da Silva, Alessandra

Análise do padrão de maturação, atividade proliferativa e expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e involucrina na mucosa bucal exposta a carcinógenos, com leucoplasia e câncer bucal / Alessandra Dutra da Silva. -- 2016. 88 f.

Orientadora: Pantelis Varvaki Rados.
Coorientadora: Fernanda Visioli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Patologia Bucal. I. Varvaki Rados, Pantelis , orient. II. Visioli, Fernanda, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Não tenho palavras para descrever este momento, foram quatro anos muito intensos de grande aprendizado pessoal e profissional.

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar saúde, força e coragem para enfrentar todos os obstáculos que passaram no meu caminho, sabedoria e persistência para não desistir.

Agradeço a minha família: meus pais Tânia Maria Dutra da Silva e José Carlos Pinheiro da Silva pelo apoio, amor e motivação, sempre acreditando no meu potencial e me incentivando a seguir em frente. Vocês são minhas referências, amo muito vocês!!

Aos meus irmãos: Viviane Dutra da Silva que esteve presente em vários momentos me incentivando e muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma, muito obrigada!! Ao meu irmão José Carlos Pinheiro da Silva Jr. e minha cunhada Bruna de Zorzi, pelas palavras de incentivo e amor, me motivando sempre. Amo todos vocês!!!

Ao meu noivo Sady Junior Bramatti, que me aguentou todos estes anos e nunca duvidou do meu potencial, me dando apoio e força nos momentos mais difíceis e comemorando as minhas vitórias, sempre presente, Muito obrigada!! Te amo muito!!

Ao meu orientador Professor Pantelis Varvaki Rados pela paciência e muitos ensinamentos pessoais e acadêmicos e pelas oportunidades concedidas para crescimento profissional por ter me acolhido e apesar das broncas, sempre estar presente. Obrigada pela experiência única e inesquecível!!

Um agradecimento especial a Professora Fernanda Visioli que é um pessoa maravilhosa, sempre presente com muita paciência, dedicação, apoio, sempre pronta para me ajudar e me ensinar. És um exemplo de ser humano e profissional muito competente, que pretendo seguir sempre. Muito obrigada por tudo!!

Ás técnicas Chris Krebs e Alessandra Magnusson, não só como colegas mas como amigas verdadeiras, colaboraram muito não só para minha pesquisa, e também para minha formação como Patologista, sempre com muita paciência e acreditando no meu potencial sem vocês eu não conseguiria!! Agradeço também ao técnico Pedro pela paciência e disposição sempre pronto a ajudar.

Á Nátalia Koerich (Nati) uma grande amiga verdadeira, conselheira, parceira de todos os momentos, dividimos muitas angústias e muitas alegrias. Vou sentir muitas saudades!! Sempre irás morar no meu coração!! Muito obrigada por tudo!!

Ás mais do que colegas e sim amigas verdadeiras que tive a honra de conhecer, Vivi Palmeira, Nátalia Daroit e Bruna que sempre me deram muito amor , carinho e apoio e acreditaram em mim me dando força nos momentos mais difíceis e compartilhando muitos ensinamentos de vida. Amo muito vocês!!

Á todos os patológicos alguns que já iniciaram suas carreiras como Thaise Nóbrega, Grasi, Artur e todos os outros da Patologia, vocês são inesquecíveis, muito obrigada por tornarem esta jornada muito mais leve, por todos ensinamentos e aprendizados compartilhados, sem falar na nossas comilanças patológicas, vou sentir saudades!! Adoro todos vocês!!

Á todos Professoras da Patologia : Manoela, Vinícius, Laura, Marco, Márcia e Manoel e aos professores da Histologia Marcelo Lamers, Anna Fossati e Lisiane pelo grandes ensinamentos ao longo desta jornada, sem dúvida contribuíram muito para minha formação e sempre serão uma referência de docentes e pesquisadores.

Às Professoras, Celina e Janete Almeida que me receberam de braços abertos na UNESP/ São José dos Campos, para treinamento de parte desta pesquisa, sempre muita receptivas e prestativas contribuindo muito para execução desta pesquisa.

Aos alunos de Iniciação científica: Leonardo B. que colaborou muito com minha pesquisa, muito dedicado. A aluna Fernanda Brochier que me ajudou muito neste trabalho, sempre disposta e pronta para me auxiliar, dedicada e muito competente.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade, estrutura e apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento do presente projeto.

“Determinação, coragem e auto confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

O câncer bucal é considerado um problema de saúde pública, devido a sua alta taxa de mortalidade e baixa sobrevida associada ao diagnóstico tardio. O desenvolvimento desta neoplasia é caracterizado por alterações celulares subclínicas e pode ser precedido por uma lesão potencialmente maligna. Estudos de citopatologia já tem mostrado indicadores capazes de detectar alterações celulares iniciais em indivíduos de risco. O desafio atual é a busca de metodologias e biomarcadores que detectem essas alterações precocemente, para prevenção do câncer bucal. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de maturação, proliferação epitelial e correlação com a expressão imunocitoquímica de marcadores de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (involucrina), assim como, realizar a correlação dos achados imunocitoquímicos e imunoistoquímicos com os anticorpos descritos nos grupos com lesão. Para tal foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos, divididos em 4 grupos: controle (n=33), álcool-fumo (n=31), leucoplasia (n=31) e grupo carcinoma espinocelular (n=22). Foi realizado o raspado citológico em todos grupos amostrais e realização das técnicas AgNOR, papanicolau e imunocitoquímica. Para os grupos com lesão foi realizada também a biópsia para confirmação do diagnóstico e realização da técnica imunoistoquímica. No grupo álcool-fumo e no grupo leucoplasia observamos alteração no padrão de descamação com aumento de escamas anucleadas ($p < 0,05$) e maior percentual de células intermediárias nos grupos sem lesão do que no grupo leucoplasia ($p < 0,05$). Quando avaliamos a correlação destes achados com a marcação positiva de E-caderina observou-se um menor número de escamas anucleadas e de células intermediárias no grupo leucoplasia ($p < 0,05$). A velocidade de proliferação celular foi maior no grupo carcinoma do que no grupo controle ($p < 0,05$) e no grupo álcool-fumo do que no grupo leucoplasia ($p < 0,05$). Ademais, foi observado um aumento dos padrões de proliferação celular quando há marcação positiva da E-caderina no grupo álcool-fumo e no grupo leucoplasia. Além disso, não foi observada correlação entre a expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e Involucrina. Conclui-se que a citopatologia bucal associada a técnicas quantitativas como Papanicolau, AgNOR e imunocitoquímica pode auxiliar na detecção de alterações celulares que estão associadas à carcinogênese bucal.

Palavras chaves: carcinoma de células escamosas; leucoplasia; citologia; teste Papanicolau; AgNOR; imunoistoquímica; E-caderina; Involucrina

ABSTRACT

The oral cancer is considered a public health problem because of its high mortality rate and low survival rate associated with late diagnosis. The development of malignancy is characterized by cellular abnormalities subclinical and may be preceded by a potentially malignant lesion. Cytopathology studies have shown indicators to detect early cell changes in risk individuals. The current challenge is the search for methods and biomarkers that detect these changes early, for the prevention of oral cancer. The objective of this study was to evaluate the maturation pattern, epithelial proliferation and correlation with immunocytochemistry expression of adhesion markers (E-cadherin) and differentiation (involucrin) as well as perform the correlation of immunocytochemical and immunohistochemical findings with the antibodies described in groups with injury. For this was performed cytopathologic collection of individuals, divided into 4 groups: control group (n = 33), alcohol-tobacco group (n = 31), leukoplakia (n = 31) and squamous cell carcinoma group (n = 22). It was performed oral smear in all sample groups and carrying out of AgNOR techniques, Pap smear and immunocytochemistry. For groups of injury was also a biopsy to confirm the diagnosis and by the immunohistochemical technique. In the tobacco-alcohol group and leukoplakia group observed change in maturation pattern with increased anucleate cells ($p < 0.05$) and increased percentage of intermediate cells in without injury group than leukoplakia group ($p < 0.05$). When evaluate the correlation these findings with positive staining of E-cadherin was observed a small number of intermediate and anucleated cells in the leukoplakia group ($p < 0.05$). The proliferative activity of squamous cell carcinoma group were higher than in the control group ($p < 0.05$) and alcohol-tobacco group than leukoplakia group ($p < 0.05$). Furthermore, it was observed an increase in cell proliferation patterns when no positive staining of E-cadherin in the tobacco-alcohol group leukoplakia group. No correlation was observed between the immunocytochemical and immunohistochemical expression of E-cadherin and involucrin. We conclude that oral cytopathology associated with quantitative techniques such as Pap smears, AgNOR and immunocytochemistry aid in the detection of cellular changes that may be associated with oral carcinogenesis.

Key words: squamous cell carcinoma; leukoplakia; cytology; Pap test; AgNOR; immunohistochemistry; E-cadherin; Involucrin

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA -----	10
1.1 Epidemiologia do câncer bucal -----	10
1.2 Fatores de Risco -----	11
1.3 Etiopatogênese do câncer -----	12
1.4 Desordens potencialmente malignas -----	13
1.5 Citopatologia-----	16
1.6 E-caderina -----	19
1.7 Involucrina -----	21
2. OBJETIVOS -----	31
2.1 OBJETIVOS GERAIS -----	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	32
3. ARTIGOS CIENTIFICOS -----	32
3.1 ARTIGO 1 -----	32
3.2 ARTIGO 2 -----	33
3.3 ARTIGO 3 -----	58
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	78
5. REFERÊNCIAS -----	80
6.ANEXOS-----	82

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 Epidemiologia do câncer bucal

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial, porque afeta 20 milhões de pessoas no mundo e é considerado a 2º causa de morte (190 mil casos por ano). No Brasil há aproximadamente 600 mil novos casos por ano e 60% destes casos tem seu diagnóstico estabelecido em estágio avançado (INCA et al., 2016). Assim, torna-se cada vez mais importante políticas públicas como adoção de medidas preventivas eficazes e para o tratamento desta doença.

O carcinoma espinocelular bucal corresponde a 90% das neoplasias malignas da boca e considerando o carcinoma de cabeça e pescoço ocupa a sexta posição entre as neoplasias malignas mais prevalentes na população mundial (WARNAKULASURIYA 2009; BAYLE, LEVIN, 2008; JOHNSON et al., 2005). Segundo dados do Globocan 2012, estimou-se para o ano de 2015, 10.439 novos casos de câncer de cavidade bucal e lábio, sendo 7.534 casos em homens e 3.856 casos em mulheres, e o número estimado de mortes anual foi de 3.294 em homens e 1.172 em mulheres. Esta elevada taxa de mortalidade deve-se principalmente pelo diagnóstico tardio desta doença, aliado as baixas taxas de sobrevivência, somente de 50% em cinco anos, o que ressalta a importância de um diagnóstico precoce para o sucesso do tratamento (BONFANTE et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (2005), define o carcinoma espinocelular bucal como uma neoplasia epitelial invasiva com graus

variados de diferenciação e propensão á metástases. Acomete principalmente homens de meia idade com história de consumo de álcool e fumo dose-dependente, entretanto este perfil tem sido alterado nos últimos anos, demonstrando maiores incidências desta doença em pacientes jovens e sem exposição aos fatores de risco (TRAKKER & HUNTER et al., 2011).

1.2 Fatores de Risco

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal estão a exposição ao tabaco e ao álcool (JOHNSON et al., 2005; WARD, 2007).

O fumo é considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal, uma vez que o tabaco apresenta mais de 60 substâncias carcinogênicas derivadas da sua combustão, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e aminas aromáticas (HECHT et al., 2003). A combustão do tabaco gera estresse oxidativo nos tecidos, proporcionando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de resposta antioxidante. Nestas situações, espécies reativas de oxigênio podem interagir e danificar proteínas, lipídios, carboidratos e, o próprio DNA, resultando em eventos iniciadores da carcinogênese (JOHNSON et al., 2011).

O papel do álcool como agente isolado e os mecanismos envolvidos nos danos provocados por ele são parcialmente compreendidos (OGDEN et al., 1998; OGDEN et al., 1999). Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando

a penetração de carcinógenos. Além disso, o álcool é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (SQUIER et al., 1991; HSU et al., 1991; SZABO 1999; HOWIE et al., 2001; CARRARD et al., 2008). A exposição do fumo associada ao álcool pode aumentar em até 50 vezes o risco para desenvolvimento do carcinoma espinocelular, quando comparamos com indivíduos que nunca beberam ou fumaram (CASTELLSAGUE et al., 2004).

1.3 Etiopatogênese do câncer

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, com alterações progressivas sobre o genoma celular, o dano genético causado pela exposição a diferentes agentes mutagênicos pode causar o comprometimento de diversos processos regulatórios celulares, resultando em aumento da proliferação, inibição de processos apoptóticos e potencial para a invasão de tecidos adjacentes (HANAHAN, WEINBERG, 2010).

O acúmulo de alterações genéticas antecede a transformação maligna na carcinogênese. A busca de biomarcadores que detectem o campo de cancerização antes de alterações morfológicas pré-malignas, é de grande interesse biológico e relevância clínica para prevenção do carcinoma espinocelular bucal. Os biomarcadores podem ser um instrumento valioso para o diagnóstico e prognóstico, e um elemento de persuasão no manejo de

indivíduos de risco (GIRORD et al.,1998, LOPEZ-BLANC et al.,2009). O desenvolvimento do câncer bucal muitas vezes é precedido por alterações morfológicas que podem ser observadas em lesões potencialmente malignas.

1.4 Lesões potencialmente malignas

As lesões potencialmente malignas são caracterizadas por um tecido alterado, onde o câncer ocorre mais frequentemente em comparação a sua contraparte normal (WARNAKULASURIYA et al., 2007). Considerando a mucosa bucal, a leucoplasia é a mais comum, se apresentando como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra patologia (BARNES et al., 2005). A sua prevalência pode variar dependendo do país de origem, da natureza da população e padrão dos hábitos de tabaco no país. (NAPIER et al., 2008)

De acordo com Warnakulasuriya et al. (2007), sugere-se uma nova definição para leucoplasia como uma placa branca de risco questionável, que deve ser excluída de outras doenças ou desordens que não apresentem risco aumentado para desenvolver o câncer.

A leucoplasia acomete com maior frequência homens, acima de 50 anos de idade, mas a proporção entre os sexos pode variar de acordo com os hábitos da população em relação os fatores de risco. A sua etiologia permanece incerta, mas há uma forte relação com consumo de tabaco e álcool (AMAGASA et al., 2011).

O diagnóstico clínico desta lesão é de exclusão, ela pode apresentar diferentes alterações morfológicas correspondentes aos distúrbios de proliferação e maturação epitelial observados pelo exame histopatológico como hiperplasia epitelial, hiperkeratose (hiperortoceratose ou hiperparaceratose), acantose e displasia epitelial (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

A displasia epitelial, representa o padrão ouro para avaliação do risco de malignização das leucoplasias, segundo Kramer *et al.* (1978), é caracterizada histologicamente por alterações arquiteturais (estratificação epitelial irregular, duplicação da camada basal, aumento do número de figuras de mitoses; projeções epiteliais em forma de gota; perda da polaridade das células da camada basal, pérolas de ceratina e ceratinização individual) e alterações citológicas (aumento da proporção núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular, nucleólos evidentes e hiperchromatismo nuclear).

Como não há uma maneira segura de prever qual leucoplasia apresenta ou não displasia epitelial, a biópsia é necessária, a fim de detectar as alterações histopatológicas o mais precocemente possível (BARNES et al., 2005). Histologicamente, é importante a distinção entre leucoplasias displásicas e não displásicas, uma vez que alguns estudos relatam a associação da displasia epitelial com a transformação maligna das leucoplasias, apesar disso, lesões não-displásicas também podem sofrer malignização. Hildebrand et al., (2010), observou que alterações morfológicas não-displásicas como acantose podem apresentar potencial proliferativo similar ao encontrado na displasia epitelial.

Van der Wall et al., 2009, relatou alguns fatores que podem estar relacionados a malignização das leucoplasias como: lesões de longa duração, sexo feminino, região de assoalho bucal e borda de língua, lesões não-homogêneas, pacientes não-fumantes e presença de displasia epitelial.

Os critérios histológicos da presença ou não de displasia apresentam uma grande variabilidade intra e inter-observador entre patologistas na avaliação da presença e grau desta alteração. Estima-se que a taxa anual de transformação maligna das leucoplasias seja de 1% (VAN DER WAAL, 2009, VAN DER WAAL, 2010).

Embora nem todos os carcinomas espinocelulares bucais sejam precedidos por desordens potencialmente malignas, e de não podermos prever o risco de malignização das leucoplasias, a presença de tais lesões na mucosa bucal são uma alerta para pacientes e profissionais de saúde. Além disso, deve-se reforçar a ação de medidas preventivas, como campanhas sobre o abandono do fumo e outras substâncias carcinogênicas a nível populacional (EPSTEIN et al., 2002).

Cada vez mais busca-se a detecção de indivíduos de risco, o mais precocemente possível, estudos de citopatologia tem avaliado a mucosa bucal clinicamente normal exposta a fatores de risco como fumo e álcool, e tem demonstrado que é possível detectar alterações iniciais do processo da carcinogênese. (PAIVA et al, 2004). Este aspecto será retomado no decorrer desta revisão de literatura, como uma consideração importante para esta pesquisa.

1.5 Citopatologia

A citopatologia é um método de análise de células esfoliadas, que tem seu uso bem consagrado na população para prevenção e controle do câncer ginecológico (BANOCZY, 1976).

Estudos tem utilizado esta técnica em esfregaços da mucosa bucal, uma vez que é um método não invasivo, barato e de fácil execução e que tem se mostrado efetivo para realizar o rastreamento ou monitoramento dos indivíduos sem lesão visível clinicamente e com lesões potencialmente malignas, demonstrando que a citopatologia pode ser utilizada como uma medida benéfica para prevenção do câncer bucal. Esta técnica tem emprego limitado como ferramenta de diagnóstico, devido a sua baixa especificidade e sensibilidade e obtenção de altos índices de falso-negativos e falso-positivos (OGDEN et al., 1992; CANÇADO et al., 2001; HAYAMA et al., 2005; MEHROTRA, 2010).

A quantificação do tipo celular nos esfregaços da mucosa bucal pela técnica papanicolau é um dos métodos utilizados em associação a citopatologia e permite avaliar o processo de maturação epitelial. Orellana-Bustos et al. (2004) observaram um maior percentual de escamas anucleadas em esfregaços de mucosa bucal de pacientes fumantes quando comparado aos não fumantes, demonstrando que o fumo pode produzir alterações no padrão de maturação da mucosa bucal.

Burzloff et al. (2007) observou diferentes padrões de maturação em células da mucosa bucal expostas a carcinógenos como fumo e álcool, com

leucoplasias e carcinoma espinocelular. Os resultados mostraram um aumento das células das camadas mais profundas do epitélio e isto foi associado à severidade dos achados histológicos. Leucoplasias com displasia epitelial apresentaram maior número de células intermediárias e parabasais do que leucoplasias sem displasia, e a proporção destes tipos celulares foi ainda maior nos carcinomas espinocelulares bucais.

Estudos realizados por nosso grupo, tem utilizado técnicas quantitativas associadas à citopatologia como a técnica de AgNOR para análise da velocidade de proliferação celular das células da mucosa bucal normal exposta a carcinógenos. (CANÇADO et al., 2001, PAIVA et al., 2004, CANÇADO et al., 2004, GEDOZ et al., 2007)

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são unidades funcionais, que compõem parte do nucléolo, e realizam a síntese de RNA ribossômico. As NORs quando presentes no núcleo representam um parâmetro de avaliação da velocidade de proliferação celular. Sua quantificação ocorre quando estas estão ativas e são impregnadas pela prata, denominadas AgNORs, identificadas como pontos pretos dentro do núcleo de contornos bem definidos, observados em microscopia óptica (DERENZINI et al., 2003, SCHWARTZ et al., 2003).

Estudos transversais utilizando a técnica histoquímica de AgNOR tem mostrado um aumento na atividade proliferativa na mucosa bucal morfológicamente normal de pacientes expostos ao fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle. (PAIVA et al., 2004)

Cançado et al. (2004) mostraram uma correlação significativa entre número de cigarro fumados por dia e aumento na média de AgNORs na mucosa bucal de fumantes principalmente no sitio de assoalho de boca quando comparado a borda de língua.

Outro estudo, que avaliou a velocidade de proliferação celular utilizando dois parâmetros média de AgNOR/núcleo e percentual AgNOR com mais de 1, 2, 3 e 4 AgNOR/núcleo em mucosa normal, displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares bucais demonstrou que ambos parâmetros avaliados permitem diferenciar os 3 grupos, nas mucosas normais a maioria dos núcleos apresentavam um ou dois AgNORs, enquanto que em carcinomas espinocelulares, a maioria apresentavam mais de 4 AgNORs/ núcleo (XIE et al., 1997).

Em concordância com estes estudos, Gedoz et al. (2007), por meio de um estudo longitudinal de acompanhamento de 24 meses utilizando a técnica AgNOR associada a citopatologia em indivíduos de risco, comprovou o aumento na média de AgNOR e pAgNOR>3 nas células da mucosa bucal de indivíduos expostos somente ao fumo e ao fumo e álcool ao longo do tempo. Demonstrando que nestes grupos de pacientes a citopatologia pode ser utilizada para realizar o monitoramento individual.

Assim, a citopatologia tem se mostrado uma ferramenta de rastreamento promissora, para a avaliação de alterações subclínicas prévias ao desenvolvimento de lesões potencialmente malignas e câncer bucal. Entretanto para proporcionar um melhor entendimento do potencial de

malignização de cada indivíduo, técnicas complementares como a imunohistoquímica associadas a citopatologia poderiam melhorar a efetividade deste processo de rastreamento. Este constitui um dos principais objetivos deste estudo, conforme será descrito logo a seguir.

A imunohistoquímica permite através de marcadores proteicos uma análise das alterações celulares que podem atuar como preditoras da transformação maligna ou podem estar associadas ao prognóstico nos carcinomas como proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, diferenciação, adesão, angiogênese e invasão tumoral. (OGMUNDSDÓTTIR ET AL., 2009).

1.6 E-caderina

As caderinas são uma família de glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio que medeiam a adesão celular. Estas moléculas podem ser classificadas em E-caderina (epiderme), N-caderina (tecidos derivados do neuroectoderma e mesoderma) e P-caderina (placenta, epitélio pulmonar, células basais da epiderme, células mioepiteliais). Dentre estas, a E-caderina tem sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas (OKEGAWA et al., 2002; TADA et al., 1996; FURUKAWA et al 1997).

A E-caderina são proteínas que medeiam a adesão intercelular da epiderme por meio do complexo caderina-catenina, as cateninas ligam-se as caderinas a uma rede de filamentos de actina e outras proteínas transmembrana e citoplasmáticas. Ela é responsável pela ativação de sinais relacionados a estruturação e arquitetura do citoesqueleto, além da

polarização dos ceratinócitos no processo de estratificação da epiderme (TADA et al., 1996; FURUKAWA et al., 1997; HINES et al., 1999).

Alterações na expressão da E-caderina tem sido associadas com comportamento agressivo, invasão e pobre prognóstico do câncer (SRIDEVI et al, 2015).

Durante a carcinogênese ocorre o rompimento do contato célula-célula e este pode ser um evento chave na progressão tumoral. Sridevi et al. (2015) estudaram a marcação da E-caderina no epitélio normal, displásico e carcinoma espinocelular bucal e observaram uma perda gradual da sua imunexpressão durante os estágios de malignização, demonstrando que ela esta associada a progressão tumoral.

Yogesh et al. (2011), avaliaram em seu estudo a expressão da E-caderina de acordo a severidade da displasia epitelal e observaram a correlação dos achados histopatológicos da displasia como: perda da adesão celular, presença mitoses, e hipercromatismo nuclear estão relacionados com a menor imunomarcção da E-caderina.

Estudo recente, mostrou diferenças na expressão da E-caderina quando comparada a mucosa normal com leucoplasia de baixo e alto risco e carcinoma espinocelular com presença de metastáse e notaram uma redução significativa na imunexpressão da E-caderina nos carcinomas espinocelulares e leucoplasias de alto risco quando comparadas as de baixo risco, demonstrando que esta molécula pode ser utilizada como um biomarcador para identificar lesões com potencial de malignização (VON

ZEIDLER et al., 2014).

Além disso, estudos atuais tem demonstrado que a expressão da E-caderina pode estar relacionada com prognóstico dos carcinomas. Zhao et al. (2012) avaliou a imunexpressão da E-caderina como fator prognóstico do carcinoma de cabeça e pescoço por meio de uma revisão sistemática e metanálise e demonstrou que a menor expressão da E-caderina esta associada com pobre prognóstico dos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.

Em concordância com os achados descritos acima, estudos tem demonstrado que a redução significativa da imunexpressão da E-caderina está relacionada a baixa sobrevida dos pacientes, assim como presença de metástases em linfonodos e estágios mais avançados dos carcinomas espinocelulares bucais (ZHOU et al., 2015, LUO et al., 2014).

1.6 Involucrina

A involucrina, vem do latim” *involucre* “ (envoltório, membrana que envolve), é considerada um dos componentes do envelope ceratinizado, estrutura que se forma sob a membrana plasmática do estrato ceratinizado durante a diferenciação terminal dos ceratinócitos e tem o papel de promover uma barreira física na epiderme, no controle da perda de água. (SMACK et al., 1994).

Ela é uma proteína sintetizada no compartimento suprabasal da epiderme encontrada em abundância no citoplasma dos ceratinócitos. É

considerada um marcador precoce da diferenciação terminal (WATT,1983). Apresenta estrutura alfa-helicoidal e realiza ligações cruzadas mediadas pela transglutaminase com diversas outras proteínas estruturais, demonstrando que a involucrina é um componente precoce do envelope ceratinizado, que pode promover um arcabouço onde outras proteínas se ligam. A expressão da involucrina é regulada por uma variedade de agentes incluindo cálcio (BIKLE et al. 2001) vitamina A, (POUMAY et al., 1999) proteína cinase C e antioxidantes que regulam a diferenciação dos ceratinócitos. (BALASUBRAMANIAN et al., 2002).

Escassos estudos, tem avaliado o papel da involucrina no processo de carcinogênese. Gilchrist et al. (2015) analisou a imunexpressão da involucrina na mucosa bucal exposta ao fumo (fumo de rapé), leucoplasia e mucosa normal e constataram que a imunomarcagem da involucrina foi menor na displasia epitelial, do que na mucosa exposta ao fumo de rapé e mucosa normal, sugerindo que a involucrina pode ser um indicador para a precoce do câncer bucal em pacientes com leucoplasia.

Outro estudo, o qual avaliou a marcação imunoistoquímica da citoqueratina 10,11 e involucrina durante os diferentes estágios da progressão tumoral, notou uma alta expressão de ambas moléculas na mucosa bucal não-displásica com hiperplasia epitelial quando comparada a displasia epitelial e carcinoma espinocelular bucal. Além disso, os diferentes graus de displasia apresentavam correlação inversa com a expressão de ambas moléculas (KANNAN et al., 1994).

Diante do que foi exposto, observamos que apesar de estudos já avaliarem a imunexpressão destes marcadores de adesão e diferenciação celular na carcinogênese, não há estudos que analisaram a expressão destas moléculas em mucosa ainda clinicamente normal, exposta aos carcinógenos como fumo e álcool, por meio da citopatologia da mucosa bucal.

Apesar de não podermos prever o risco de malignização dos indivíduos de risco, estudos de citopatologia já tem mostrado alguns indicadores capazes de detectar alterações precoces como alterações na proliferação celular e maturação epitelial, porém são necessários novas metodologias associadas a citopatologia que possam identificar biomarcadores com possibilidade de utilização em nível populacional e que venham a contribuir na sinalização de indivíduos com maior risco (exposto aos carcinógenos e com leucoplasia) ao desenvolvimento de câncer bucal.

Referências

AMAGASA T, YAMASHIRO M, UZAWA N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol*, v.16, p.5-14, 2011

BALASUBRAMANIAN, S.; EFIMOVA, T.; ECKERT R.L. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 2002, n. 277, p.1828-36, 2002.

BANÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. *Commun Dent Oral Epidemiol*, v. 19, n. 5, p. 265-267, 1991.

BARNES, L., EVESON, J.W., REICHAR, P. et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press, p. 177-179, 2005.

BAYLE, P., LEVIN, B., World Cancer Report 2008. Lyon: IARC, p. 330-7, 2008.

BIKLE, D.D., TU, C.L, et al. Calcium and vitamin D regulated keratinocyte differentiation. Mol Cell Endocrinol. n.177, p.161-71, 2001

BONFANTE GM, MACHADO CJ, SOUZA PE. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. Cad. Saúde Pública v.30 n.5, p.1-14, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em 06/01/2016.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. Cytopathology, v. 18, n. 6, p. 367-375, 2007.

CANÇADO, R.P., YURGEL, L.S, FILHO, M.S., Comparative analyses between the smoking habit frequency and nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers normal buccal mucosa. Tabacco induced Diseases v.2, n. 1, p. 43-49, 2004.

CANÇADO, R.P, YURGEL, L.S, FILHO, M.S., Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral oncology. n.37, v.5, p.446-54, 2001.

CARRARD, V.C., PIRES, A.S., PAIVA, R.L., CHAVES, A.C.M., SANT'ANA FILHO, M. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. Rev Bras Cancerologia, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.

CASTELLSAGUE, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer, v. 108, p. 741–749, 2004.

DERENZINI, M. The AgNORs. Micron. v.31, n.2, p.117-20, 2003.

EPSTEIN, J.B, ZHANG. L, ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. J Can Dent Assoc, v.68, n.10, p.617-21, 2002.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M et al. GLOBOCAN 2012 version 1.0. Cancer Incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base n.11. Lyon France: IARC, 2014. Available at: <http://www.eco.iarc.fr> Acesso em 06/01/2016.

FURUKAWA, F., FUJI, K., HORIGUCHI, Y., MATSUYOSHI, N., FUJITA, M., TODA, K.I, IMAMURA, S., WAKITA, H., SHIRAHAMA, S., TAKIGAWA, M. Roles of E-cadherin and P-cadherin in human skin. Microsc Res Tech. N.35, v.4, p. 343-52, 1997.

GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. Anal Quant Cytol Histol, v. 29, n. 4, p. 231-238, 2007.

GILCHRIST, J.M, THOMPSON, G.C, MEDINA, J.E. Markers of keratinocyte differentiation in snuff-induced leukoplakia. The American J of Surg. n.164, p.563-566, 1992.

GIROD, S.C, PFEIFFER, P., RIES, J., PAPE, HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. The Brit j of Oral & Maxillof. Surg. n.36, v.4, p.252-60, 1998.

GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence worldwilde 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em 07/01/2016.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v.144, n. 4, p. 646-74, 2011.

HAYAMA FH, MOTTA ACF, SILVA APG, MIGLIARI DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology ;specimem adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. Oral Med and Pathol, v. 10, p. 115-122, 2005.

HECHT SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nature reviews Cancer. v.3, n.10, p.733-44, 2003.

HILDEBRAND LC, CARRARD VC, LAUXEN IS et al. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. Med Oral Patol Oral Cir Bucal , n.15, v.2, p:328-34, 2010.

HINES, M.D., JIN, H.C., WHEELOCK, M.J., JENSEN,P.J. Inhibition of cadherin function differentially affects markers of terminal differentiation in cultured human keratinocytes. J Cell Science. n.112, v.24, p.4569-79.

HOWIE, N.M., TRIGKAS, T.K., CHRUCHLEY, A.T., Wertz, P.W., SQUIER C.A., WILLIAMS, D.M., Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. Oral Dis, v.7,n. 6, p.349-354, 2001.

HSU, T.C., FURLONG, C. The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract. inhibition of DNA repair. Anticancer Res, v.11, n.6, p.1995- 998,1991.

JOHNSON, N., FANCESCHI, S., FERLAY, J., RAMADAS, K. et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics Head and Neck Tumors: World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC press. p. 168-75, 2005.

JOHNSON, N.W, JAYASEKARA, P., AMARASINGHE, A.A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontology 2000. n.57, v.1,p.19-37, 2011.

KANNANS, BALARAM, P, CHANDRAN, G.J., PILLAI M.R., MATHEW, B., NALINAKUMARI, K.R., NAIR, M.K. Alterations in expression of terminal differentiation markers of keratinocytes during oral carcinogenesis. Pathobiol. n.62, v.3, p.127-33, 1994.

KRAMER, R.H., LUCAS, R.B., PINDBORG, J.J. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. WHO. Oral Surg, v. 46, n. 4, p. 518-39, 1978.

LOPEZ-BLANC, S.A, COLLET, A.M, GANDOLFO, M.S., et al. Nucleolar organizer regions (AgNOR) and subepithelial vascularization as field cancerization markers in oral mucosa biopsies of alcoholic and smoking patients. Oral surgery, oral medicine, Oral Pathol, Oral Radiol, and Endodont. n.108, v.5, p.747-53, 2009.

LUO, S.L, XIE, Y.G., LI, Z., MA J.H., E-cadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta- analysis. Tumor Biol. v.35, p.5533-5537, 2014.

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

MEHROTRA, R. The role of cytology in Oral Lesions: A review of recent improvement . Diagn. Cytopathol, p. 1-5, 2010.

OGDEN, G.R, COWPE, J.G, GREEN, M. Cytobrush and wooden spatula for

oral exfoliative cytology. *Acta Cytol*, v. 36, p. 706-710, 1992.

OGDEN, G.R., WIGHT, A.J. A etiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.

OGDEN, G.R., WIGHT, A.J., RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*, v. 28, n. 5, p. 216- 220, 1999.

OGMUNDSDÓTTIR, H.M, BJÖRNSSON, J., HOLBROOK, W.P. Role of TP53 in the progression of pre-malignant and malignant oral mucosal lesions. A follow-up study of 144 patients. *J Oral Pathol Med*. n.38, p.565-71, 2000

OKEGAWA T, LI Y, PONG RC, HSIEH JY. Cell adhesion proteins as tumors suppressors. *J Urol*. N.167, p.1836-43, 2002.

ORELLANA-BUSTOS, A.I, ESPINOZA-SANTANDER, I.L., FRANCO-MARTÍNEZ, E., LOBOS-JAMES-FREYRE, N., ORTEGA-PINTO, A.V. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal from smokers and non-smokers. *Med Oral*. n.9, p.197-203, 2004.

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

POUMAY, Y, HERPHELIN, F., SMITS, P., et al. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; n.2, p.138-44, 1999.

SCHWARTZ, J.L., MUSCAT, JE., BAKER, V., LARIOS, E., STEPHENSON G.D., GUO, W., et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral oncology*. v.39, n.8, p.842-54, 2003.

SMACK, D.P, KORGE, B.P., JAMES, W.D. Keratin and keratinization. *J Am*

Acad Dermatol. v.30, n.1, p.85-102, 1994

SQUIER, CA. The permeability of oral mucosa. Crit Rev in Oral Biol and Med., v.2, n. 1, p. 13-32, 1991.

SRIDEVI, U., JAIN, A., NAGALAXMI, V., KUMAR, U.V., GOYAL, S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinoma. Europ J of Dent. n.9, p.364- 372, 2015.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. Alcohol, Alcohol v. 34, n. 6, p.830-841, 1999.

TADA, H., HATOKO, M., MURAMATSU, T., SHIRAI, T. Expression of e-cadherin in skin carcinomas. J Dermatol. n.23, v. 2, p.104-10, 1996.

TRAKKER N & HUNTER, K. Tumors of the oral cavity. In: Sloan P. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical presentation. Periodontology. v.57, p.10-19, 2011.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa, terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol, v. 45, p. 317–323, 2009.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concept of management . . Oral Oncol, v. 46, p. 423–425, 2010.

VON ZEIDLER, S.V., BOTELHO TL, MENDONÇA, E.F., BATISTA, A.C. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. BMC Cancer, n.14, p.2-7, 2014.

WARNAKULASURIYA, S., JOHNSON, N.W., VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. v. 36, p. 575–80, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* v. 45, p.309-316, 2009.

WATT, F.M. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* N.136, p.1518-22, 1983.

XIE, X., CLAUSEN, O.P., SUDBO, J., BOYSEN, M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* v.79, n.11, p.2200-8, 1997.

YOGESH, T.L., NARAYAN, T.V., SHEREEDHAR, B., SHASHIDARA, R., LEEKYMOHANTY . The expression E-caherin and cathepsin- D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *Journal of Oral and Maxillof. Pathol.* n.15, p.288-294, 2011.

ZHAO, Z., GE, J., SUN, Y., TIAN,L. et al. Is a E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* n.48, p. 761-767, 2012.

ZHOU, J., TAO, D., XU, Q., GAO, Z., TANG, D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* , n.8, v.3, p.3150-3154, 2015

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar a expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica de proteínas associadas à adesão e diferenciação celular e sua correlação com o padrão de maturação e proliferação celular em indivíduos com mucosa clinicamente normal, exposta a carcinógenos, com leucoplasia e câncer bucal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comprovar a expressividade das moléculas de adesão e diferenciação celular por meio da técnica imunocitoquímica (ARTIGO1).

2. Avaliar o padrão de maturação pela técnica Papanicolau, proliferação celular pela técnica de AgNOR e expressão imunocitoquímica das proteínas de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (Involucrina) em indivíduos com mucosa normal, exposta a fatores de risco (fumo e álcool) e com leucoplasia e câncer bucal (ARTIGO 2).

3. Estabelecer a correlação do padrão de maturação e velocidade de proliferação celular da mucosa bucal com a expressão das proteínas de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (Involucrina) em células esfoliadas da mucosa bucal em indivíduos com a mucosa normal, exposta a fatores de risco (fumo e álcool) e com leucoplasia e câncer bucal (ARTIGO 2).

4. Estabelecer a correlação dos achados imunocitoquímicos com os achados imunoistoquímicos da E-caderina e Involucrina na leucoplasia e câncer bucal (ARTIGO 3).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 ARTIGO CIENTIFICO I

Titulo: Immunocytochemistry associated with oral cytology exfoliative. Methodological analysis. Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology 2015, v.37, n.2; p. 134- 138.

Autores: Alessandra Dutra da Silva, Celina Faig Lima, Bruna Jalfim Maraschin, Natalia Koerich Laureano, Natália Daroit, Fernanda Brochier, Manoel Sant'Ana Filho, Fernanda Visioli, Pantelis Varvaki Rados

3.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Cancer Cytopathology (Online ISSN: 1934-6638)

Análise do padrão de maturação, proliferação celular e correlação da expressão das moléculas de adesão e diferenciação celular na mucosa bucal exposta a carcinógenos, com leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal

RESUMO

O desenvolvimento do câncer bucal é um processo complexo de múltiplas etapas, caracterizado inicialmente por alterações celulares subclínicas a alterações fenotípicas visíveis. O desafio atual é a busca de metodologias e biomarcadores que detectem essas alterações precocemente, para identificarmos os indivíduos de risco. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de maturação e proliferação epitelial e correlação com a expressão imunocitoquímica de marcadores de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (involucrina). Para tal foi realizada a coleta citopatológica de indivíduos, divididos em 4 grupos: controle (GC, n=33), álcool-fumo (GAF, n=31), leucoplasia (GL, n=31) e grupo carcinoma espinocelular (GCE, n=22). Foi realizado o raspado citológico em todos os grupos amostrais e realização das técnicas AgNOR, papanicolau e imunocitoquímica. Observamos aumento de escamas anucleadas no GAF quando comparado ao GC e no GL comparada aos grupos sem lesão ($p < 0,05$). Além disso, notou-se maior percentual de células intermediárias nos grupos sem lesão do que no GL ($p = 0,001$). Quando avaliamos a correlação destes achados com a marcação positiva de E-caderina observou-se um menor número de escamas anucleadas e de células intermediárias ($p < 0,05$). A velocidade de proliferação foi maior no GCE do que no GC ($p < 0,05$) e no GAF do que no GL ($p < 0,05$). Além disso, foi observado um aumento dos padrões de proliferação celular quando há marcação positiva da E-caderina no GAF e GL. Concluímos que a citopatologia associada a técnicas quantitativas como Papanicolau, AgNOR, e expressão imunocitoquímica de E-caderina detecta alterações associadas a carcinogênese bucal.

Palavras-chave: Citologia; teste Papanicolau; AgNOR, E-caderina; Involucrina

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer bucal é considerado um processo complexo de múltiplas etapas. Ele se caracteriza desde alterações celulares subclínicas, as quais inicialmente podem não ser detectáveis clinicamente a alterações celulares visíveis, que ocorrem devido à persistência da ação de agentes carcinógenos¹. Este processo constitui um interessante modelo a ser estudado dos eventos que podem ocorrer na carcinogênese.

Cada vez mais se busca a detecção de indivíduos de risco, o mais precocemente possível e estudos têm utilizado a citopatologia para avaliar a mucosa bucal clinicamente normal exposta a fatores de risco como: fumo e álcool, e têm demonstrado que é possível detectar alterações celulares iniciais do processo da carcinogênese^{2,3,4}. Nosso grupo de pesquisa, tem associado a citopatologia com técnicas como Papanicolau e tem observado alterações no padrão de maturação epitelial nas células da mucosa bucal expostas a fumo e álcool e com leucoplasias⁵.

Outros estudos, os quais utilizaram a associação da citopatologia com a técnica AgNOR, que é uma método de mensuração das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) e representa um parâmetro de avaliação da velocidade de proliferação celular, constataram um aumento da velocidade de proliferação celular da mucosa bucal normal em indivíduos expostos a carcinógenos, fumo e álcool, quando comparada à do grupo controle^{3,4,6}. Atualmente, novas metodologias como a imunocitoquímica

aliada à citologia da mucosa bucal tem se mostrado eficaz para análise das alterações celulares que podem atuar como preditoras da transformação maligna. Moléculas relacionadas à adesão como E-caderina e a diferenciação involucrina, representam uma possibilidade de avaliar o dano celular precocemente^{7,8}.

A E-caderina é uma proteína que medeia a adesão intercelular. Alterações na expressão da E-caderina tem sido associadas com a progressão tumoral^{9,10,11}, Sridevi et al. (2015)¹², estudaram a marcação desta proteína no epitélio normal, displásico e carcinoma espinocelular bucal e observaram uma perda gradual da sua imunexpressão durante os estágios de malignização.

A involucrina é uma proteína sintetizada no compartimento suprabasal da epiderme encontrada nos ceratinócitos. É considerada um marcador precoce da diferenciação terminal⁸. Pesquisas tem mostrado sua expressão alterada durante a carcinogênese bucal. Kannan et al. (1994)¹³ observou uma baixa expressão desta molécula na mucosa bucal com displasia epitelial e carcinoma espinocelular bucal quando comparada às lesões não displásicas.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o padrão de maturação e proliferação da mucosa bucal e sua correlação com a expressão imunocitoquímica da E-caderina e involucrina em indivíduos de risco para o desenvolvimento do câncer bucal (indivíduos expostos ao fumo e ao álcool e com leucoplasia) e compará-los com indivíduos sem lesão e com carcinoma espinocelular bucal .

METODOLOGIA

Amostra

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no Ambulatório de atendimento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no Centro de Especialidades Odontológicas e no setor de Estomatologia do Hospital Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de 2012 a 2014. Todos os indivíduos assinaram um TCLE (Anexo 1) e Aprovação Comitê de Ética da UFRGS. A amostra foi composta por 4 grupos de pacientes descritos abaixo, os pacientes selecionados foram de ambos os sexos e acima de 30 anos, um total de 115 pacientes participaram deste estudo.

(1) Grupo Controle (n=30): constituído por pacientes que não apresentam lesões bucais, e que não são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal. Pacientes que nunca fumaram, ou pararam de fumar há mais de 10 anos, e que bebem, em média, menos de uma dose de bebida alcoólica por dia. Segundo Tezal et al. (2001)¹⁴, 340 ml de cerveja, 113 ml de vinho e 28 ml de destilados contêm a mesma quantidade aproximadamente de etanol.

(2) Grupo Álcool e Fumo (n=31): constituídos por pacientes que não apresentam lesões bucais, mas são expostos aos fatores de risco para o câncer bucal (fumo\álcool). Pacientes que fumam no mínimo 20 cigarros com

filtro por dia, por no mínimo um ano, ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos associado ou não ao consumo de bebida alcoólica. O consumo de bebida alcoólica é caracterizado pela ingestão, em média, de uma dose de bebida por dia segundo o indicado por Tezal et al. (2001)¹⁵, por no mínimo um ano.

(3) Grupo Leucoplasia (GL), (n=31): constituído por pacientes que apresentavam clinicamente leucoplasias bucais, sendo posteriormente confirmados no exame de biópsia e diagnóstico histopatológico.

(4) Grupo Carcinoma Espinocelular (GCE), (n=22): constituído por pacientes que apresentavam clinicamente carcinoma espinocelular bucal primário confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico.

Os critérios de exclusão deste estudo foram: idade inferior a 30 anos, presença de outras lesões bucais clinicamente visíveis, com exceção do carcinoma espinocelular e da leucoplasia. O cálculo amostral foi baseado num nível de significância de 5%, para poder de 90% e com uma diferença esperada em relação a proporção de células intermediárias de 20% entre os grupos (Burzlaff et al. 2007)⁵. Dessa forma a amostra deveria ser constituída de 30 pacientes por grupo.

Após a concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE, foi realizado um questionário com informações pertinentes ao estudo. Foram coletados dados comportamentais e demográficos, seguido do exame físico extra-bucal e intra-bucal, no qual foi avaliado hábitos de higiene bucal e condições dentárias (Anexo 2).

Para análise da exposição ao fumo foi calculado o índice de packyears. O packyear é definido com 20 cigarros fumados todos os dias por ano (<http://smokingpackyears.com/>).

Coleta Citopatológica

Com auxílio de um cytobrush, os pacientes do grupo controle e do grupo álcool/fumo foram submetidos a coleta de células da mucosa bucal para realização de exame citológico nos sítios borda de língua e assoalho bucal, os sítios mais comumente afetados pelo câncer de boca. Os pacientes do grupo 3 e 4 foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal na região onde estava localizada a leucoplasia ou carcinoma espinocelular. O esfregaço citopatológico foi transferido para uma lâmina de vidro fixada em solução de álcool absoluto spray. Previamente à realização dos raspados, todos os pacientes foram orientados a retirar suas próteses removíveis e a bochechar água filtrada durante 1 minuto.

As lâminas foram identificadas com um número de registro para cada paciente, e seguiram para processamento das técnicas de Papanicolaou, AgNOR, e imunocitoquímica.

Técnica para análise Morfológica (Papanicolaou)

A análise morfológica dos esfregaços foi realizada segundo protocolo de Carvalho et al. (2002)¹⁵ pela observação das primeiras 100 células epiteliais distendidas e não sobrepostas, com o auxílio de microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF em aumento de 400x. Os

diferentes tipos celulares foram quantificados em: Célula anucleada, célula superficial com núcleo, célula intermediária, célula parabasal.

Técnica para quantificação das AgNORs

A técnica foi realizada de acordo protocolo descrito por Ploton et al. (1986)¹⁶. No esfregaço citológico submetido à impregnação pela prata, foram capturadas imagens de 50 células, bem distendidas e não sobrepostas, em um microscópio binocular, em aumento 1000x, com óleo de imersão. Foi realizada a contagem das AgNORs segundo critérios estabelecidos por Crocker et al. (1989)¹⁷ e então foi calculada a média de AgNORs/núcleo (mAgNOR). Um segundo parâmetro de avaliação utilizado foi o percentual de células com mais do que 1, 2, 3 e 4 AgNORs/núcleo (pAgNOR), de acordo com metodologia proposta por Xie et al. (1997).¹⁸ A quantificação de AgNORs foi realizada por dois pesquisadores cegos e calibrados. A calibragem intra e inter-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ($\geq 0,75$).

Técnica Imunocitoquímica

A técnica imunocitoquímica foi realizada segundo protocolo da Silva et al. (2015)¹⁹. Inicialmente as células esfoliadas da mucosa bucal foram imersas em álcool absoluto, após foi realizada a permeabilização da membrana com triton X 0,5% em solução PBS (Phosphate buffer saline), seguido por bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 20 volumes e metanol (1:1). Após lâminas foram submetidas ao tratamento para recuperação antigênica com ácido cítrico

monohidratado 10nM em banho maria por 30 minutos. As lavagens entre as etapas foram realizadas com solução tamponada de TRIS. Os anticorpos primários foram incubados overnight a 4°C. Para amplificação da reação foi utilizado Envision (HRP Kit, Dako Corp., Carpinteria, USA) para anticorpo involucrina e Envision Dual Link (HRP Kit, Dako Corp., Carpinteria, USA) para E-caderina, após foi adicionado o cromóforo diaminobenzidina (DAB, DAKO). Posteriormente foi realizada a contracoloração das lâminas com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck).

O controle negativo das reações foi realizado pela abolição do anticorpo primário. O controle positivo utilizado foi amostra de pele para ambos os anticorpos. Os anticorpos utilizados estão especificados no quadro 1.

Quadro 1: Especificações dos anticorpos.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
Involucrina	SY5	Abcam	1:400
E-caderina	24E1	Cell Signaling	1:200

Análise dos dados

Os casos foram examinados em microscópio óptico binocular acoplado a uma câmera digital em um aumento de 400X. Para a E-caderina foram consideradas células positivas que apresentavam marcação na membrana e

para involucrina as células positivas foram as que apresentavam marcação citoplasmática. A análise da expressão imunocitoquímica de ambas moléculas, foi semi-quantitativa por escores: escore 0 = ausência de marcação e escore 1 = marcação positiva.

A análise das lâminas foi realizada por um único examinador cego e calibrado. A calibragem intra-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ($\geq 0,75$).

Análise Estatística

Os dados do presente estudo foram submetidos ao Programa de Computador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), para análise estatística. Foi realizada a análise de distribuição dos dados para escolha dos testes. Generalized Estimated Equations (GEE) e o teste de Bonferroni foi utilizado para comparação entre os grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Um total de 117 pacientes foi incluído no estudo. A média de idade dos grupos controle e álcool-fumo foi menor do que os grupos com lesão e a maioria dos indivíduos foram do sexo feminino, exceto no grupo carcinoma espinocelular. Além disso, foram observadas condições dentárias piores nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal. As características demográficas e comportamentais da amostra estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Dados demográficos e de hábitos dos pacientes incluídos nos grupos nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular para análise do padrão de maturação, proliferação celular e expressão da E-caderina e Involucrina

	Grupo Controle (n=33)	Grupo Álcool/Fumo (n=31)	Grupo Leucoplasia (n=31)	Grupo Carcinoma Espinocelular (n=22)
IDADE (média + DP)	55 (±10,05)	48 (±11,05)	57 (±13,51)	57 (±8,40)
GÊNERO	51,1% F 48,4% M	74,1% F 25,8% M	58,1% F 41,9% M	48,1% F 51,9% M
FREQUÊNCIA DE FUMANTES	-----	100%	64,5%	70,4%
PACKYEARS (média + DP)	-----	24 (±16,4)	27 (±19,1)	51 (±42,6)
CONSUMO DE BEBIDAS ALCÓOLICAS	-----	70,96%	41,9%	77,8%
ESTADO DENTÁRIO				
Pobre	15,1%	32,2%	54,8%	63,6%
Regular	36,3%	41,9%	16,1%	22,7%
Bom	48,4%	25,8%	29 %	13,7%
LOCALIZAÇÃO DA LESÃO	-----	-----	LINGUA -----32,2% ASSOALHO BUCAL----- 19,3% PALATO ----- 19,3% MUCOSA JUGAL -----12,9% FUNDO DE SULCO ----- 3,2% GENGIVA -----3,2%	ASSOALHOBUCAL --- 27,2% LÍNGUA----- 18,1% PALATO ----- 18,1% MUCOSA JUGAL ----- 9,1%

PADRÃO DE MATURAÇÃO

Os dados referentes ao percentual dos diferentes tipos celulares da mucosa bucal observados pela técnica de Papanicolau nos grupos estudados estão descritos nas tabela 2 e 3.

Observou-se um maior percentual de escamas anucleadas no grupo de indivíduos expostos ao álcool-fumo quando comparado ao grupo controle

($p=0,00$), e no grupo leucoplasia quando comparado aos grupos sem lesão no sítio borda de língua (Tabela 2).

O percentual de células intermediárias foi maior nos indivíduos dos grupos sem lesão, no sítio assoalho bucal, do que no grupo leucoplasia ($p=0,001$), (tabela 3).

Além disso, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa do número de células intermediárias no assoalho bucal, quando comparado à borda de língua.

Tabela 2. Distribuição de células escamas anucleadas, superficial com núcleo e intermediárias nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

Grupos	Controle (BL)	Álcool-fumo (BL)	Leucoplasia	Carcinoma Espinocelular	p
	Média(DP)	Média (DP)	Média(DP)	Média/DP	
Escama anucleada	1,0 ($\pm 0,2$) ^A	3,0 ($\pm 0,5$) ^B	13($\pm 2,6$) ^C	5,0 ($\pm 1,5$) ^{ABC}	$p=0,00$
Superficial	43($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,8$)	40 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,6$)	$p>0,05$
Intermediária	51($\pm 3,1$)	58($\pm 3,1$)	46 ($\pm 3,7$)	58($\pm 3,1$)	$p>0,05$

BL= borda de língua

Tabela 3. Distribuição das células escamas anucleadas, superficial com núcleo e intermediárias nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

Grupos	Controle (AB)	Álcool-fumo (AB)	Leucoplasia	Carcinoma Espinocelular	p
	Média(DP)	Média (DP)	Média(DP)	Média/DP	
Escama anucleada	1,0 ($\pm 0,2$) ^{AB}	1,0 ($\pm 0,4$) ^{AB}	13($\pm 2,6$) ^C	5,0 ($\pm 1,5$) ^{ABC}	p=0,00
Superficial	34($\pm 2,3$)	30($\pm 2,9$)	40 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 2,6$)	p>0,05
Intermediária	65 ($\pm 2,3$) ^A	66($\pm 3,1$) ^A	46 ($\pm 3,7$) ^B	58($\pm 3,1$) ^{AB}	p=0,001

AB= assoalho bucal

PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os resultados referentes à análise da presença de AgNOR nos diferentes grupos estão descritos na tabela 4 e 5.

Uma maior média de mAgNOR e percentual de AgNOR ($pAgNOR > 2$ e 3) foi observada nos pacientes dos grupos carcinoma em relação ao grupo controle, no sítio borda de língua, ($p=0,001$; $p=0,027$; $p=0,005$, respectivamente), (tabela 4).

Entretanto, os indivíduos do grupo exposto a álcool-fumo, no sítio assoalho bucal, apresentaram maior média do percentual de AgNOR ($pAgNOR > 2,3$ e 4) do que no grupo com leucoplasia ($p=0,004$; $p=0,01$; $p=0,02$, respectivamente), (tabela 5).

Quando realizamos a comparação entre os sítios notou-se maiores médias dos parâmetros de proliferação celular avaliados no assoalho bucal quando comparado à borda de língua.

Tabela 4. Distribuição das variáveis de AgNOR (média de AgNOR e percentual de AgNOR >1, >2, >3 e >4) de acordo com os grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

Grupos	Controle (BL)	Álcool-fumo(BL)	Leucoplasia (L)	Carcinoma Espinocelular(L)	p
	Média(DP)	Média (DP)	Média(DP)	Média/DP	
mAgNOR	3,36(±0,89) ^A	3,72(±0,94) ^{AB}	3,58(±0,13) ^{AB}	4,16(±0,16) ^B	p=0,001
pAgNOR>1	95 (±1,10)	98 (±4,00)	94 (±1,90)	91 (±4,70)	p>0,05
pAgNOR>2	74 (±2,40) ^A	82(±1,80) ^{AB}	77(±3,40) ^{AB}	86 (±2,70) ^B	p = 0,027
pAgNOR>3	43(±2,90) ^A	51(±3,00) ^{AB}	50(±4,50) ^{AB}	62 (±4,20) ^B	p=0,005
pAgNOR >4	20(±2,10)	27(±2,70)	24(±3,00)	35(±4,30)	p>0,05

Bl= borda de língua, L= lesional

Tabela 5. Distribuição das variáveis de AgNOR(média de AgNOR e percentual de AgNOR >1, >2, >3 e >4) de acordo com os grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

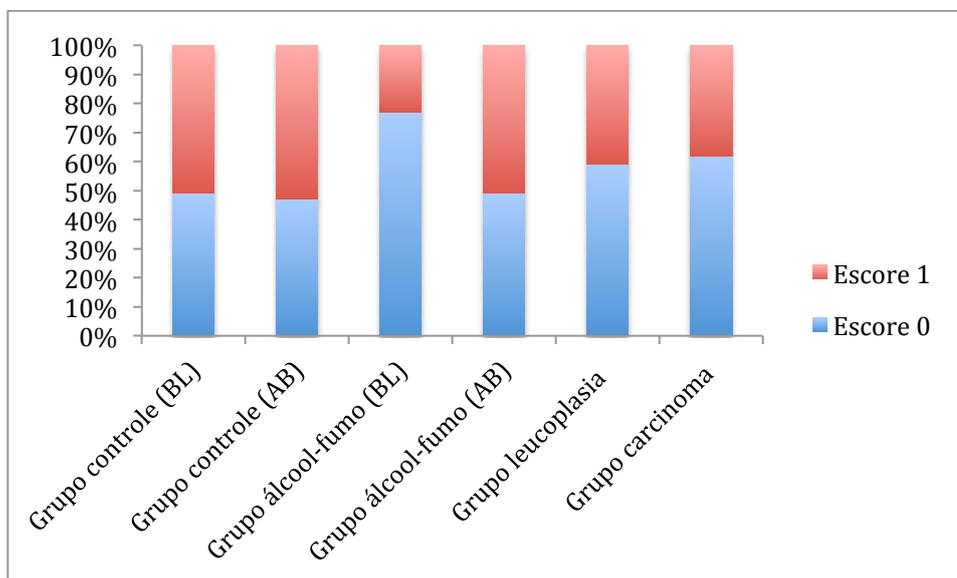
Grupos	Controle (AB)	Álcool-fumo(AB)	Leucoplasia (L)	Carcinoma Espinocelular(L)	p
	Média(DP)	Média (DP)	Média(DP)	Média/DP	
mAgNOR	3,93(±0,14) ^{AB}	4,31(±0,13) ^A	3,58(±0,13) ^B	4,16(±0,17) ^{AB}	p<0,05
pAgNOR>1	98 (±7,00)	99 (±3,00)	94(±1,90)	91 (±4,70)	p>0,05
pAgNOR>2	87(±2,40) ^{AB}	91(±1,40) ^A	77(±3,40) ^B	86 (±2,70) ^{AB}	p=0,004
pAgNOR>3	62(±3,40) ^{AB}	69 (±3,00) ^A	50(± 4,50) ^B	62(± 4,20) ^{AB}	p=0,01
pAgNOR >4	34 (±3,40) ^{AB}	39(±3,20) ^A	24(±3,00) ^B	35(±4,30) ^{AB}	p=0,024

AB= assoalho bucal, L= lesional

EXPRESSÃO DA E-CADERINA E INVOLUCRINA

Os resultados mostraram que a marcação positiva da E-caderina (escore 1) foi maior no grupos sem lesão, grupo controle (51%) e álcool-fumo(AB) (51%) do que nos grupos com lesão, leucoplasia (41%) e carcinoma espinocelular (38%), (gráfico 1).

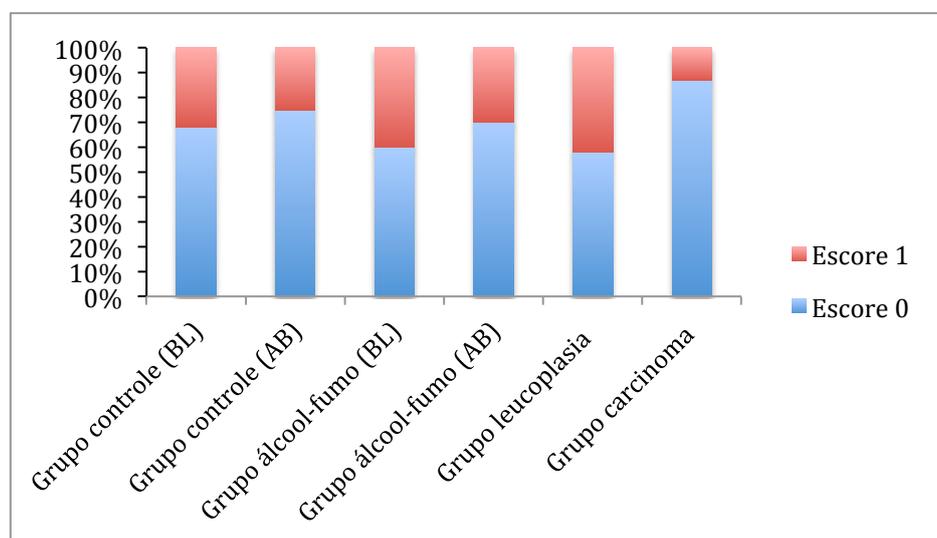
Gráfico 1- Expressão imunocitoquímica da E-caderina nos grupos controle, álcool fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular



BL= borda de língua; AB= assoalho bucal, escore 0= ausência de marcação e escore 1= presença de marcação

Os resultados referentes à análise imunocitoquímica da involucrina mostraram uma maior marcação positiva nos grupos controle, grupo álcool-fumo e leucoplasia do que o grupo carcinoma espinocelular, no qual 87% dos indivíduos deste grupo mostraram escore 0, ou seja ausência da expressão da involucrina (gráfico 2).

Gráfico 2- Expressão imunocitoquímica da Involucrina nos grupos Controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular



BL= borda de língua; AB= assoalho bucal, escore 0= ausência de marcação e escore 1= presença de marcação

CORRELAÇÃO DO PADRÃO DE MATURAÇÃO EPITELIAL E EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA E-CADERINA E INVOLUCRINA

Em relação às escamas anucleadas observou-se uma diminuição da média-percentual destas células, quando ocorre marcação positiva da E-caderina no grupo leucoplasia ($p=0,001$) e aumento do percentual de escamas anucleadas quando ocorre marcação da E-caderina no grupo carcinoma espinocelular ($p=0,032$), (tabela 6).

Já quando avaliamos o percentual de células superficiais com núcleo não observou-se uma associação com a marcação da E-caderina e involucrina.

Em relação ao percentual de células intermediárias foi observada um aumento no percentual destas células quando ocorre a marcação da E-caderina no grupo leucoplasia ($p=0,000$) (tabela 7).

Em relação à associação da expressão imunocitoquímica da involucrina com o percentual dos diferentes tipos celulares, não foi observada correlação entre o percentual de escamas anucleadas, células superficiais com núcleo e células intermediárias e imunoexpressão da involucrina.

Tabela 6. Correlação da marcação da E-caderina e percentual de escamas anucleadas e intermediárias nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

		Score E-caderina	Escama anucleada (média + DP)	Intermediária (média + DP)	P	
Grupo Controle	BL	0	1,0(±0,3)	57(±3,4)	$p>0,05$	
		1	1,0(±0,3)	47(±5,2)		
	AB	0	1,0(±0,4)	62(±3,8)		$p>0,05$
		1	1,0(±0,3)	66(±3,2)		
Grupo álcool-fumo	BL	0	3,0(±0,6)	59(±3,7)	$p>0,05$	
		1	1,0(±0,6)	55(±4,4)		
	AB	0	1,0(±0,6)	64(±3,2)		$p>0,05$
		1	1,0(±0,6)	66(±5,2)		
Grupo Leucoplasia	L	0	19 (±4,0)	37(±4,3)	$p=0,001$	
		1	4,0(±1,2)	58(±4,2)	$p=0,000$	
Grupo Carcinoma espinocelular	L	0	3,0(±1,4)	56(±4,0)	$p= 0,032$	
		1	8,0(±2,9)	56(±5,4)		

CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA E-CADERINA, INVOLUCRINA E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os resultados mostraram que há uma correlação entre o aumento da proliferação celular pelos parâmetros analisados de AgNOR e a marcação positiva da E-caderina (escore 1) nos grupos dos indivíduos expostos a álcool-fumo e leucoplasia, conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7. Correlação da marcação da E-caderina e variáveis de AgNOR nos grupos controle, álcool-fumo, leucoplasia e carcinoma espinocelular

		Escore E-caderina	mAgNOR (média + DP)	pAgNOR>3 (média + DP)	pAgNOR>4 (média + DP)	p
Grupo controle	BL	0	3,33 (±0,16)	43(±5,2)	22 (±3,5)	p>0,05
		1	3,35 (±0,71)	41(±2,5)	19(±2,0)	
	AB	0	3,66(±0,18)	57(±4,9)	32(±4,0)	p>0,05
		1	4,08(±0,17)	65(±3,8)	35(±4,9)	
Grupo álcool-fumo	BL	0	3,65(±0,98)	50(±3,3)	24(±2,6)	p=0,02
		1	4,00(±0,21)	59(±5,9)	39(±5,9)	
	AB	0	3,93(±0,16)	60(±3,4)	30(±3,8)	p=0,001
		1	4,60 (±0,18)	76(±3,2)	45(±3,6)	p=0,002
Grupo Leucoplasia	L	0	3,33(±0,16)	44(± 5,8)	17(±2,9)	p=0,028
		1	3,86 (±0,17)	56(±6,0)	31(±4,5)	p=0,017
Grupo Carcinoma espinocelular	L	0	4,28(±0,21)	67 (±4,9)	39(±5,6)	p>0,05
		1	3,81(±0,23)	53(±7,1)	26(±5,2)	

Em relação a involucrina, não foi observada associação entre os padrões de proliferação celular analisados e marcação positiva da involucrina.

DISCUSSÃO

Cada vez mais se busca a identificação precoce de biomarcadores que possam sinalizar o risco de malignização de cada indivíduo para o câncer bucal, desta forma o principal objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunocitoquímica de moléculas de adesão e diferenciação celular nas células da mucosa bucal de indivíduos de risco e sua correlação com padrão de maturação e proliferação comparando-os com indivíduos controle, não expostos a carcinógenos, ou com a presença de carcinoma espinocelular.

Em relação as características demográficas da amostra, nossos resultados mostraram uma maior média de idade, e maior prevalência nos indivíduos do sexo feminino nos grupos sem lesão e com leucoplasias, este aspecto está em discordância com outros estudos^{20,21}, os quais relatam maior ocorrência de homens nas leucoplasias, porém sugerem que a distribuição do gênero pode ser altamente variável dependendo da localização geográfica e hábitos da população em relação aos fatores de risco^{20,21,22}. Além disso, observamos que os indivíduos com leucoplasias apresentavam baixo consumo de álcool (41,9%) quando comparado ao grupo carcinoma espinocelular (70,4%), assim atribuímos uma maior associação das leucoplasias com o consumo de tabaco (64,5%) conforme já descrito por

outros autores^{20,21}. Em relação a localização das lesões foi constatada maior incidência das leucoplasias e carcinomas espinocelulares bucais em região de assoalho bucal e borda de língua de acordo com o descrito na literatura, estes são considerados os principais sítios de acometimento do câncer bucal²³.

Este é o primeiro estudo que avaliou a expressão de marcadores de adesão celular (E-caderina) e de diferenciação (involucrina) por meio da citopatologia da mucosa bucal. A marcação imunocitoquímica da Involucrina em células descamadas da mucosa bucal não mostrou-se eficiente, como uma ferramenta para determinar paciente de risco utilizando citopatologia bucal. Entretanto foi possível observar que a ausência de marcação da E-caderina foi maior nos grupos com lesão carcinoma espinocelular (62%) e leucoplasia (59%) quando comparado com o grupo controle (51%) (gráfico1), em concordância com Sridevi et al. (2015)¹², o qual observou que 90% dos carcinomas espinocelulares bucais e 80% das leucoplasias apresentavam leve a moderada expressão de E-caderina quando comparada ao grupo controle com alta expressão. Além disso, Von Zeidler et al. (2014)²⁴, Yogesh et al. (2011)²⁵, observaram também uma menor expressão da E-caderina nos carcinomas e displasias epiteliais quando comparado à mucosa normal. Entretanto estes estudos diferem da nossa pesquisa, devido à metodologia utilizada (pois estes estudos foram realizados em cortes histológicos e não em esfregaços citológicos) e apresentavam diferentes análise dos resultados.

Considerando a correlação da expressão da E-caderina e o padrão de maturação da mucosa bucal, nossos achados mostraram-se contraditórios,

pois não foi possível demonstrar uma relação direta entre a E-caderina e o padrão de descamação da mucosa bucal.

Quando analisamos individualmente o percentual dos diferentes tipos celulares pela técnica Papanicolau observamos um maior número de escamas anucleadas no grupo de indivíduos expostos ao fumo e álcool do que no grupo controle, Resultados similares foram descritos por Orellana Bustos et al. (2004)²⁶, Winn et al. (2000)²⁷, os quais demonstraram um maior percentual destas células em pacientes expostos ao fumo, e este aumento da ceratinização foi atribuído como uma resposta da mucosa bucal frente à agressão produzida pelo calor e produtos químicos do tabaco.

Além disso, foi notado maior número de escamas no grupo leucoplasia quando comparada aos grupos sem lesão e isto ocorre, porque a leucoplasia se caracteriza como mancha ou placa branca que é caracterizada por aumento da ceratinização e por consequência, possivelmente, apresentando aumento do número de escamas anucleadas, acredita-se que isto também reflete um menor percentual de células intermediárias no grupo leucoplasia comparada aos grupos sem lesão em discordância ao achados de Burzlaff et al., 2007⁵. Os achados deste estudo de maior número de células intermediárias presentes no assoalho bucal quando comparado a borda de língua estão em acordo com os resultados de outros estudos^{28,29,30}, onde constatou-se que o padrão de maturação epitelial apresenta variações de acordo com o sítio anatômico e o assoalho bucal por ser uma mucosa não ceratinizada, mais fina é mais permeável e assim pode apresentar maior número de células intermediárias.

Em relação aos parâmetros de proliferação celular analisados pela técnica de AgNOR observamos um aumento estatisticamente significativo na atividade proliferativa do grupo carcinoma quando comparado ao grupo controle no sítio borda de língua em concordância com Remmerbarch et al., 2003³¹, o qual observou média de AgNOR no grupo carcinoma (8,82), significativamente maior do que no grupo controle (2,28). Entretanto nossas médias são inferiores e esta diferença pode ser devido à diferente metodologia realizada no estudo Remmebrach, onde foi realizado biópsia tipo brush. Além disso, tamanho da amostra, sítios anatômicos diferentes, ou uma combinação destes fatores também podem explicar as diferentes médias. Não encontramos na literatura outros estudos que realizaram a análise de AgNOR em grupos com lesão associada citopatologia bucal.

Também observamos uma maior percentual de AgNOR ($pAgNOR > 2$ e > 3) nos indivíduos expostos aos fatores de risco fumo e álcool, no sítio assoalho bucal. Esta observação está de acordo com Paiva et al. (2004)² e Cançado et al. (2001)³, os quais constataram um aumento de mAgNOR nos pacientes expostos ao fumo e fumo e álcool em relação aos controles.

Ademais, na análise da correlação do padrão de proliferação com a expressão da E-caderina da mucosa bucal nos 4 grupos estudados, observou-se uma tendência de aumento dos parâmetros de AgNOR em todos os grupos avaliados, exceto no grupo carcinoma espinocelular, quando ocorre a marcação da E-caderina, com aumento estatisticamente significativo no grupo exposto a carcinógenos ($p=0,001$) e leucoplasia ($p=0,002$), isto sugere que os passos prévios ao desenvolvimento do câncer se comportam

de forma similar, entretanto quando ocorre a manifestação fenotípica da lesão o comportamento celular se altera ou o conjunto de células obtidos no raspado segue um padrão mais desorganizado, característico da neoplasia já instalada. Somado a isso, estudos relatam que a ausência ou diminuição da expressão da E-caderina pode ser um evento tardio associada à progressão tumoral, entretanto a proliferação celular pode constituir um evento precoce da carcinogênese ²⁴.

Conclusões

A citopatologia associada a técnicas quantitativas como papanicolau AgNOR, e expressão imunocitoquímica de E-caderina pode detectar alterações associadas a carcinogênese bucal. O marcador de diferenciação celular (Involucrina) não se mostrou eficaz para sinalizar pacientes de risco quando utilizamos a citopatologia bucal. Novos estudos para identificação de outros biomarcadores são necessários para propormos uma intervenção profilática nos indivíduos de grupos de risco para o câncer, a nível populacional.

Referências

1. Rivera C. Essential of oral cancer. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(9): 11884-11894, 2015.
2. Paiva RL. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. Analyt Quant Cytol Histol. 2004; 26(3): 175-180.
3. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral oncology 2001; 37(5): 446-54.

4. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Comparative analyses between the smoking habit frequency and nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers normal buccal mucosa. *Tabacco induced Diseases*. 2004; 2(1): 43-49.
5. Burzlaff JB et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*, v. 18, n. 6, p. 367-375, 2007.
6. Gedoz L et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol*. 2007; 29(4): 231-238.
7. Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JY. Cell adhesion proteins as tumors suppressors. *J Urol*. 2002;167: 1836-43..
8. Watt FM. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*. 1983;136: 1518-22.
9. Zhao Z, Ge J, Sun Y, Tian L et al. Is a E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2012;48: 761-767, 2012.
10. Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8 (3): 3150-3154.
11. Luo SL, Xie YG, Li Z, Ma JH. Ecadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta- analysis. *Tumor Biol* 2014;35: 5533-5537.
12. Sridevi U, Jain A, Nagalaxmi V, Kumar UV, Goyal S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinoma. *Europ J of Dent*. 2015;9: 364- 372.
13. Kannan S, Balaram P, Chandran GJ et al. Alterations in expression of terminal differentiation markers of keratinocytes during oral carcinogenesis. *Pathobiol*. 1994; 62(3):127-33.
14. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The Effect of Alcohol

Consumption on Periodontal Disease. J Periodontol. 2001;72:183-189.

15. Carvalho, G. Citologia Oral. Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro 2002.

16. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem J 1986; 18: 5-14.

17. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol.1989;158:185–188.

18. Xie X, Clausen OP, Sudbö J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer.1997;79:2200-2208.

19. Da Silva AD, Lima CF, Maraschin BM et al. Immunocytochemistry associated with oral exfoliative cytology. Methodological Analysis. Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology 2015; **37**:134-138.

20. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. Clin Oral Invest 2001;5:207-213.

21. Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N. Oral premalignant lesions: from a clinical presepective. Int J Clin Oncol 2011;16:5-14.

22. Rodrigues TL, Costa LJ, Sampaio MC, Rodrigues FG, Costa AL. Leucoplasias bucais : relação clinico-histopatológicas. Pesqui. Odonto Bras 2000; 14(4): 357-361.

23. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary oral and maxillofacial pathology. Los Angeles: CV Mosby 1997; 174–80.

24. Von Zeidler SV, Botelho TL, Mendonça EF, Batista AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014;14: 2-7.
25. Yogesh TL, Narayan TV, Shreedhar B, Shashidara R, Leekymohanty. The expression E-cadherin and cathepsin- D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *Journal of Oral and Maxillofac. Pathol.* 2011; 15: 288-294.
26. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal from smokers and non-smokers. *Med Oral* 2004;9:197-2003.
27. Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ* 2001;65:306-311.
28. Braga FL, Meneguzzi RD, Paiva RL, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa oral de fumantes e não-fumantes. *Rev Odontol Ciéncia* 2004;19:157-80.
29. Silva MCA, Rados PV. Citologia: um recurso auxiliar na prevenção do cancer em pacientes do sexo masculino. *Rev Facul Odontol* 1997;38: 3 -10.
30. Silverman S, Becks H, Farber SM. The diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res* 1958; 37:195-205.
31. Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 2003; 25:139-1.

3.3 ARTIGO CIENTÍFICO III

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico
Cytopathology (Online ISSN: 1365-2303)

Análise da correlação imunocitoquímica e imunoistoquímica de moléculas de adesão e diferenciação celular em leucoplasias e carcinomas espinocelulares bucais

Resumo:

Objetivo: Avaliar a correlação da expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica das moléculas de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (Involucrina) em leucoplasias e carcinomas espinocelulares bucais.

Métodos: Foi realizada coleta citopatológica e biópsia de indivíduos com leucoplasia (n=31) e carcinoma espinocelular bucal (n=22), de ambos os sexos e acima de 30 anos. O raspado citológico e a biópsia foi realizada no local da lesão e posteriormente lâminas histológicas foram confeccionadas para realização das técnicas imunocitoquímica para as células esfoliadas da mucosa bucal e técnica imunoistoquímica para os tecidos de biópsia utilizando os anticorpos E-caderina e Involucrina. Os testes de correlação de Sperman e concordância Kappa foram realizados para avaliar a correlação e concordância entre as técnicas.

Resultados: Não foi observada correlação e concordância da expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e Involucrina em leucoplasias ($R=0,01$, $p=0,958$), (Índice Kappa =0,017, $p=0,92$), e carcinomas espinocelulares bucais ($R=0,26$, $p=0,206$), (Índice Kappa=0,36, $p=0,07$).

Conclusões: As análises de imunoexpressão dos marcadores E-caderina e involucrina nos tecidos possui padrão de marcação diferente daquele observado nas células esfoliadas da mucosa bucal. Desta forma, torna-se necessário novos estudos, com amostras maiores, ou utilizando outros marcadores, a fim de confirmar os achados da nossa pesquisa e aprofundar o estudos em torno de formas de diagnosticar precocemente o câncer bucal.

Palavras chaves: imunoistoquímica, E-caderina, Involucrina

INTRODUÇÃO

O câncer bucal é considerado um problema de saúde pública, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer estimam-se no Brasil para o ano de 2016, 11.140 novos casos desta neoplasia em homens e 4.350 novos casos em mulheres. As taxas de sobrevida e mortalidade desta doença permaneceram elevadas nos últimos 30 anos¹. Assim, novos esforços devem ser realizados pela busca de metodologias eficazes, assim como, a identificação de biomarcadores, a fim de realizar a prevenção desta neoplasia na população.

Lesões potencialmente malignas podem predispor o desenvolvimento do câncer bucal, dentre estas lesões a leucoplasia é a mais prevalente, portanto de grande relevância clínica. Apesar de não podermos prever o risco de malignização das leucoplasias, a presença de tais lesões na mucosa bucal são uma alerta para pacientes e profissionais de saúde².

Métodos não invasivos como a citopatologia tem se mostrado efetivos para realizar a detecção precoce de alterações celulares não visíveis clinicamente em pacientes expostos a fatores de risco, e em lesões potencialmente malignas^{3,4,5,6}. Entretanto, para proporcionar um melhor entendimento do potencial de malignização de cada indivíduo a associação da citopatologia com técnicas complementares como a imunocitoquímica podem melhorar a efetividade deste processo de rastreamento. A expressão de marcadores relacionados à adesão como a E-caderina e diferenciação como Involucrina podem atuar como preditores do processo de malignização^{7,8}. A E-caderina é uma glicoproteína que medeia adesão intercelular e tem sido estudada no processo de carcinogênese bucal.

Algumas pesquisas tem observado uma diminuição na expressão desta molécula nos estágios prévios e durante a progressão do câncer bucal^{7,8}.

Proteínas relacionadas a diferenciação terminal dos ceratinócitos como a involucrina, também mostraram sua expressão reduzida em leucoplasias com displasia epitelial quando comparada as células da mucosa bucal exposta ou não a carcinógenos⁹.

A imunexpressão destes marcadores de adesão e diferenciação, já vem sendo estudados nos diferentes estágios da carcinogênese em tecidos obtidos de biópsia, porém não há estudos que avaliaram a expressão destas proteínas por meio da citologia da mucosa bucal, portanto o objetivo deste estudo foi avaliar se há correlação dos achados da marcação imunocitoquímica com a expressão imunistoquímica da E-caderina e Involucrina nas células da mucosa bucal de pacientes com leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal.

METODOLOGIA

Amostra

Os indivíduos deste estudo foram selecionados no Ambulatório de atendimento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no Centro de Especialidades Odontológicas e no setor de Estomatologia do Hospital Clinicas de Porto Alegre (HCPA) no periodo de 2012 a 2014. Todos os indivíduos assinaram um TCLE (Anexo 1) e Aprovação Comitê de Ética da UFRGS. A amostra foi composta por 2

grupos de pacientes de ambos os sexos, acima de 30 anos um total de 53 pacientes participaram do estudo. Grupo Leucoplasia (GL), (n=31): constituído por pacientes que apresentavam clinicamente leucoplasias bucais, sendo posteriormente confirmados no exame de biópsia e diagnóstico histopatológico. Grupo Carcinoma Espinocelular (GCE), (n=22): constituído por pacientes que apresentavam clinicamente carcinoma espinocelular bucal primário confirmado após biópsia e diagnóstico histopatológico. Os critérios de exclusão deste estudo foram: idade inferior a 30 anos, presença de outras lesões bucais clinicamente visíveis, com exceção do carcinoma espinocelular e da leucoplasia.

Após a concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE, foi realizado um questionário com informações pertinentes ao estudo. Foram coletados dados comportamentais e demográficos seguido do exame físico extra-bucal e intra-bucal, no qual foi avaliadas condições dentárias (Anexo 2).

Coleta Citopatológica

Com auxílio de um cytobrush os pacientes foram submetidos à coleta de células da mucosa bucal na região onde estava localizada a leucoplasia ou carcinoma espinocelular. O esfregaço citopatológico foi transferido para uma lâmina de vidro fixada em solução de álcool absoluto spray. Previamente à realização dos raspados, todos os pacientes foram orientados a retirar suas próteses removíveis, e a bochechar água filtrada durante 1 minuto.

Posteriormente à coleta citológica foi realizado a biópsia das lesões (leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal). O material obtido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10% e, processado pela técnica de hematoxilina e eosina do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS para confirmação do diagnóstico histopatológico das lesões.

As lâminas foram identificadas com um número de registro para cada paciente, e seguiram para processamento da técnica imunocitoquímica para as células esfoliadas da mucosa bucal e imunoistoquímica para os tecidos de biópsias de leucoplasias e carcinoma espinocelular bucal.

Técnica Imunocitoquímica e Imunoistoquímica

Em ambas as técnicas foi realizado o mesmo protocolo descrito por Da Silva et al. (2015)¹⁰, entretanto nos blocos de parafina provenientes da biópsia das lesões de leucoplasia e carcinoma espinocelulares, os cortes histológicos foram previamente desparafinados em xilol. Inicialmente foi realizada a hidratação em álcool absoluto, após a permeabilização da membrana com triton X 0,5% em solução PBS (Phosphate buffer saline), seguido por bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 20 volumes e metanol (1:1). Após lâminas foram submetidas ao tratamento para recuperação antigênica com ácido cítrico monohidratado 10nM em banho maria por 30 minutos. As lavagens entre as etapas foram realizadas com solução tamponada de TRIS. Os anticorpos primários foram E-caderina (clone SY5, Abcam) e Involucrina (clone 24E, Cell

signalling) e foram incubados overnight a 4°C. Para amplificação da reação foi utilizado Envision (HRP Kit, Dako Corp., Carpinteria, USA) para anticorpo involucrina e Envision Dual Link para E-caderina (HRP Kit, Dako Corp., Carpinteria, USA), após foi adicionado o cromóforo diaminobenzidina (DAB, DAKO). Posteriormente foi realizada a contracoloração das lâminas com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck).

O controle negativo das reações foi realizado pela abolição do anticorpo primário. O controle positivo utilizado uma amostra de pele para ambos os anticorpos.

Análise dos dados

Os casos foram examinados em microscópio óptico binocular acoplado a uma câmera digital em um aumento de 400X. Para a E-caderina foram consideradas células positivas as que apresentavam marcação na membrana e para involucrina as células positivas foram as que apresentavam marcação citoplasmática. A análise da expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica de ambas as moléculas, foi semi-quantitativa segundo critérios de Lima et al., 2015¹¹. Foram utilizados o escore 0= nenhuma célula positiva, escore 1= 25% células positivas, escore 2=50% células positivas, escore 3=75% células positivas e escore 4=100% células positivas. Para análise de concordância entre as técnicas utilizando os anticorpos descritos também foi realizada a análise semi-quantitativa por escores: escore 0= ausência de marcação e escore 1 = marcação positiva.

A análise das lâminas foi realizada por um único examinador cego e calibrado. A calibragem intra-examinador foi avaliada pelo teste de Correlação Intra-Classe ($\geq 0,75$).

Análise Estatística

Os dados do presente estudo foram submetidos ao Programa de Computador SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para análise estatística.. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a existência de associação entre os achados imunocitoquímicos e imunoistoquímicos das proteínas estudadas. O teste de Kappa foi utilizado para avaliar a concordância dos achados imunocitoquímicos e imunoistoquímicos. Foi considerado um nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Um total de 53 pacientes foi incluído no estudo, sendo 31 pacientes do grupo leucoplasia e 22 do grupo carcinoma espinocelular bucal. A média de idade foi de 57 anos, variando de 30 a 79 anos. No grupo leucoplasia a maioria foi do sexo feminino (58,1%) e no grupo carcinoma do sexo masculino (51,9%). A frequência de fumantes foi 64,5% (grupo leucoplasia) e 70,4% (grupo carcinoma) e o consumo de bebidas alcóolicas foi maior no grupo carcinoma (77,8%).

As leucoplasias bucais, foram subdivididas em grupos de acordo

com a ausência ou presença de sinais displásicos no material histopatológico examinado. Leucoplasias displásicas (n=4) e leucoplasias não displásicas (n=27). Os diagnósticos histopatológicos das leucoplasias não displásicas foram na sua maioria hiperkeratose e hiperplasia epitelial e hiperplasia epitelial e acantose.

As localizações mais frequentes das leucoplasias e carcinomas espinocelulares bucais foram língua e assoalho bucal.

As tabelas 1 e 2 mostram a marcação por escores das técnicas imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-caderina e involucrina nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular. Figura 1 ilustra a marcação imunocitoquímica nas células esfoliadas da mucosa bucal da E-caderina e involucrina nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular e a figura 2 a marcação imunoistoquímica nos tecidos de ambos anticorpos nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular

Tabela 1. Marcação da E-caderina pelas técnicas imunocitoquímica e imunoistoquímica nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular

	Escores E-caderina	Imunocitoquímica	Imunoistoquímica
Grupo Leucoplasia n=31	0	16,1%	9,4%
	1	41,9%	43,6%
	2	9,7%	21,9%
	3	32,3%	21,9%
	4	0%	3,1%
Grupo Carcinoma Espinocelular n=22	0	29,1%	25%
	1	33,3%	41,7%
	2	12,5%	25%
	3	25%	8,3%
	4	0%	0%

Escore 0= nenhuma célula positiva, Escore 1= 25% células positivas, Escore 2=50% células positivas, Escore 3=75% células positivas e Escore 4=100% células positivas

Tabela 2. Marcação da Involucrina pelas técnicas imunocitoquímica e imunoistoquímica nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular

	Escores Involucrina	Imunocitoquímica	Imunoistoquímica
Grupo Leucoplasia	0	24%	0%
	1	27,3%	12,1%
	2	15,2%	21,2%
	3	18,2%	51,5%
	4	0%	0%
Grupo Carcinoma Espinocelular	0	29,6%	7,4%
	1	44,4%	40,7%
	2	7,4%	25,9%
	3	3,7%	7,4%
	4	0%	0%

Escore 0= nenhuma célula positiva, Escore 1= 25% células positivas, Escore 2=50% células positivas, Escore 3=75% células positivas e Escore 4=100% células positivas

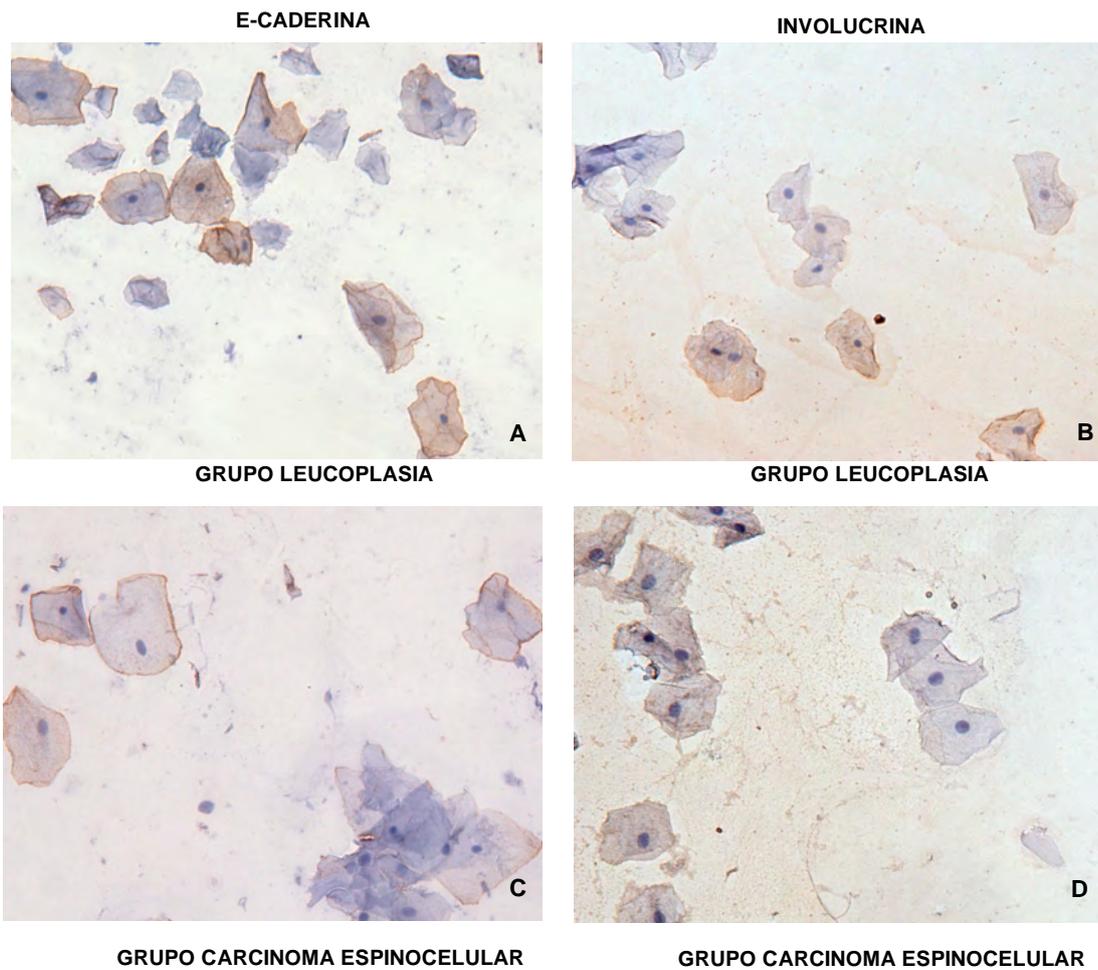


Figura 1. (A) Marcação imunocitoquímica da E-caderina em membrana celular no grupo leucoplasia. (B) Marcação imunocitoquímica da involucrina em citoplasma no grupo leucoplasia. (C) Marcação imunocitoquímica da E-caderina focal e em membrana no grupo carcinoma espinocelular. (D) Marcação de involucrina em citoplasma no grupo carcinoma espinocelular, marcação fraca e focal. As fotos estão no aumento 20x.

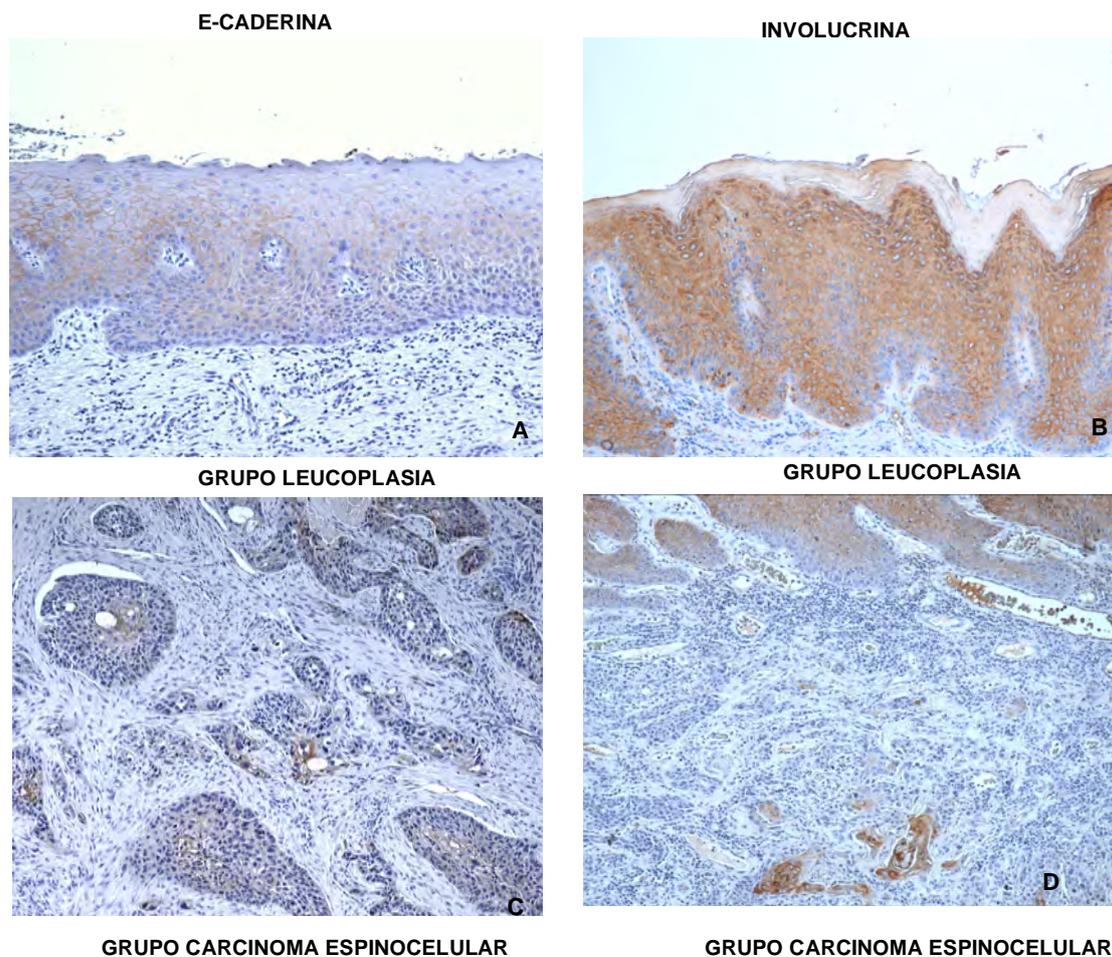


Figura 2 – (A) Expressão imunoistoquímica da E-caderina em membrana celular, no grupo leucoplasia, marcação fraca. (B) Marcação imunoistoquímica da involucrina em citoplasma no grupo leucoplasia, intensa marcação em toda extensão do epitélio, exceto na camada basal e suprabasal. (C) Marcação imunoistoquímica de E-caderina no grupo carcinoma espinocelular, marcação fraca e focal. (D) Marcação imunoistoquímica da involucrina no grupo carcinoma espinocelular, marcação focal, somente no centro das ilhas tumorais com formação de ceratina. Fotos no aumento 10x.

CORRELAÇÃO IMUNOCITOQUIMICA E IMUNOISTOQUIMICA DA E-CADERINA

As tabelas 3 e 5 demonstram os resultados referentes as análises de correlação Spermann da técnica imunocitoquímica e imunoistoquímica da E-

caderina no grupo leucoplasia e carcinoma espinocelular , não foi observada correlação significativa (R=0,01, p=0,958),(R=0,26, p=0,206), respectivamente.

Na análise de concordância entre as técnicas, não foi observada concordância entre imunocitoquímica e imunoistoquímica no grupo leucoplasia (Índice Kappa = 0,017, p=0,92)(tabela 4) e grupo carcinoma (Índice Kappa=0,36, p=0,07 (tabela 6).

TABELA 3 – DADOS DA CORRELAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA E-CADERINA NA LEUCOPLASIA.

		EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E-CADERINA					Total
		ESCORE 0	ESCORE 1	ESCORE 2	ESCORE 3	ESCORE 4	
EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E-CADERINA	N	1	2	0	1	1	5
	ESCORE 0	20%	40%	0%	20%	20%	100%
	N	0	7	4	1	1	13
	ESCORE 1	0%	53,8%	30,8%	7,7%	7,7%	100%
	N	1	1	1	0	0	3
	ESCORE 2	33,3%	33,3%	33,3%	0%	0%	100%
	N	2	3	1	3	1	10
	ESCORE 3	20%	30%	10%	30%	10%	100%
Total	N	4	13	6	5	3	31
		12,9%	41,9%	19,4%	16,1%	9,7%	100%

TABELA 4- ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA E-CADERINA NO GRUPO LEUCOPLASIA

		IMUNOCITOQUÍMICA DA E-CADERINA			Total
		ESCORE 0	ESCORE 1		
IMUNOISTOQUÍMICA E-CADERINA	ESCORE 0	N	10	7	17
			58.8%	41.2%	100%
	ESCORE 1	N	8	6	14
			57.1%	42.9%	100%

Índice Kappa = 0,017, p=0,92

TABELA 5- DADOS DA CORRELAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA E-CADERINA NO CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL.

		EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E-CADERINA				
		ESCORE 0	ESCORE 1	ESCORE 2	ESCORE 3	Total
EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E-CADERINA	N	2	4	1	0	7
	ESCORE 0	28,6%	57,1%	14,3%	0%	100%
		2	4	1	1	8
	ESCORE 1	25%	50%	12,5%	12,5%	100%
		0	2	1	0	3
ESCORE 2	0%	66,7%	33,3%	0%	100%	
	2	0	3	1	6	
ESCORE 3	33,3%	0%	50%	16,7%	100%	
Total		6	10	6	2	24
		25%	41,7%	25%	8,3%	100%

TABELA 6- ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA E-CADERINA NO GRUPO CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL

		IMUNOCITOQUÍMICA DA E-CADERINA			
		ESCORE 0	ESCORE 1	Total	
IMUNOISTOQUÍMICA E-CADERINA	ESCORE 0	N	12	4	16
			75%	25%	100%
	ESCORE 1	N	3	5	8
			37,5%	62,5%	100%

Índice Kappa=0,36, p=0,07

CORRELAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA

As análises de correlação de Spermán da expressão imunocitoquímica e imunoistoquímica da involucrina não foi significativa nos grupos leucoplasia ($R=0,15$, $p=0,440$) e no grupo carcinoma espinocelular ($R= 0,15$, $p =0,532$), (tabela 7,9). Assim como, não foi observada concordância entre as técnicas no grupo leucoplasia (Índice kappa = $0,12$, $p=0,54$) e no grupo carcinoma espinocelular (Índice kappa = $0,07$, $p=0,68$), (tabela 8,10

TABELA 7 – DADOS DA CORRELAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA NO GRUPO LEUCOPLASIA.

		EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA INVOLUCRINA					
		SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3	SCORE 4	Total
EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA INVOLUCRINA	N	1	0	1	0	5	7
	SCORE 0	14,3%	0%	14,3%	0%	71,4%	100%
		0	1	1	3	3	8
SCORE 1		0%	12,5%	12,5%	37,5%	37,5%	100%
		1	1	1	0	2	5
SCORE 2		20%	20%	20%	0%	40%	100%
		0	1	0	3	1	6
SCORE 3		0%	20%	0	60%	20%	100%
		0	0	0	0	1	1
SCORE 4		0%	0%	0%	0%	100%	100%
Total		2	3	3	6	12	26
		7,7 %	11,5%	11,5%	23,1%	46,2%	100%

TABELA 8- ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA NO GRUPO LEUCOPLASIA

IMUNOCITOQUÍMICA INVOLUCRINA					
		SCORE 0	SCORE 1	Total	
IMUNOISTOQUÍMICA INVOLUCRINA	SCORE 0	N	2	3	5
			40%	60%	100%
	SCORE 1	N	2	3	5
			40%	60%	100%

Índice kappa = 0,12, p=0,54

TABELA 9- DADOS DA CORRELAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA NO GRUPO CARCINOMA ESPINOCELULAR.

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA INVOLUCRINA						
		SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3	Total
EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA INVOLUCRINA	N	0	4	2	1	7
	SCORE 0	0%	57,1%	28,6%	14,3%	100%
		2	5	3	0	10
	SCORE 1	20%	50%	30%	0%	100%
		0	0	1	0	1
	SCORE 2	0%	0%	100%	0%	100%
		0	1	0	0	1
	SCORE 3	0%	100%	0%	0%	100%
Total		2	10	6	1	19
		10,5%	52,6%	31,6%	5,3%	100%

TABELA 10- ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA NO GRUPO CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL

IMUNOCITOQUÍMICA INVOLUCRINA					
		SCORE 0	SCORE 1	Total	
IMUNOISTOQUÍMICA INVOLUCRINA	SCORE 0	N	11	1	12
			91,7%	8,3%	100%
	SCORE 1	N	6	1	7
			85,7%	14,3%	100%

Índice kappa = 0,07, p=0,68

DISCUSSÃO

Nos últimos anos um avanço na pesquisa do câncer tem mostrado mudanças metodológicas de análises histopatológicas para análises a nível molecular e genético devido às novas tecnologias. A técnica imunoistoquímica tem se mostrado promissora e bem consagrada na literatura¹². Esta é a primeira pesquisa, a qual avaliou a expressão de marcadores de adesão (E-caderina) e diferenciação celular (involucrina) nas células esfoliadas da mucosa bucal por meio da técnica imunocitoquímica e que avaliou a correlação de ambas as técnicas utilizando estes marcadores nos indivíduos com leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal.

Nossos resultados não mostraram correlação, nem concordância da imunoexpressão da E-caderina e involucrina em ambas as técnicas nos grupos estudados, demonstrando diferenças no padrão de marcação destas moléculas nos tecidos de biópsia e nas células esfoliadas da mucosa bucal.

Quando avaliamos a marcação imunoistoquímica da E-caderina nos tecidos de biópsia dos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular bucal, observamos que a maioria das células apresentaram escore 1 (tabela 1), ou seja, baixa expressão de E-caderina, isto está de acordo com os achados de García et al. 2006¹³, no qual 20% das leucoplasias com displasias epiteliais e 73% dos carcinomas in situ e microinvasivos demonstraram baixa expressão da E-caderina. Stridevi et al. (2015)⁸, Von Zeidler et al. (2014)¹⁴, e Zou et al. (2015)¹⁵, observaram resultados similares, demonstrando que a diminuição na imunoexpressão da E-caderina pode ser um indicativo da progressão

tumoral nas leucoplasias, e no carcinoma espinocelular bucal está associada a um pobre prognóstico .

Entretanto, em relação à expressão imunoistoquímica da involucrina, notou-se que no grupo leucoplasia 51,5% dos indivíduos, mostraram alta expressão (tabela 2). Outros autores^{16,17} constataram variações na expressão da involucrina nas leucoplasias. Leucoplasias não displásicas e com displasia leve a moderada mostraram alta expressão de involucrina (>50% células positivas), quando comparada as leucoplasias com displasia severa, que mostraram baixa expresssão (<25% células positivas). Estes resultados diferem um pouco dos nossos, uma vez que não realizamos a estratificação das leucoplasias, já que a grande maioria dos nossos casos foram leucoplasias não displásicas com aspecto histopatológico de hiperplasia epitelial e hiperkeratose e/ou acantose e a marcação da involucrina estava de acordo com nosso padrão histopatológico.

Já no grupo carcinoma espinocelular bucal, a expressão imunoistoquímica da involucrina foi baixa (score 1) na grande maioria dos casos, e notou-se a marcação somente nas células presentes nos centros das ilhas tumorais representadas por células bem diferenciadas com perólas de ceratina, conforme observado por outros estudos^{16,18}, que demonstraram que carcinomas in situ e invasivos apresentavam diferentes padrões na expressão da involucrina e isto estava diretamente relacionado ao grau de diferenciação dos tumores, nos tumores bem diferenciados apresentavam maior expressão, da involucrina, principalmente nas áreas com formação de pérolas de ceratina, enquanto carcinomas pobremente diferenciados ela está

ausente ou com pouco marcação.

Diante do exposto, nossos resultados demonstraram que a expressão imunohistoquímica dos marcadores E-caderina e involucrina se mostrou efetiva e em concordância com a literatura. As análises de imunexpressão dos marcadores E-caderina e involucrina nos tecidos mostraram um padrão de marcação diferente daquele observado nas células esfoliadas da mucosa bucal das lesões. Desta forma, torna-se necessário novos estudos, com amostras maiores, ou utilizando outros marcadores, a fim de confirmar os achados da nossa pesquisa e aprofundar o estudos em torno de formas de diagnosticar precocemente o aparecimento do câncer bucal.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em 06/01/2016.
2. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2007;**36**: 575–80.
3. Segura IG, Secchi D, Carrica A et al. Exfoliative cytology as a tool for monitoring pre-malignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2015; **44**:178-184.
4. Paiva RL. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology*. 2004; **26**(3):

175-180.

5. Burzlaff JB. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007, **18** (6): 367-375.

6. Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ et al. Applications of the oral scraped (exfoliative) in oral cancer and precancer. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2005;**10**:95-102.

7. Yogesh TL, Narayan TV, Shereedhar B, Shashidara R, Leekymohanty. The expression E-cadherin and cathepsin- D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2011;**15**: 288-294.

8. Sridevi U, Jain A, Nagalaxmi V, Kumar UV, Goyal S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinoma. *European Journal of Dentistry* 2015;**9**:364- 372.

9. Gilchrist JM, Thompson GC, Medina JE. Markers of keratinocyte differentiation in snuff-induced leukoplakia. *The American Journal of Surgery* 1992; **164**: 563-566.

10. Da Silva AD, Lima CF, Maraschin BM et al. Immunocytochemistry associated with oral exfoliative cytology. Methodological Analysis. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology* 2015; **37**:134-138.

11. Lima CF, Crastechini E, Issa JS et al. Evaluation of apoptotic pathway in oral mucosa by smoking in a Brazilian Outpatient Smoking Cessation Program. *International Journal of Cardiology* 2015; **184**:514-516.

12. Hardy LB, Fitzgibbons L, Goldsmith JD et al. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2013;**137**(1): 19-25.

13. Garcia AS, Abad Hernandez MM, Sánchez EF et al. E-cadherin , laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral, Patologıa Oral y Cirurgıa Bucal* 2006; **11**:E100-5.
14. Von Zeidler SV, Botelho TL, Mendonça EF, Batista AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014;**14**: 2-7.
15. Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Experimental Pathology* 2015;**8**(3): 3150-3154.
16. Vigneswaran N, Peters KP, Hornstein OP, Haneke E. Comparison of cytokeratin, filaggrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and squamous carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1989;**18**:377-390.
17. Itoiz ME, Conti IB, Gimenez H et al. Immunodetection of involucrin in lesions of oral mucosa. *Journal Oral Pathology* 1986;**15**: 205-208.
18. Toto PD, Nadimi H, Maywood I. Coexpression of cytokeratin, involucrin, and blood group antigens in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1990; **70**:75-80.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer bucal é considerado um problema mundial, uma vez que ele está localizado entre os dez tipos de cânceres mais comuns no mundo. Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos nas terapias atualmente, a sobrevivência desta doença permanece baixa e inalterada nos últimos anos. O grande desafio atual é a aplicação de medidas de prevenção eficazes a fim de reduzir a alta taxa de mortalidade desta doença (RIVERA 2015).

Ações de prevenção para o diagnóstico precoce do câncer bucal tem grande potencial para saúde pública, uma vez que são mais efetivas a longo prazo para o controle desta neoplasia.

Algumas das medidas a serem adotadas são: treinamento de profissionais da saúde, campanhas para cessação de hábitos nocivos e novos estudos para identificação de biomarcadores que possam ser utilizados para prevenção desta doença. Assim, é fundamental investir na pesquisa sobre detecção precoce de alteração celulares que precedem a manifestação fenotípica do câncer e que podem estar presentes em indivíduos de risco.

A citopatologia é uma das técnicas que tem se mostrado promissora como modelo experimental para este tipo de investigação. A citopatologia, permite avaliar indivíduos com a mucosa clinicamente normal e detecta alterações celulares subclínicas decorrentes do processo de carcinogênese.

Nosso grupo do Programa de Pós-Graduação de Odontologia da UFRGS, já tem demonstrado que a citopatologia pode sinalizar indicadores precoces em pacientes de risco para o câncer bucal como alterações na proliferação celular e maturação epitelial, em concordância com alguns dos resultados desta pesquisa. Na tentativa de apurar este modelo é necessário empregar novas metodologias associadas à citopatologia que sinalizem com maior acurácia aqueles indivíduos de maior risco para desenvolvimento do câncer bucal (CANÇADO et al; 2001; CANÇADO et al.,2004; PAIVA et al., 2004; GEDOZ et al; 2007).

Nosso trabalho validou uma nova metodologia, a imunocitoquímica, e demonstrou que é possível obter a marcação das células esfoliadas da mucosa bucal em indivíduos de risco, como indivíduos expostos ao fumo e álcool e com leucoplasia, apesar de ser uma técnica de difícil padronização e com algumas peculiaridades .

A expressão imunocitoquímica da E-caderina foi mais eficaz para sinalização de pacientes de risco, uma vez que mostrou maior marcação nos grupos sem lesão do que nos grupos com lesão conforme descrito por outros autores (STRIDEVI et al., 2015; GILCHRIST et al., 2015; VON ZEIDLER et al., 2014; KANNAN et al., 1994).

Quando avaliamos a correlação da expressão destes marcadores com o padrão citológico da mucosa bucal notamos alguma vinculação com as alteração no processo de maturação epitelial e aumento da atividade proliferativa nos indivíduos expostos aos carcinógenos e no grupo

leucoplasia, considerando-se a E-caderina. Entretanto, nossos resultados demonstraram inconsistências de difícil interpretação, devido possivelmente a variações no padrão de marcação desta molécula nos grupos.

Este é um trabalho inicial na busca da avaliação e relação da expressão imunocitoquímica de moléculas (E caderina e involucrina) nas células esfoliadas da mucosa bucal com outros parâmetros citológicos, sendo portanto necessária a continuidade destas observações em novos estudos longitudinais, com amostras mais representativas, utilizando novas metodologias associadas e mesmo em trabalhos de acompanhamento de casos.

As análises de DNA para avaliar danos genéticos, como perda de heterozigidade, expressão genética de novos marcadores como moléculas relacionados ao reparo do DNA, entre outros, podem também complementar estes achados, a fim de aprimorar estes ou criar novos modelos de prevenção capazes de predizer o aparecimento do câncer bucal, a nível populacional.

Referências

1. RIVERA C. Essential of oral cancer. Int J Clin Exp Pathol 2015, v.8, n.9, p.11884-11894.
2. CANÇADO RP, YURGEL LS, FILHO MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral oncology. n.37, v.5, p.446-54, 2001.
3. CANÇADO RP, YURGEL LS, FILHO MS. Comparative analyses between the

smoking habit frequency and nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers normal buccal mucosa. *Tabacco induced Diseases* v.2, n. 1, p. 43-49, 2004.

4. PAIVA, R.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol. A Cytopathologic Study. *Analyt Quant Cytol Histol*, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.
5. GEDOZ, L. et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol*, v. 29, n. 4, p. 231-238, 2007.
6. SRIDEVI U, JAIN A, NAGALAXMI V, KUMAR UV, GOYAL S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinoma. *Europ J of Dent*. n.9, p.364- 372, 2015
7. GILCHRIST JM, THOMPSON GC, MEDINA JE. Markers of keratinocyte differentiation in snuff-induced leukoplakia. *The American J of Surg*. n.164, p.563-566, 1992.
8. VON ZEIDLER SV, BOTELHO TL, MENDONÇA EF, BATISTA AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, n.14, p.2-7, 2014.
9. KANNAN, BALARAM P, CHANDRAN GJ, PILLAI MR, MATHEW B, NALINAKUMARI KR, NAIR MK. Alterations in expression of terminal differentiation markers of keratinocytes during oral carcinogenesis. *Pathobiol*. n.62, v.3, p.127-33, 1994.

ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante, Esta pesquisa, cujo título é: **ANÁLISE DA CORRELAÇÃO IMUNOISTOQUIMICA E IMUNOCITOQUIMICA DA MUCOSA BUCAL EXPOSTA A CARCINÓGENOS EM HUMANOS** será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo determinar a expressão de marcadores moleculares, associados a carcinogênese, e sua associação com o risco de desenvolvimento de câncer de boca. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá células coletadas de sua boca com uma escova.

Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes de um exame odontológico comum. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas

Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa. Caso decida participar e depois mude de

idéia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento. Eu, _____
(participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo. Porto Alegre, _____ de _____ de 201__.
Telefone: _____

O pesquisador responsável por este estudo é Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e a aluna responsável: Alessandra Dutra da Silva, telefone para contato: (51)33083629 do professor responsável. Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra da equipe de pesquisadores deste estudo.

Esta pesquisa será aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone: 51.3308362.

Anexo 2

FICHA DE COLETA

1. Dados Pessoais

1.1 Número identificação _____

1.2. Nome _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

1.4.1 Profissão _____

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

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

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

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

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

1.10. Você estudou até:

1 () nunca estudou 2 () 1-4 série 3 () 5-8 série 4 () 2 grau incompleto 5 () 2
grau completo 6 () superior incompleto 7 () superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

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

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

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

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

2.4. Você usa algum produto para bochecho

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

2.5. Com que frequência

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

2.6. Quando iniciou o uso?

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

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

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

3. Fatores comportamentais

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

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos _____

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

3.5 Quantos cigarros por dia _____

3.6 Por quantos anos _____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

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

3.9 Você ingere bebidas alcólicas:

3.10 Qual tipo de bebida 1() nenhum 2() cerveja 3() cachaça 4() vinho 5() outros _____

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

3.12- Quanto tempo bebe ou parou de beber _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

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

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4. Artrite () () ()

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

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

4.7. Qual ? _____

Exame bucal:

CPO-D

0=sadio 2=restauração com cárie 4=ausente por cárie 6=selante 8=trauma
1=cárie 3=restauração sem cárie 5=ausente por outra razão 7=pilar de prótese fixa 9=não examinado

Dentes perdidos(n): _____

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

Uso de prótese

Não Sim Tipo: _____ Condições: _____

Tempo de uso _____ anos Última troca _____ (meses, anos)

Remove para dormir

Não Sim

Estado dentário

Pobre (raízes residuais, vários dentes perdidos e doença periodontal avançada)

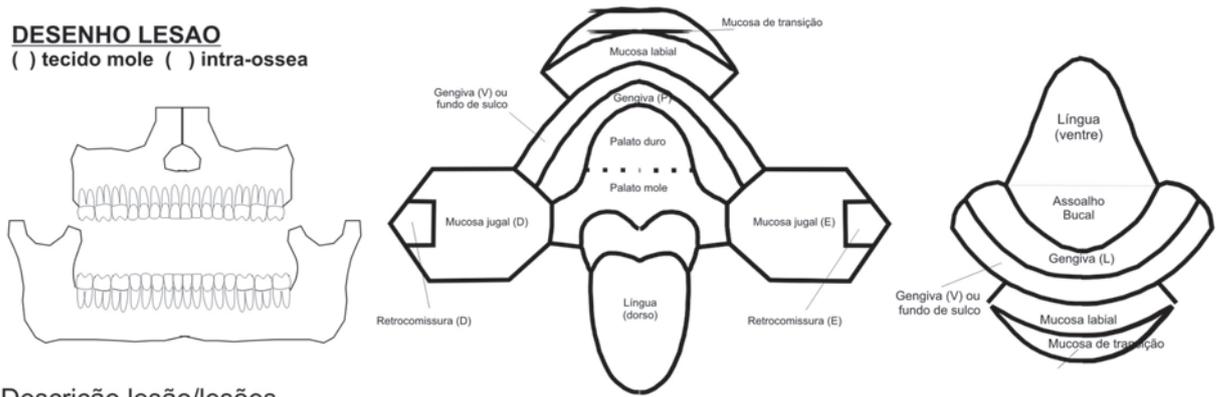
Bom (algumas restaurações, sem cárie)

Regular (presença de cárie e tártaro, mas poucos dentes perdidos)

Muito bom (ausência de cáries, restaurações ou tártaro)

DESENHO LESAO

() tecido mole () intra-ossea



Descrição lesão/lesões

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

Biópsia(s) prévia(s)

Data	Tipo	Localização	Número	DHP

Nova(s) Biópsia(s)

Data	Tipo	Localização	Número	DHP

Nova(s) Biópsia(s)

Data	Localização	Número (s)