



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA

LAVÍNIA TÉRCIA MAGALHÃES DÓREA

DANOS CROMOSSÔMICOS E APOPTOSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DO
EPITÉLIO BUCAL ASSOCIADOS AO HÁBITO DE FUMAR E ÀS LESÕES
PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DO EPITÉLIO ORAL

Feira de Santana
2008

LAVÍNIA TÉRCIA MAGALHÃES DÓREA

DANOS CROMOSSÔMICOS E APOPTOSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DO
EPITÉLIO BUCAL ASSOCIADOS AO HÁBITO DE FUMAR E ÀS LESÕES
PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DO EPITÉLIO ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Coletiva para obtenção do título de Mestre em
Saúde Coletiva.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eneida de Moraes Marcílio
Cerqueira

Feira de Santana
2008

Ficha catalográfica: Biblioteca Central Julieta Carteado

Dórea, Lavínia Tércia Magalhães
D752d Danos cromossômicos e apoptose em células esfoliadas do epitélio bucal associados ao hábito de fumar e às lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral / Lavínia Tércia Magalhães Dórea. – Feira de Santana, 2008.

121 f. : il.

Orientadora: Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)– Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

1. Micronúcleos. 2. Apoptose. 3. Lesões pré-malignas do epitélio oral. 4. Câncer oral. I. Cerqueira, Eneida de Moraes Marcílio. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 616-006.6

LAVÍNIA TÉRCIA MAGALHÃES DÓREA

DANOS CROMOSSÔMICOS E APOPTOSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DO
EPITÉLIO BUCAL ASSOCIADOS AO HÁBITO DE FUMAR E ÀS LESÕES
PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DO EPITÉLIO ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Coletiva para obtenção do título de Mestre em
Saúde Coletiva.

Área de concentração: Epidemiologia

Feira de Santana, 28 de março de 2008

Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Profa. Dra. Maria Cristina Lima de Castro
(Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dedico este trabalho à professora Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira pelos ensinamentos ao longo dessa caminhada, e à minha mãe e à minha irmã por me incentivarem nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira, pela experiência e dedicação que me foi priorizada, além da paciência e dos momentos de amizade e carinho;

Aos professores do curso de Odontologia da UEFS que autorizaram a realização da pesquisa nas Clínicas Odontológicas do Curso, em especial, ao grupo do Centro de Referência de Lesões Bucais coordenada pelo professor Márcio Oliveira, pelo acolhimento;

Ao coordenador do Laboratório de Genética Toxicológica (GENOTOXI) da UEFS, José Roberto Meireles, e aos estagiários do GENETOXI, pela convivência harmoniosa diária e pelo processamento de material;

Aos colegas de curso e aos novos amigos conquistados nessa trajetória, em especial; Leonor, Marcos, Mônica, Patrícia e Tatiane, pela afinidade e pela superação nos momentos de dificuldade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, pela concessão da Bolsa de Mestrado;

Por fim, agradeço àquelas pessoas que me incentivaram e ofereceram palavras de encorajamento e amor em momentos difíceis;

Aos meus pais, Leyca Nogueira Magalhães Dórea e Valter Tadeu Teixeira Dórea, pelo amor incondicional e pela presença constante em todos os momentos da minha vida;

À minha irmã, Larissa Magalhães Dórea pela cumplicidade e amizade;

À minha avó, Noemi Nogueira Magalhães e minha tia, Vera Lúcia Nogueira Magalhães pelo acolhimento e estímulo constante.

"Existir humanamente é pronunciar o mundo,
é modificá-lo."

(Paulo Freire)

RESUMO

O câncer é considerado doença genética, vez que resulta do acúmulo de mutações em genes comprometidos com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou de mutações em genes envolvidos com os mecanismos de reparo do DNA. O câncer oral é precedido por lesões precursoras que induzem mudanças no epitélio oral, podendo ser identificadas antes que a transformação maligna ocorra. Diante do exposto, a utilização de biomarcadores é de grande relevância para o monitoramento de lesões pré-malignas. Estudos epidemiológicos revelam que o câncer bucal e as lesões pré-malignas, estão associados a vários fatores, destacando-se o hábito de fumar e a ingestão de bebidas alcólicas, principalmente quando concomitantes. O objetivo deste estudo foi avaliar, através de protocolo diferenciado do Teste de Micronúcleo, a ocorrência de alterações citológicas, indicativas de danos cromossômicos e de apoptose em células esfoliadas do epitélio oral de indivíduos com lesões pré-malignas e malignas deste epitélio e a possível interação com o hábito de fumar. A amostra analisada incluiu 20 indivíduos com lesões malignas, 11 indivíduos com lesões pré-malignas e 72 indivíduos que não possuem lesões bucais. O material para análise foi coletado por raspagem da mucosa bucal, das regiões com lesão e com aspecto normal, utilizando escova cytobrush. Com o material coletado foi feito esfregaço posteriormente fixado em solução de metanol/ácido acético (3:1). As preparações coradas pelo Feülgen/Fast Green, foram analisadas em teste cego sob microscopia óptica em um mínimo de 1000 células. A ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos com lesões bucais (área de lesão) foi significativamente maior do que o observado tanto nos indivíduos sem lesões bucais quanto quando feita comparação com a mucosa normal dos indivíduos com lesões bucais ($p < 0,00001$). Não foram observadas diferenças significantes na frequência dessas estruturas quando comparadas células coletadas do epitélio oral sem alteração dos portadores de lesões e células obtidas dos indivíduos sem lesões. O número de micronúcleos foi significativamente maior entre as mulheres, entre fumantes e entre os indivíduos que faziam uso de antisséptico. Considerando a ocorrência de micronúcleos entre os grupos em função do diagnóstico (material obtido das áreas de lesão), observa-se que a ocorrência de micronúcleos entre os portadores de câncer foi significativamente maior do que a observada para os indivíduos com lesões pré-malignas e indivíduos sem lesões orais ($p < 0,01$). Não há diferença significativa na ocorrência de micronúcleos quando comparadas células coletadas da área normal dos portadores de lesões malignas, pré-malignas e dos indivíduos sem lesões ($p = 0,1618$). A ocorrência de apoptose foi significativamente menor nas células coletadas tanto das áreas de lesões malignas e pré-malignas, quanto das áreas de mucosa normal dos indivíduos portadores de lesões quando comparados às células dos indivíduos sem lesões ($p < 0,0001$). Os resultados obtidos mostram que: 1) o processo de transformação maligna no epitélio oral envolve um aumento na frequência de células com danos cromossômicos e se faz acompanhar por perda da capacidade celular em evoluir para a morte frente aos danos ao DNA e; 2) componentes do cigarro são efetivos na indução de micronúcleos.

Palavras-Chave: Micronúcleos, Apoptose, Lesões pré-malignas do epitélio oral, Câncer oral

ABSTRACT

The cancer is considered a genetic disease once it results from alterations in genes involved with DNA repair or in genes controlling the cellular proliferation and differentiation. The oral cancer is preceded by precursor stages that induce some changes in cells of oral epithelium. The biomarkers uses are essential for monitoring of premalignant lesions. Epidemiological studies have shown that oral cancer and premalignant lesions are associated with many factors, emphasizing tobacco smoking and alcohol drinking, mainly when in concomitance. The aim of this study was to evaluate through a differentiated protocol of the Micronucleus Test, the frequencies of micronuclei and degenerative nuclear alterations indicative of apoptosis, in exfoliated cells from oral epithelium of individuals presenting premalignant and malignant lesions of this epithelium and possible interaction with smoking habits. The analysed sample consisted of 20 individuals with oral cancer; 11 individuals with premalignant lesions and 72 individuals without oral lesions. Cells were obtained from normal and lesion areas of the cheek by scrapping with a cervical brush. Smears were stained according to Feulgen/ Fast Green. Analysis was performed under light microscopy in a blind fashion in a minimum of 1,000 cells. The frequency of micronucleus was significantly higher in individuals with oral lesions (cells obtained from lesions area), as compared with the frequency observed in individuals without oral lesions and in normal area cells of individuals with lesions ($p < 0.00001$). The frequency of micronucleus was significantly higher between women; between smokers and mouthwashes use. A significant stepwise increase in the frequency of micronuclei was observed in buccal epithelium exfoliated cells, from individuals without lesions to individuals with cancer. Considering the obtained in normal area cells of individuals with lesions e without lesions were not detected differences significant. The frequency of apoptosis was significantly lower in the individuals with oral lesions (as considering lesions exfoliated cells or normal exfoliated cells mucosa) than observed individuals without lesions ($P < 0.0001$). These results show that: 1) the process of malignant transformation involves an increase in the frequency of chromosomal damage and the loss of cell ability in evolving to apoptosis; 2) the components of tobacco are effective to induce micronucleus.

Keywords: Micronucleus; Apoptosis; Premalignant Oral Lesion; Oral Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração esquemática do crescimento celular em células normais e em células cancerosas.	29
Figura 2	Formação de micronúcleo por eventos aneugênico e clastogênico.	31
Figura 3	Diagrama de alterações nucleares degenerativas e célula micronucleada.	32
Figura 4	Delineamento do desenho de estudo caso-controle para avaliar associação entre hábito de fumar e lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral, através do Teste de Micronúcleo	43
Figura 5	Material coletado da mucosa bucal, utilizando escova cytobrush	48
Figura 6	Esfregação do material coletado	48
Figura 7	Fixação do material em metanol/ ácido acético (3:1)	49
Figura 8	Preparações coradas pelo método de Feulgen & Rossenbeck	49
Figura 9	Preparações contra coradas com Fast green à 1%.	50
Figura 10	Lesão Pré-Maligna (Leucoplasia localizado em borda lateral da língua)	62
Figura 11	Lesão Maligna (Carcinoma escamocelular localizado em assoalho de boca)	62
Figura 12	Fotomicrografia de célula esfoliada da mucosa bucal contendo Micronúcleo	66
Figura 13	Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal contendo alterações indicativas de apoptose: Cariorréxis (A); Cromatina Condensada (B) e Picnose (C)	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Proporção entre material coletado e analisado	53
Gráfico 2	Distribuição da idade nos Grupos Caso e Controle	54
Gráfico 3	Distribuição por sexo entre os grupos	55
Gráfico 4	Distribuição em função do diagnóstico e localização da lesão.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados referentes à escolaridade nos Grupos Caso e Controle	56
Tabela 2	Dados referentes à higiene bucal entre os Grupos	56
Tabela 3	Dados referentes ao uso de prótese dentária entre os Grupos	57
Tabela 4	Dados relacionados aos hábitos de fumar e/ou de beber nos Grupos Caso e Controle	60
Tabela 5	Dados relacionados ao uso de antisséptico bucal nos Grupos Caso e Controle	61
Tabela 6	Dados relativos ao diagnóstico das lesões	62
Tabela 7	Dados referentes ao hábito de fumar ou de consumir bebidas alcoólicas entre os portadores de lesões pré-malignas e malignas	65
Tabela 8	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos na amostra total e nos Grupos Caso e Controle	66
Tabela 9	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área de lesão) e Controle	67
Tabela 10	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos no Grupo Caso: área de lesão X área de mucosa normal	67
Tabela 11	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área normal) e Controle	67
Tabela 12	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área de lesão) e Controle, com base no valor da Mediana.	68
Tabela 13	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos no Grupo Caso - área de lesão e área normal, com base no valor da Mediana.	68
Tabela 14	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área normal) e Controle, com base no valor da Mediana.	69
Tabela 15	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do sexo.	69
Tabela 16	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do hábito de fumar.	70
Tabela 17	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do uso de antissépticos bucais.	70
Tabela 18	Análise da ocorrência de micronúcleos em função do número máximo de cigarros diários.	71
Tabela 19	Análise da ocorrência de micronúcleos em função da duração do hábito de fumar.	71
Tabela 20	Dados referentes à ocorrência de micronúcleos na amostra total e nos	72

Grupos I, II e III

Tabela 21	Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos sem lesão (Grupo Controle) e com lesões Pré-Malignas e Malignas	72
Tabela 22	Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos normais (Grupo Controle) e de mucosa normal dos indivíduos dos Grupos II e III.	73
Tabela 23	Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos fumantes relativa ao diagnóstico	74
Tabela 24	Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos não-fumantes relativa ao diagnóstico	74
Tabela 25	Avaliação da ocorrência de micronúcleos por tipo diagnóstico relativa ao hábito de fumar.	75
Tabela 26	Dados referentes à ocorrência de apoptose nos Grupos I, II e III (área de lesão).	76
Tabela 27	Dados referentes à ocorrência de apoptose nos Grupos I, II e III (área de mucosa normal).	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Câncer Oral e suas Lesões precursoras	20
2.2	Fatores de risco associados às lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral	21
2.2.1	Hábito de fumar e outras formas de contato com o tabaco	21
2.2.2	Ingestão de bebidas alcoólicas	23
2.2.3	Hábitos alimentares	24
2.2.4	Uso de antisséptico bucal	25
2.2.5	Condição dental e irritação traumática	26
2.2.6	Infecção pelo HPV	27
2.3	Danos cromossômicos, apoptose e carcinogênese oral	28
2.3.1	Observação da ocorrência de danos cromossômicos no epitélio oral: O Teste de Micronúcleo	30
2.3.2	Efeitos genotóxicos do consumo de tabaco	33
2.3.3	Efeitos sinérgicos dos hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas na indução de danos cromossômicos	35
2.3.4	Danos cromossômicos associados ao uso de antissépticos bucais e à condição dental	37
2.3.5	Danos genéticos e progressão à transformação neoplásica	37
3	OBJETIVOS	40
4	METODOLOGIA	42
4.1	Tipo de Estudo	43

4.2	Campo de Estudo	44
4.3	População do estudo	44
4.4	Variáveis do Estudo	46
4.5	Técnicas e instrumentos de coleta de dados	46
4.5.1	Dados pertinentes à caracterização da amostra	46
4.5.2	Parâmetros considerados ao exame clínico	47
4.5.3	Obtenção do material para estudo histopatológico	47
4.5.4	Obtenção do material para estudo citológico	47
4.5.5	Preparações citológicas	49
4.5.6	Análise de micronúcleos e fenômenos nucleares indicativos de apoptose	50
4.6	Elaboração do Banco de Dados e Análise Estatística	50
4.7	Aspectos Éticos	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Material Analisado	53
5.2	Características da Amostra	54
5.3	Caracterização das Lesões Pré-Malignas e Malignas	61
5.4	Análise Citológica (Micronúcleo e Apoptose)	65
5.4.1	Análise de Micronúcleo	65
5.4.2	Análise de Apoptose	75
6	DISCUSSÃO	77
6.1	Aspectos metodológicos relevantes	78
6.2	Perfil da amostra estudada	79
6.3	Sítio de origem das lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral	82

6.4	Ocorrência de micronúcleos	83
6.4.1	Ocorrência de micronúcleos em função dos parâmetros avaliados	84
6.4.2	Ocorrência de micronúcleos na progressão da transformação maligna	89
6.4.3	Influência do hábito de fumar na ocorrência de micronúcleos em função do diagnóstico da lesão	91
6.5	Ocorrência de apoptose	92
7	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO 1	115



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A industrialização, a urbanização, o aumento da expectativa de vida e adoção de novos hábitos e estilo de vida refletiram diretamente em mudanças no perfil de morbi-mortalidade da população mundial. Esse processo de mudança, conhecido como Transição Epidemiológica, representa uma substituição das doenças infecto-parasitárias pelas doenças crônico-degenerativas, merecendo destaque entre estas as doenças cardiovasculares e o câncer (SILVA JR, 2003).

O câncer constitui importante problema de Saúde Pública tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Em 2000, representou 12,6% dos óbitos ocorridos em todo o mundo; 21,6% e 9,8% nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas a nível mundial, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Do total de óbitos ocorridos no referido ano, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Estimativas apontam para o ano de 2020 que pelo menos 15 milhões de pessoas poderão ser consideradas de alto risco para o desenvolvimento desta doença, estimando-se 60% de casos novos apenas para os países em desenvolvimento (BRASIL, 1996; OLIVEIRA; FARIA, 1997; WHO, 2002; BIAZEVIC et al., 2006; WHO, 2007).

No Brasil, o câncer constitui-se na segunda causa de morte por doença (BRASIL, 2005). As estimativas sobre sua incidência neste país, publicadas bianualmente pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Ministério da Saúde, indicam que em 2008, ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (231.860 homens e 234.870 mulheres serão acometidos por essa doença), sendo previsto 78.960 casos novos para a região Nordeste (BRASIL, 2007). Na última publicação realizada pelo INCA, as estimativas para o ano de 2006 foram de 472.050 pessoas acometidas pelo câncer (74.790 casos para a região Nordeste) (BRASIL, 2005). Estes dados revelam que no país como um todo haverá uma redução na incidência de câncer, mas quando se considera isoladamente a região nordeste as estimativas apontam para o aumento de 4.170 casos.

Os cânceres de cabeça e pescoço correspondem a 10% dos tumores malignos em todo o mundo e aproximadamente 40% deles têm localização na cavidade oral (SUNILA; ANITA, 2003).

O câncer de boca figura entre os dez tumores mais incidentes em todos os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) brasileiros, segundo dados do INCA. Dados estimados

para o ano de 2008 apontam que, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, o câncer da cavidade oral será o quinto tipo mais incidente entre os homens e o sétimo em incidência entre as mulheres (BRASIL, 2007).

Os agravos na cavidade oral, principalmente o câncer bucal, e conseqüentemente suas seqüelas, persistem no país, com graves implicações sociais e econômicas (FERNANDES; PERES, 2005). Além dos elevados custos para os serviços de saúde e de suas características mutiladoras, o câncer bucal apresenta alta letalidade, de modo que necessário se faz um maior conhecimento sobre a intrincada rede de mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa neoplasia de modo a subsidiar políticas de saúde voltadas para sua prevenção.

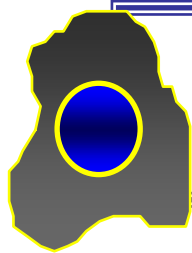
Syrjänen (2005) refere que os cânceres de cabeça e pescoço tendem a ser diagnosticados tardiamente em razão de só provocarem dor em seus estágios avançados. Em conseqüência, a taxa de sobrevivência é de apenas 40% a 50%. Em relação ao câncer de boca, avaliação preliminar dos dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC), do Hospital do Câncer/INCA mostrou que 60% dos indivíduos chegam aos serviços com a doença já em fase avançada, sem possibilidade, portanto, de tratamento o que ressalta a necessidade de adoção de efetivas ações preventivas e de diagnóstico precoce.

Os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento do câncer oral incluem o hábito de fumar e o uso de bebidas alcoólicas, principalmente quando associados. Mais recentemente, a infecção pelos tipos oncogênicos do Vírus do Papiloma Humano (HPV) tem sido relatada em associação com essa neoplasia (ZAVRAS et al., 2001; WÜNSCH-FILHO, 2002; LA VECCHIA et al., 2004; IARC, 2004; SYRJÄNEN, 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2005). Uso de antissépticos bucais e higiene bucal precária, dieta pobre em vegetais e frutas e rica em gorduras, condição dental precária e próteses mal adaptadas, com conseqüente traumatismo da mucosa oral, têm também sido associados a essa neoplasia, embora de modo menos consistente (VELLY et al., 1998; MACKENZIE et al., 2000; MORENO-LÓPEZ et al., 2000; HOMANN et al., 2001; TOPORCOV et al., 2004).

Sabendo-se, hoje, que o câncer é doença genética, resultante de alterações em genes envolvidos com o reparo do DNA ou comprometidos com o controle da proliferação e da diferenciação celular, é possível supor que esses fatores atuem induzindo a ocorrência de mutações gênicas e aberrações cromossômicas que comprometam o funcionamento de alguns desses genes (WÜNSCH-FILHO; GATTÁS, 2001; Mc CABE; DAMINI, 2005; DUENSING;

DUENSING, 2005). É provável que alguns desses fatores atuem como co-fatores de outros ou que interajam de modo aditivo ou sinergisticamente (FRANCESCHI et al., 2000; MORENO-LÓPEZ, 2000; HOMANN et al., 2001).

A identificação de marcadores que apontem para o potencial das lesões precursoras em evoluir para o processo de transformação maligna, se constitui em valiosa ferramenta na prática médica/odontológica, norteador a conduta terapêutica a ser adotada. Micronúcleos, estruturas que revelam a ocorrência de danos cromossômicos podem se constituir em excelentes marcadores de progressão maligna, apontando, com base na frequência com que ocorrem para o acúmulo de danos genéticos que caracteriza o processo maligno, processo associado, também, à perda da capacidade celular em evoluir para a morte (apoptose). O baixo custo da utilização do Teste de Micronúcleo e a facilidade de análise dessas estruturas permitem utilização ao nível populacional. Nesta perspectiva, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações citológicas, indicativas de danos cromossômicos e de apoptose em células esfoliadas do epitélio oral de indivíduos com lesões pré-malignas e malignas deste epitélio e a possível interação com o hábito de fumar.



Revisão de **L**iteratura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer Oral e suas Lesões precursoras

O carcinoma escamocelular da cavidade oral, a exemplo de outros cânceres que acometem os tecidos epiteliais, é precedido por lesões precursoras que induzem mudanças morfológicas no epitélio oral, as quais são detectadas clinicamente (SARAN et al., 2007).

As lesões pré-malignas da cavidade oral têm sido classificadas sob diversos aspectos por diferentes autores. Existe, no entanto, consenso no reconhecimento de que a leucoplasia, eritroplasia, leucoeritroplasia e, consideradas mais recente, a displasia liquenóide são lesões com potencial em evoluir para a transformação maligna (RODRIGUES et al., 2000; KUFFER; LOMBARDI, 2002; MEIJ et al., 2006; FREITAS et al., 2006).

A leucoplasia é a lesão pré-maligna mais freqüente da cavidade bucal, definida, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1978) como lesão ou placa predominantemente branca que se desenvolve no epitélio oral, não removível à raspagem, que não pode ser caracterizada clinicamente como outra enfermidade. Sua superfície pode apresentar-se lisa, rugosa ou verrucosa (FREITAS et al., 2006). Histopatologicamente apresenta uma variedade de características, sendo a hiperqueratose e a displasia epitelial em vários graus, os achados mais importantes, em função do potencial para transformação maligna (SCULLY; CAWSON, 1996; SCHEPMAN et al., 1998; SCULLY; SUDBO; SPEIGHT, 2003). As leucoplasias se desenvolvem preferencialmente nas bordas e face ventral da língua, no assoalho da boca e na mucosa jugal (SHIU; CHEN, 2004; LEE et al., 2006).

A eritroplasia é definida como uma placa vermelha que não pode ser caracterizada clínica ou anatomopatologicamente como outra lesão. Apesar de ser menos comum que a leucoplasia, a eritroplasia possui um potencial mais elevado de transformação maligna, em função dos achados histopatológicos mostrarem com freqüência a presença de carcinoma in situ, displasia epitelial severa e carcinoma microinvasivo (NEVILLE et al., 2004; REICHART; PHILIPSEN, 2005). O assoalho de boca, mucosa bucal e o palato mole correspondem aos sítios mais comuns para seu desenvolvimento. As eritroplasias podem se apresentar em associação com leucoplasias ou em áreas adjacentes a estas, representando uma combinação de lesões brancas (leucoplasia) com

lesões vermelhas (eritroplasia), originando o termo eritroleucoplasia (REICHART; PHILIPSEN, 2005).

As lesões liquenóides, ou displasia liquenóide, como o próprio nome indica, referem-se a lesões com aspecto e características de líquen plano, ao exame histopatológico, contudo são evidenciadas alterações displásicas (EISENBERG; KRUTCHKOFF, 1992).

Além dessas lesões, o líquen plano oral tem sido alvo de expressivo número de estudos objetivando avaliar seu potencial em evoluir para o câncer, mas os resultados desses estudos são controversos não havendo, portanto, consenso na classificação deste tipo de lesão como pré-maligna (HIETANEN et al., 1999; MOLLAOGLU, 2000; MIGNOGNA et al., 2002; MEIJ et al., 2003; LODI et al., 2005; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006; MEIJ et al., 2006).

2.2 Fatores de risco associados às lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral

O processo de transformação maligna, maioria das vezes, é iniciado pela ação genotóxica de agentes presentes no meio ambiente, os denominados agentes mutagênicos, que são de natureza química, física ou biológica.

Na avaliação dos fatores que levam ao desenvolvimento desse processo é importante destacar as diferenças individuais relativas à capacidade de metabolizar mutágenos/ carcinógenos e de reparar danos ao DNA, mecanismos estes que modulam a estabilidade genômica e, conseqüentemente, a ativação de protooncogenes a oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (SCHANTZ et al., 1997; RYDZANICZ et al., 2005; DRUMMOND et al., 2005).

Em relação ao câncer bucal, como já comentado, alguns fatores têm sido de modo muito consistente apontados como de risco para o seu desenvolver, enquanto outros são menos consistentemente mostrados em associação com esta neoplasia.

2.2.1 Hábito de fumar e outras formas de contato com o tabaco

O hábito de fumar é o fator de risco mais consistentemente associado ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral, particularmente quando em concomitância

com a ingestão de bebidas alcoólicas (FRANCO et al., 1989; FRANCESCHI et al., 1990; JOHNSON et al., 1996; ZAVRAS et al., 2001; LLEWELLYN et al., 2003).

No tabaco do cigarro industrializado e na fumaça que dele se desprende, podem ser identificadas mais de 4.000 substâncias tóxicas (HUSGAFVEL-PURSIAINEN, 2004). Dentre estas, 200 são tóxicas para o homem e 50 apresentam ação carcinogênica conhecida, destacando-se os hidrocarbonetos policíclicos e as nitrosaminas específicas do tabaco encontradas no alcatrão (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2004). Outras substâncias carcinogênicas como o níquel e o cádmio, elementos radioativos como o carbono 14 e polônio 210, e até resíduos de agrotóxicos utilizados na lavoura do tabaco, como o DDT, podem também ser encontrados no tabaco e na fumaça dele desprendida.

Certas enzimas podem metabolizar os hidrocarbonetos do tabaco transformando-os em carcinógenos mais potentes, a exemplo da Aril Hidrocarbono Hidroxilase (AHH) que é efetiva em incrementar o potencial carcinogênico do benzopireno, aumentando os riscos de desenvolvimento de tumores nos fumantes que a produzem em níveis aumentados. Adicionalmente à ação dos carcinógenos do tabaco, o calor desprendido por sua combustão potencializa as agressões sobre a mucosa da cavidade bucal (DEMARINI, 2004).

Diversos estudos epidemiológicos apontam para a associação entre hábito de fumar e carcinogênese oral, destacando, em sua maioria, os efeitos da intensidade e da duração do hábito (BLOT et al., 1996; MORENO-LÓPEZ et al., 2000).

Entre os estudos em que foram avaliadas amostras populacionais brasileiras, cujos resultados apontam para a associação entre hábito de fumar e câncer oral, destacam-se os realizados em Salvador-Bahia por Reis et al. (1997); o de Leite et al. (1998), desenvolvido em hospital de referência de câncer na cidade do Rio de Janeiro e um estudo do tipo caso-controle abrangendo as cidades de São Paulo, Curitiba e Goiânia (FRANCO et al., 1989).

Avaliando amostras populacionais do sul da Grécia, Zavras et al. (2001) descreveram os efeitos independentes do hábito de fumar no incremento dos riscos de desenvolvimento de câncer, particularmente entre os homens.

Efeitos da intensidade do hábito de fumar foram observados por Moreno-López et al. (2000) em indivíduos residentes em Madrid (Espanha). As *Odds Ratio* calculadas para fumantes de menos de 20 cigarros/dia e fumantes de mais de 20 cigarros/dia, foram, respectivamente de 3,1 e 7,96.

É também reconhecido que o uso, não apenas do cigarro, mas, também, do cachimbo e charuto multiplica o risco de câncer de lábio, boca, língua e faringe, dependendo do tipo e da quantidade utilizada de tabaco (SILVERMAN; SHILLITOE, 1990).

Shanks; Burns (1998) avaliaram diversos estudos realizados com populações européias e dos Estados Unidos e observaram que os riscos de câncer oral e de faringe são similares entre os fumantes de cigarro e de cachimbo.

Os hábitos de mascar tabaco, areca-nut e betel quid são também considerados fatores de risco para o desenvolvimento tanto de lesões pré-malignas quanto de lesões malignas do epitélio oral (JOHNSON et al., 1996; MOORE et al., 2000; IARC, 2003; LEE et al., 2003; WU et al., 2004).

Relatórios da Índia revelam uma alta prevalência de câncer oral (15% a 65%) em indivíduos que fazem uso do tabaco em diferentes combinações, destacando a alta incidência destes tumores entre os usuários de betel nut (SILVERMAN; SHILLITOE, 1990).

O uso do rapé também está relacionado ao desenvolvimento do câncer bucal, principalmente quando mascado. Este modo de consumo do tabaco propicia contato mais prolongado com a mucosa oral, favorecendo a ação de substâncias cancerígenas. Estudo clínico, do tipo caso-controle, realizado na Carolina do Norte (sul dos Estados Unidos), incluindo 225 mulheres com câncer oral e da faringe e 502 sem lesões (controles), revelou mortalidade excepcionalmente alta entre as usuárias do rapé, estando as lesões orais localizadas nas regiões bucogengivais onde o rapé fica retido (WINN et al., 1981).

2.2.2 Ingestão de bebidas alcoólicas

Alguns estudos apontam o excesso de ingestão de bebidas alcoólicas como fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma de boca, faringe, laringe, esôfago, fígado e pulmão (BLOT et al., 1988; IARC, 1988; SILVERMAN; SHILLITOE, 1990; LONGNECKER, 1995; SEITZ et al., 1998; SALASPURO, 2003).

Estudo realizado por Trieiger e Taylor, ainda em 1958, mostrou que 44% de 108 indivíduos com carcinoma de língua e 59% de 68 indivíduos com câncer de assoalho de boca, palato e fossa tonsilar exibiam também cirrose hepática. Aproximadamente 75% dos indivíduos

que integraram os grupos analisados relataram excessivo consumo de álcool. Dois outros estudos confirmaram a associação entre cirrose hepática, excessivo consumo de álcool, fumo excessivo e carcinoma de assoalho de boca e faringe (KELLER, 1963, 1967). Wynder et al. (1957) relataram que 33% das mulheres que sofriam de câncer oral bebiam mais que sete doses de uísque por dia.

Reis et al. (1997) mostraram que o risco relativo de câncer da cavidade oral e da orofaringe difere com o tipo de bebida alcoólica consumida, sendo maior nos bebedores de cachaça. Os autores observaram ainda que o uso de tabaco associado à ingestão de bebidas alcoólicas constitui um agravante na gênese dessas neoplasias.

Em estudo do tipo caso-controle, realizado em três capitais brasileiras, foi também relatado que a cachaça representa importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer da cavidade oral (FRANCO et al., 1989).

Tem sido sugerido que o álcool provavelmente age como um co-fator, incrementando o potencial carcinogênico dos componentes do tabaco em induzir o câncer (ROTHMAN; KELLER, 1972; GRANVIL et al., 1995; LA VECCHIA et al., 1997; DU et al., 2000).

Os mecanismos pelos quais a ingestão de bebidas alcoólicas resulta na elevação do risco de desenvolvimento do câncer oral permanecem, contudo, obscuros. La Vecchia et al. (1997) sugerem que o álcool pode atuar como um solvente, facilitando a passagem de carcinógenos, especialmente daqueles presentes no tabaco, através da membrana celular. Além disso, segundo estes autores, o álcool estaria relacionado à carcinogênese através do aumento da atividade metabólica do fígado, o que poderia ativar substâncias carcinogênicas, ou através de alterações induzidas diretamente no metabolismo do tecido epitelial alvo.

2.2.3 Hábitos alimentares

A *World Health Organization* (WHO, 2003) reconhece que mais de 30% dos cânceres humanos estão provavelmente relacionados com a dieta. Em relação ao câncer oral, alguns estudos sugerem que a dieta rica em alimentos com alto valor calórico, e pobre em frutas e vegetais está relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento deste câncer (FRANCO et al., 1989; ZHENG et al., 1993; KEY et al., 2002, TOPORCOV et al., 2004).

Por outro lado, estudos conduzidos nas últimas duas décadas têm evidenciado o possível efeito protetor de alguns alimentos e micronutrientes, destacando-se entre estes as vitaminas A, C, E, os carotenóides (principalmente o beta-caroteno) e o selênio, tanto para o desenvolvimento das lesões pré-malignas quanto do câncer oral (ENWONWU; MEEKS, 1995; GAREWAL, 1995; GUPTA et al., 1999; DU et al., 2000).

O efeito protetor de alguns desses micronutrientes, tem sido atribuído à sua atividade antioxidante, à modulação do metabolismo de carcinógenos e inibição da proliferação e da expressão de oncogenes (ZAIN, 2001).

A contribuição de uma dieta rica em gorduras para o desenvolvimento do câncer não está, contudo, totalmente elucidada. Archer (1997) sugere que o efeito carcinogênico de uma dieta rica em gordura animal está associado com a ingestão de nitrosaminas (presentes em alimentos defumados e nos conservantes de alimentos), e de aminas heterocíclicas (carcinógenos formados quando o alimento é processado em elevadas temperaturas). É geralmente reconhecido que esse grupo de alimentos é um importante modulador da carcinogênese (WOUTERSEN et al., 1999; GREENWALD; CLIFFORD; MILNER, 2001).

2.2.4 Uso de antisséptico bucal

Os antissépticos bucais, em sua maioria, soluções alcoólicas, têm sido apontados, por alguns autores, entre os fatores que podem contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento do câncer oral.

Risco aumentado para o desenvolvimento desse câncer, associado ao uso regular de bochechos com antissépticos de alto teor alcoólico (superior a 25%) foi descrito por Winn et al. (1991), em amostra constituída por 886 indivíduos com câncer bucal e faríngeo e 1.249 controles. Resultados semelhantes foram obtidos por Reis et al. (1997) em estudo do tipo caso-controle. Associação entre uso de antissépticos bucais e o desenvolvimento de câncer bucal e da orofaringe foi, também, observada Winder et al. (1983) e em mulheres da Carolina do Norte por Blot et al. (1988).

Em alguns estudos, no entanto, não foram obtidas evidências epidemiológicas consistentes que suportem a associação entre o uso de antissépticos e câncer oral (KABAT et al., 1989; ELMORE; HORWITZ, 1995; WINN et al., 2001).

2.2.5. Condição dental e irritação traumática

Irritações crônicas causadas por dentes irregulares, restaurações dentais inacabadas e próteses mal adaptadas foram em estudos menos recentes apontadas como fatores de risco para o câncer oral (BUNDGAARD et al., 1995; REIS et al., 1997; SCHILDT et al., 1998; VELLY et al., 1998). Resultados de estudos mais recentes, contudo, são inconsistentes para o estabelecimento de tal associação (TOPORCOV et al., 2004).

Reis et al. (1997) observaram em estudo do tipo caso-controle, realizado em Salvador, Bahia, que o uso de próteses mal adaptadas representa um fator de risco fortemente associado ao desenvolvimento de câncer da mucosa oral. Os autores relataram também que a presença de dentes fraturados se constitui em fator que está associado ao desenvolvimento desta neoplasia.

Alguns estudos epidemiológicos mostram que uma inadequada higiene oral, condição dental precária e edentulismo constituem fatores de risco para o desenvolvimento de câncer na cavidade oral (BUNDGAARD et al., 1995; SCHILDT et al., 1998; VELLY et al., 1998; MORENO-LÓPEZ et al., 2000).

Homann et al. (2001) observaram efeito sinérgico entre o uso de bebidas alcoólicas e péssima condição dental. Indivíduos que ingeriam quantidades excessivas de álcool e apresentavam dentes em condições precárias produziram duas vezes mais acetaldeído (primeiro metabólito carcinogênico do álcool) na saliva, quando comparados a indivíduos com hábitos etílicos, porém com boa higiene oral e, conseqüentemente, melhor estado dental. Em relação aos benefícios introduzidos pela higiene bucal de boa qualidade, estudo do tipo caso-controle conduzido em Madri (Espanha) apontou para o efeito protetor desta prática em relação ao câncer bucal, minimizando os efeitos dos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas (MORENO-LÓPEZ et al., 2000).

2.2.6 Infecção pelo HPV

As infecções virais estão relacionadas ao desenvolvimento de tumores através de uma série de mecanismos que incluem o estímulo da proliferação, a inativação de genes supressores de tumor e a imunossupressão. Segundo Zur Hausen (1991), cerca de 15% dos cânceres são associados a infecções virais. A relação entre a infecção pelos Vírus da Hepatite B (HBV); do Epstein-Barr (EBV); Papilomavírus (HPV) e da Leucemia das células T (HTVL – I) com o desenvolvimento de tumores é fato já estabelecido.

A infecção pelo HPV é o fator de natureza biológica mais consistentemente associado ao câncer oral (MINETA , OGINO, AMANO, 1998; MORK, LIE, GLATTRE, 2001; SYRJÄNEN, 2005).

Já foram isolados 16 diferentes tipos de HPV (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 e 57) em lesões orais (MILLER; WHITE, 1996). Alguns dos tipos de HPV são de baixo risco para o desenvolvimento do câncer oral (6, 11,13,32) e estão associados a lesões papilomatosas benignas (Papiloma, Condiloma Acuminado, Verruga Vulgar e Hiperplasia Epitelial Focal). Tais lesões apresentam baixo potencial para a progressão maligna. Os HPVs que têm potencial para a malignização são, principalmente, os 16, 18, 31, 33 e 35. A infecção por estes tipos de HPVs está freqüentemente associada a displasias epiteliais e carcinomas de células escamosas da cavidade oral e do cérvix uterino (DURST et al., 1983; MILLER; ZEUSS; WHITE, 1994; ROMAN; SEDANO, 1994; MAO; SEATTLE, 1995; WARD et al., 1995; FORNATORA et al., 1996; MILLER; WHITE, 1996; MINETA, OGINO, AMANO, 1998; MORK, LIE, GLATTRE, 2001; SCULLY, 2002; SYRJÄNEN, 2005).

É importante destacar que embora os HPVs 6 e 11 sejam considerados de baixo risco para o desenvolvimento do câncer oral, sua presença foi observada em 68% de uma amostra de 19 portadores desta neoplasia, o que sugere seu envolvimento na patogênese dos carcinomas orais (WARD et al., 1995).

A presença do papilomavírus na mucosa oral normal, nas lesões pré-malignas e lesões malignas foi investigada por Miller; White (1996) em estudo retrospectivo. Os dados obtidos revelaram a presença do HPV tanto na mucosa normal (13,5%) quanto nas lesões pré-malignas (14,8% das leucoplasias) e malignas (26,2% dos carcinomas escamocelulares e 27% dos carcinomas verrucosos). Os tipos de HPV encontrados em 81,4% da amostra foram o 2, 16 e 18.

Estudo objetivando identificar a prevalência do HPV16 em células da mucosa oral de 26 indivíduos com câncer oral evidenciou associação entre a infecção por este tipo de vírus e a neoplasia sob estudo (MAO; SEATTLE, 1995).

No México, Ibieta et al. (2005) realizaram estudo que incluiu 51 indivíduos com câncer oral. Os autores observaram que 42% destes indivíduos apresentaram infecção por HPV, destacando-se o do tipo 16, presente em 66,6% dos casos. A avaliação da associação entre HPV, hábito de fumar e ingestão de bebidas alcoólicas revelou que estes fatores são independentes, uma vez que foi observada igual distribuição desses hábitos entre os indivíduos HPV positivos e HPV negativos: 81% e 79%, respectivamente.

O papel de outros vírus na carcinogênese oral tem também sido investigado, havendo registro na literatura que aponta para efeito sinérgico entre a infecção pelo Vírus do Herpes Simples Tipo 1 e o hábito de fumar (MURRAH; GILCHRIST; MOYER, 1996).

2.3 Danos cromossômicos, apoptose e carcinogênese oral

Muitos cânceres humanos são de origem epitelial, sendo que 92% deles são derivados do epitélio de revestimento, incluindo o epitélio da mucosa bucal (SALAMA; SERRANA; AU, 1999). Tal como ocorre com outros tipos de câncer, o processo de transformação maligna no epitélio oral está associado à ocorrência de alterações genéticas (mutações gênicas e aberrações cromossômicas) que inativam genes supressores de tumor ou de reparo do DNA, ou que ativam protooncogenes a oncogenes. Em consequência, ocorre a perda do controle do crescimento celular organizado o qual depende da atuação harmônica de uma intrincada rede de sinais internos e externos, que determinam o momento em que uma célula normal deverá crescer, diferenciar, entrar no processo de divisão celular ou morrer (Figura 1).

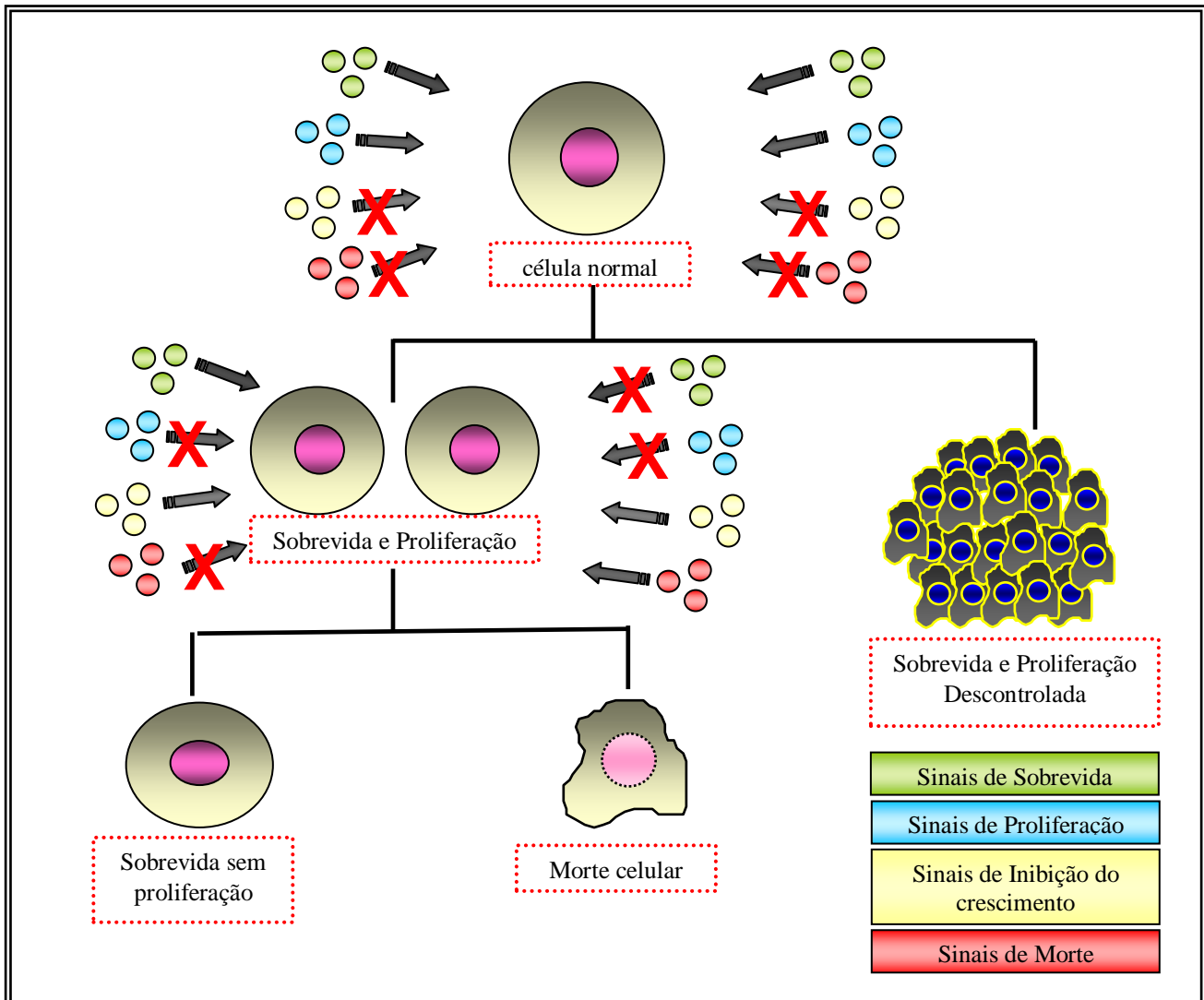


Figura 01: Ilustração esquemática do crescimento celular em células normais e em células cancerosas. (Adaptado de Griffiths et al., 2006).

A perda da capacidade celular em evoluir, frente à ocorrência de danos genéticos, para a morte, processo denominado apoptose, é uma das características mais marcantes do processo maligno. Apoptose é um processo geneticamente controlado de morte celular, que ocorre em condições normais para eliminar células que não são mais necessárias ao organismo ou, como já comentado, em resposta à injúria genotóxica. A compreensão dos eventos moleculares envolvidos no processo apoptótico tem avançado consideravelmente nos últimos anos, sendo o núcleo considerado importante alvo de remodelação durante esse processo, do qual participam

muitas proteínas sob a regência da p53 (SCHULTE-HERMANN; GRASL-KRAUPP; BURSCH, 2000; MILLER et al., 2002). Numerosos são os trabalhos evidenciando a relação entre p53 normal e apoptose, ou correlacionado mutações no gene da p53 e inibição deste processo (YONISH-ROUACH et al., 1991; SHAW et al., 1992; CLARKE et al., 1993; LOWE et al., 1993; HEMEKLING ; EICK, 1994; WAGNER; KOKONTIS; HAY, 1994). A investigação da associação de danos cromossômicos, traduzidos por micronúcleos, e inibição de apoptose tem sido, contudo, pouco explorada.

2.3.1 Observação da ocorrência de danos cromossômicos no epitélio oral:

O Teste de Micronúcleo

A avaliação da ocorrência de danos cromossômicos no epitélio oral e sua relação com a carcinogênese oral pode ser feita utilizando o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, como sugerido desde 1982 por Stich; Curtis; Parida.

Micronúcleos são formados por cromossomos inteiros ou por fragmentos cromossômicos que durante a divisão celular falham em sua ligação ao fuso não sendo, portanto, incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma como estruturas semelhantes ao núcleo embora de menor tamanho (HEDDLE et al., 1983). Revelam, portanto, a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (Figura 2). Sua frequência representa um índice composto de aberrações cromossômicas em uma determinada população celular e informa a ocorrência do dano genético diretamente no tecido sob exposição.

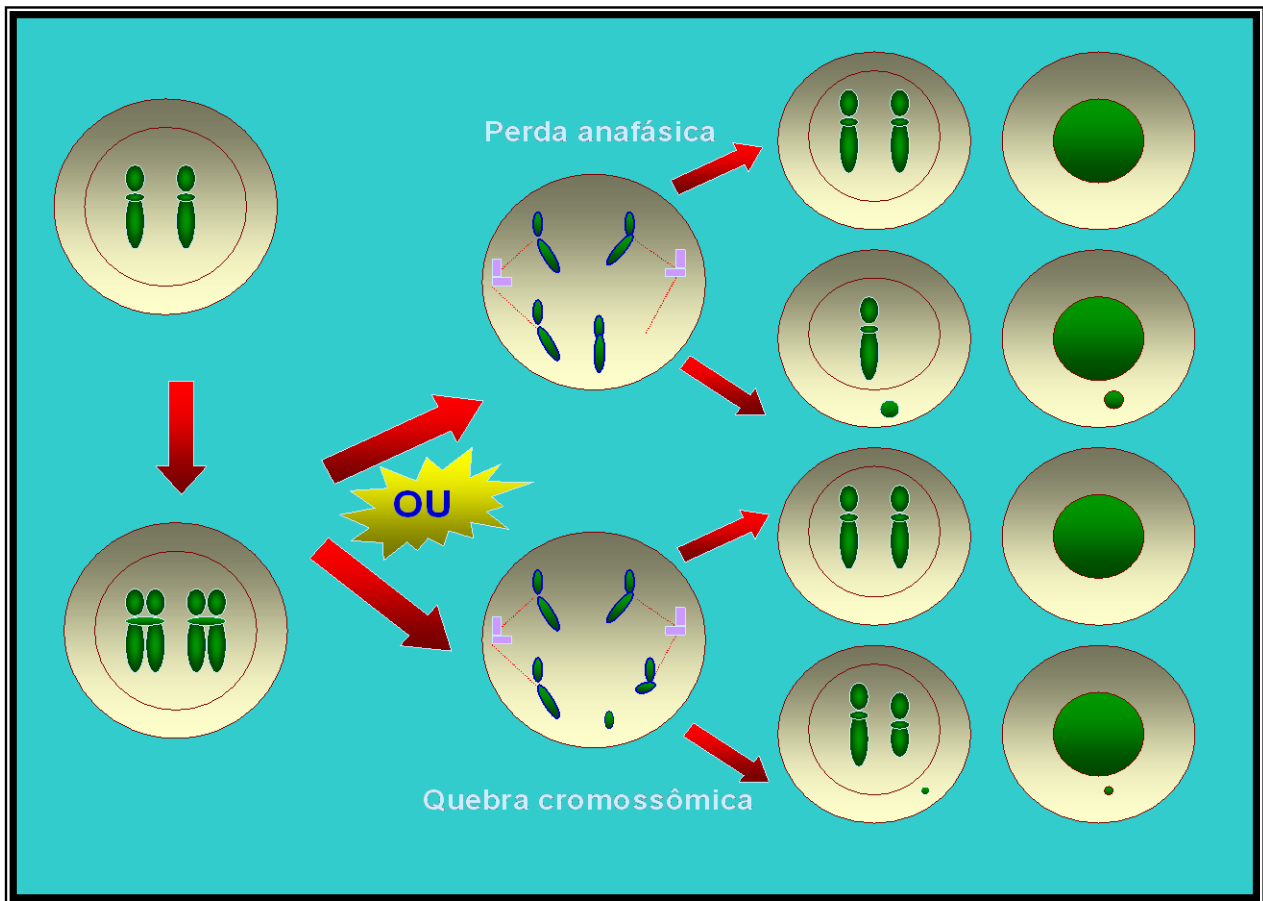


Figura 2: Formação de micronúcleo por eventos aneugênico e clastogênico.
(Ilustração cedida pela Profa. Dra. Eneida Moraes de Marcílio Cerqueira).

O Teste de Micronúcleo em células esfoliadas é considerado valiosa ferramenta na avaliação de danos citogenéticos uma vez que:

- Permite uma estimativa da frequência com que alterações cromossômicas são produzidas nas células;
- A técnica de obtenção e preparo do material a ser utilizado é simples e de baixo custo uma vez que os micronúcleos são observados em células interfásicas;
- Os micronúcleos são vistos em preparações citológicas realizadas rotineiramente e nestas são facilmente observados, o que diminui o risco de erros de interpretação;
- Fornece evidência da ocorrência de danos genéticos diretamente no tecido sob exposição a um agente mutagênico, e se esse agente é carcinogênico, informa precisamente onde um tumor poderá se desenvolver.

Em preparações destinadas à observação de micronúcleos em células esfoliadas, é possível identificar outras alterações nucleares, próprias de um epitélio que se renova, mas que em níveis excessivos são indicativas de injúria celular: picnose, cromatina condensada, cariorréxis e cariólise (Figura 3). Segundo Tolbert; Shy; Allen (1991, 1992) estas alterações refletem efeitos genotóxicos e citotóxicos de uma dada exposição e são *per se* associadas à iniciação e promoção do processo carcinogênico. De acordo com esses autores, o computo dessas alterações deve ser feito separadamente, permitindo assim otimizar a sensibilidade e especificidade do Teste de Micronúcleo.

A picnose, cromatina condensada e cariólise acompanham a queratinização, que acontece como resposta adaptativa a um dano celular em epitélios que normalmente não são queratinizados (PINDBORG et al., 1980). A ocorrência de cariorréxis, adicionalmente a essas alterações, ocorre em células sofrendo necrose, ou seja, morte celular conseqüente à ação de agentes exógenos ao ambiente celular (WYLLIE, 1981). A ocorrência de queratinização e necrose são indicativas de citotoxicidade podendo estar associadas à promoção de câncer via estimulação da proliferação celular (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

A picnose, cromatina condensada e cariorréxis acompanham estágios precoces da apoptose (processo geneticamente controlado de morte celular). A presença dessas alterações em frequências elevadas é indicativa de genotoxicidade e está relacionada à iniciação do processo de transformação maligna (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1991).

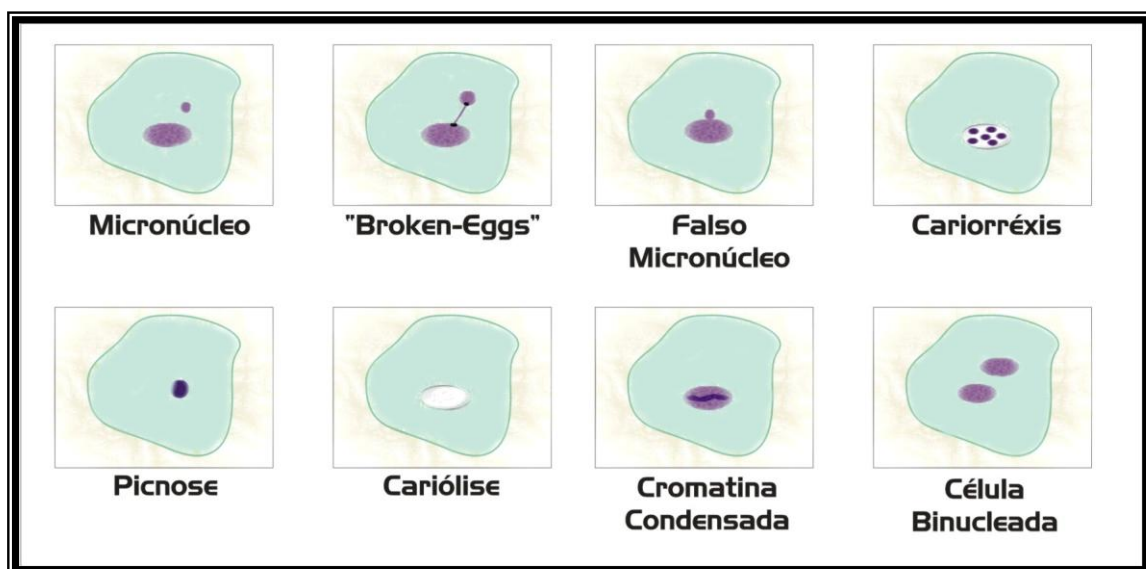


Figura 3: Diagrama de alterações nucleares degenerativas e célula micronucleada (Modificado de Tolbert et al., 1991. Ilustração cedida por Viviane Costa Junqueira).

2.3.2. Efeitos genotóxicos do consumo de tabaco

A relação entre câncer e hábito de fumar, observada nos epitélios em contato com componentes do cigarro, se deve ao potencial mutagênico e carcinogênico de vários destes componentes. Alterações cromossômicas em células do epitélio oral associadas ao uso do tabaco têm registro na literatura (OZKUL et al., 1997; BLOCHING et al., 2000; WU et al., 2004) e foram também evidenciadas na bexiga (BURGAZ et al., 1995; ZHANG et al., 1997) e cérvix uterino (CERQUEIRA et al., 1998).

Utilizando o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal, Sarto et al. (1987) detectaram diferenças significantes nas frequências de micronúcleos conseqüentes a quebras cromossômicas. Utilizando a mesma metodologia, Stich e Rosin (1983) não detectaram, contudo, diferenças significantes nas frequências de micronúcleos entre fumantes e não fumantes, mas observaram efeito sinérgico do cigarro e do álcool sobre estas frequências.

Em estudo realizado em Orissa (Índia), Stich, Parida e Brunnemann (1992) analisaram a ocorrência de micronúcleos em pescadores que fumavam com a extremidade do cigarro que contém a brasa voltada para o interior da boca. Nesta condição e dada à forma com que a fumaça é expelida, língua e palato são mais expostos do que a bochecha. As frequências de micronúcleos observadas na língua e palato não diferiram ($\bar{X}= 2,1\%$ e $\bar{X}= 2,5\%$, respectivamente), mas foram significantemente mais elevadas do que as descritas para bochecha ($\bar{X}= 0,6\%$).

Maior frequência de danos genéticos em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes do tabaco industrializado ($\bar{X}= 1,99$) do que a observada em não-fumantes ($\bar{X}= 0,84$) foi descrita por Özkul et al. (1997) em estudo que incluiu 14 indivíduos do sexo masculino que eram fumantes e 15 indivíduos, do mesmo sexo, não-fumantes.

Maior incidência de danos cromossômicos e de lesões pré-malignas e malignas no epitélio oral tem sido registrada não apenas em fumantes do cigarro industrializado, mas, também, entre usuários de outras formas de tabaco.

Tolbert; Shy; Allen (1991) compararam a frequência de micronúcleos, em células esfoliadas da mucosa oral, entre 38 mulheres que faziam uso intra-oral de rapé e 15 mulheres não usuárias do tabaco. A média registrada para usuárias foi duas vezes maior do que a observada para o grupo controle: $\bar{X}= 3,8/1000$ células e $\bar{X}= 1,6$ para igual número de células, respectivamente, quando computados micronúcleos de alta e baixa certeza.

Entre os indianos é comum o uso do tabaco ("Khaini-tobacco") colocado na fenda inferior da gengiva e lá deixado por longo período de tempo. Avaliando a ocorrência de micronúcleos em células gengivais e da bochecha de usuários deste tabaco, Stich; Parida; Brunnemann (1992) encontraram uma frequência significativamente maior dessas estruturas nas células esfoliadas da gengiva ($\bar{X}= 2,1/100$ células) quando comparadas às células obtidas da bochecha ($\bar{X}= 0,5/100$ células). Resultados similares foram anteriormente descritos por estes autores (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982) entre usuários da cidade de Bihar (Índia). Efeitos do uso de uma pasta de dente contendo tabaco "Gudakhu" na indução de micronúcleos foram avaliados também por Stich; Parida; Brunnemann no estudo de 1992. Não foram detectadas diferenças entre usuários e controles.

Dave (1992) avaliou os efeitos citogenéticos induzidos pelo consumo de *areca nut* em usuários sem lesões bucais e usuários apresentando fibrose da submucosa oral ou câncer oral. A análise comparativa com um grupo controle (não-usuários apresentando mucosa oral normal) mostrou aumento significativo na frequência de Trocas entre Cromátides Irmãs e aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos nos três grupos de usuários. Resultado semelhante foi descrito pelo autor quando feita, nesses indivíduos, a avaliação da ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral.

Özkul et al. (1997) em estudo feito na Turquia incluindo 25 homens que faziam uso intra-oral de um pó obtido a partir do tabaco desidratado, oriundo de folhas da *Nicotiana rustica*, relataram uma frequência significativamente maior de micronúcleos em células da mucosa bucal ($\bar{X}= 1,86\%$) quando comparado ao grupo controle ($\bar{X}= 0,84\%$).

Wu et al. (2004) avaliaram os efeitos clastogênicos consequentes ao uso de cigarro industrializado e ao hábito de mascar areca quid. A comparação entre os grupos revelou uma frequência de micronúcleos significativamente maior em fumantes não-mascadores do que em indivíduos não-fumantes mascadores ($p= 0,01$). Efeito dose-resposta foi observado entre os usuários do cigarro industrializado. A análise da interação entre o hábito de fumar e o de mascar areca quid mostrou que não há efeito sinérgico entre eles.

Efeitos sistêmicos do tabaco revelados por testes em linfócitos têm sido mostrados por diversos pesquisadores. Fazendo uso do Teste de Micronúcleo, Tomanin et al. (1991) e Xue et al. (1992) detectaram, em linfócitos, maior ocorrência de alterações cromossômicas nos indivíduos fumantes quando comparados com não-fumantes. Maior ocorrência de danos cromossômicos em

linfócitos de fumantes foi também observada com a utilização de outros testes citogenéticos como a Análise de Metáfases (HUSGAFVEL - PURSIAINEN et al., 1980) e a Troca entre Cromátides Irmãs (LAMBERT et al., 1983).

A ocorrência de fenômenos nucleares degenerativos indicativos de apoptose (cariorréxis e cromatina condensada), em células esfoliadas da mucosa bucal, foi descrita por Freita et al. (2005) em estudo que avaliou a associação entre estas alterações e os hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas. Fumantes e/ou usuários de bebidas apresentaram uma frequência significativamente maior destas alterações quando comparados com o grupo controle.

Maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose e necrose, mas não de micronúcleos, em função do hábito de fumar e da exposição ocupacional a agrotóxicos foi descrita por Santos (2003) em células do epitélio oral.

Utilizando metodologia similar, Meireles et al. (2006) avaliando os efeitos da exposição ocupacional e dos hábitos de beber e de ingerir bebidas alcoólicas em indivíduos que trabalham em laboratórios de pesquisa descreveram frequência significativamente maior de alterações nucleares indicativas de apoptose (picnose, cromatina condensada e cariorréxis) entre os indivíduos expostos quando feita a comparação com o grupo controle. Apoptose foi também significativamente maior entre os indivíduos expostos que informaram não ingerir bebidas alcoólicas e/ou fumar quando comparados com controles abstêmios ($p < 0,0001$). Nos indivíduos que faziam uso do cigarro e/ou de bebida alcoólica, em ambos os grupos amostrais, a ocorrência de apoptose foi maior entre os que fumavam e/ou bebiam ($p < 0,0001$).

2.3.3 Efeitos sinérgicos dos hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas na indução de danos cromossômicos

A maioria dos estudos em que foi avaliada a indução de danos cromossômicos em células esfoliadas da mucosa oral conseqüentes aos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas, revela que o álcool presente nestas bebidas não induz, isoladamente, à maior ocorrência desses danos. Em combinação com o hábito de fumar, no entanto, efeitos aditivos e/ou sinérgicos têm sido descritos.

Em células esfoliadas da mucosa oral, Stich; Rosin (1983) avaliaram os efeitos desses hábitos na indução de micronúcleos em quatro grupos de indivíduos: Grupo I: não-fumantes e não usuários de bebidas alcoólicas; Grupo II: fumantes e não bebedores; Grupo III: não-fumantes, mas bebedores e, Grupo IV: fumantes e bebedores. Os autores não detectaram diferença significativa na ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos dos grupos I, II e III, mas a frequência de micronúcleos nos indivíduos do Grupo IV foi significativamente maior do que a observada para os três outros grupos, revelando os efeitos sinérgicos dos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas na indução de micronúcleos.

Resultados semelhantes a esses foram obtidos por Castelli et al. (1999) analisando a ocorrência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas em linfócitos de três grupos de indivíduos: Grupo I: constituído por indivíduos desnutridos que fumavam e bebiam; Grupo II: formado por ex-alcoólicos não-fumantes e, Grupo III constituído por fumantes crônicos. A frequência dos *endpoints* avaliados foi significativamente maior no grupo de alcoólicos fumantes.

Efeito sinérgico dos hábitos de mascar folhas de *Catha edulis*, de fumar (cigarro industrializado) e de ingerir bebidas alcoólicas, na indução de micronúcleos em células do epitélio oral, foi investigado por Kassie et al. (2001). A amostra analisada foi dividida em três grupos: Grupo I: constituído por 25 indivíduos mascaradores de *Catha edulis*, fumantes e bebedores; Grupo II: formado por igual número de indivíduos fumantes e bebedores e, Grupo III: constituído por 25 indivíduos não-mascaradores e que nem fumavam e nem bebiam. Os autores observaram que: 1) o número de micronúcleos entre os indivíduos do Grupo I foi duas vezes maior do que o observado entre os indivíduos do Grupo II; 2) micronúcleos entre os indivíduos do Grupo I ocorreram em frequência nove vezes maior do que entre os indivíduos do Grupo III e, 3) a ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos do Grupo II foi significativamente maior do que a observada entre os participantes do Grupo III, revelando efeito aditivo dos hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas na indução de danos cromossômicos.

2.3.4 Danos cromossômicos associados ao uso de antissépticos bucais e à condição dental

Freqüência significativamente maior de micronúcleos entre indivíduos que fazem uso de antissépticos bucais foi observada por Freita et al. (2005), o que segundo os autores pode ser atribuído às altas concentrações de álcool etílico em sua composição e/ou também à freqüência elevada de uso. Além disso, o contato prolongado do álcool com a mucosa através de bochechos, poderia ser suficiente para a expressão dos efeitos genotóxicos desta substância, diferentemente do contato estabelecido na ingestão de bebidas alcoólicas que se faz, habitualmente, de modo fugaz. O número de indivíduos analisados por Freita et al. foi de apenas cinco indivíduos de modo que os resultados obtidos devem ser vistos com reserva.

Em relação à indução de micronúcleos por irritação traumática da mucosa oral, Freita et al. (2005) descreveram freqüência significativamente maior dessas estruturas nas células obtidas das áreas afetadas, o que possivelmente se deve a uma maior proliferação celular, induzida pelo estímulo traumático, propiciando oportunidade para a ocorrência de falhas cromossômicas durante a divisão celular.

2.3.5 Danos genéticos e progressão à transformação neoplásica

O Teste de Micronúcleo tem sido proposto para o monitoramento biológico de lesões pré-malignas tanto do cérvix uterino quanto da cavidade oral (CERQUEIRA et al., 1998; CASARTELLI et al., 2000; LEAL-GARZA et al., 2002; SARAN et al., 2007).

Cerqueira et al. (1998) avaliaram com o uso deste teste a ocorrência de micronúcleos na progressão das neoplasias cervicais intraepiteliais (NICs I,II e III), tendo observado diferença significativamente maior destas estruturas nas mulheres não-fumantes com NICs II e III quando comparadas às mulheres com NIC I. A ocorrência de micronúcleos entre as mulheres fumantes com NIC I, não diferiu da observada entre mulheres com NICs II e III.

Leal-Garza et al. (2002) investigaram em células esfoliadas do cérvix uterino e em linfócitos periféricos a ocorrência de micronúcleos em mulheres sem lesões cervicais, mulheres com diferentes graus de lesões pré-malignas e mulheres com câncer invasivo. A comparação entre os grupos mostrou que a freqüência de micronúcleos: 1) foi significativamente maior nas

mulheres com câncer, quando comparadas às mulheres sem lesões ou com lesões pré-malignas; 2) não diferiu entre as mulheres com diferentes graus de lesões pré-malignas e, 3) foi maior entre as mulheres com lesões pré-malignas quando comparadas com mulheres sem lesões. Diante destes resultados os autores sugerem que a progressão para a transformação maligna está associada à maior ocorrência de danos cromossômicos e que micronúcleos podem ser considerados como marcadores úteis do risco de desenvolvimento de câncer.

Em células do epitélio oral, Casartelli et al. (2000) analisaram a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral normal, de áreas de leucoplasia e de carcinoma *in situ*. As frequências de micronúcleos foram significativamente maiores nas lesões pré-malignas e nas malignas, quando comparadas à frequência observada nas células da mucosa normal.

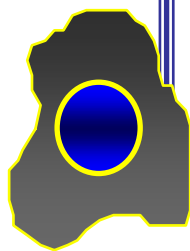
Halder et al. (2004) avaliaram a ocorrência de micronúcleos em 50 indivíduos sem lesões orais; 32 apresentando lesões pré-malignas, 10 com diagnóstico de câncer oral ainda não submetidos a tratamento e oito indivíduos com igual diagnóstico pós-cirurgia para tratamento da lesão. As frequências médias de micronúcleos registradas para esses grupos foram, respectivamente, 0,35%, 0,63%, 1,36% e 0,44%. Estes resultados, segundo os autores, corroboram de modo evidente aqueles descritos por Casartelli et al. (2000) e sugerem que o micronúcleo pode ser um marcador da carcinogênese oral, embora outros estudos se façam necessários.

Estudo recente, com o objetivo de identificar indivíduos com lesões ou condições cancerizáveis de alto risco para o desenvolvimento do câncer oral foi realizado por Saran et al. (2007), com uso de três biomarcadores: Teste de Micronúcleo, Teste Cometa em células esfoliadas do epitélio bucal e Teste Cometa em leucócitos. A amostra estudada por esses autores foi constituída por: 1) 129 indivíduos com câncer oral; 2) 138 portadores de lesões pré-malignas (leucoplasia e eritroplasia) e condições cancerizáveis (fibrose da submucosa e líquen plano oral) e; 3) 176 indivíduos controles. Os resultados obtidos apontam para um gradiente (do epitélio normal para o câncer) na ocorrência de todos os *endpoints* analisados.

Ramirez; Saldanha (2002) compararam a frequência de micronúcleos entre indivíduos com carcinomas orais e orofaríngeos e indivíduos apresentando mucosa oral sem alterações. Foram analisadas células esfoliadas de três regiões distintas da cavidade oral: região ao redor da lesão (B), na região contra-lateral à lesão (A) e região de fundo de saco gengivo-labial superior

(C). Os resultados referentes à comparação intra-individual dos pacientes mostram diferenças significantes: a frequência de micronúcleos foi maior na região B, seguida das regiões A e C. Os autores destacam a possibilidade de existir um gradiente no desenvolvimento carcinogênico (C → A → B). A comparação inter individual (pacientes e controles) aponta um aumento significativo na frequência de micronúcleos nas células da região de lesão quando comparado à frequência destas estruturas nas células dos indivíduos do grupo controle.

Objetivando avaliar se o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas pode ser utilizado como um biomarcador indicativo de maior risco de desenvolvimento de câncer do trato digestivo superior, Bloching et al. (2000) analisaram células de regiões da mucosa oral sem alterações de 55 indivíduos com carcinomas do trato digestivo superior e 16 indivíduos com leucoplasia, comparando os resultados obtidos com 99 indivíduos sem lesões. A frequência de micronúcleos foi duas vezes mais elevada nos indivíduos com lesões. Os autores consideram que os resultados obtidos apontam para a efetividade do uso de micronúcleos como biomarcadores de risco de desenvolvimento de câncer, podendo auxiliar no estabelecimento de medidas preventivas visando reduzir os riscos de desenvolvimento dessa doença, embora não possam informar quando ou se a transformação maligna acontecerá.



Objetivos

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ❖ Avaliar a ocorrência de alterações citológicas, indicativas de danos cromossômicos e de apoptose em células esfoliadas do epitélio oral de indivíduos com lesões pré-malignas e malignas deste epitélio e a possível interação com o hábito de fumar.

Objetivos Específicos

- ❖ Descrever o perfil de uma amostra de pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da UEFS;
- ❖ Avaliar a ocorrência de danos cromossômicos e apoptose no evolver do processo de transformação maligna;
- ❖ Avaliar os efeitos do hábito de fumar na indução de danos cromossômicos e sua associação com a progressão maligna;
- ❖ Verificar se a ocorrência de micronúcleos está associada a outros fatores (que não os hábitos de fumar e de beber) que têm sido apontados como de risco para o desenvolvimento do câncer bucal.



Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Foi realizado estudo epidemiológico analítico do tipo caso-controle com obtenção de dados quantitativos. Os estudos analíticos visam investigar a associação entre dois eventos, no intuito de explicar uma possível relação causal entre eles (PEREIRA, 1995).

Rouquayrol e Almeida Filho (1992; 2003) afirmam que o estudo de caso-controle é destinado à investigação de associações etiológicas de doenças com período de latência prolongado, onde seria inviável a utilização de estudos de seguimento, ou seja, prospectivo.

Caracteriza-se pelo levantamento de um grupo de casos com a doença e um grupo de controles (sujeitos comprovadamente sem a doença) comparáveis. Estabelecidos os casos e os controles, parte-se do diagnóstico da doença, retroagindo em sua história em busca dos fatores de risco, passados ou presentes, suspeitos para o desenvolvimento da doença. Portanto, nesse desenho de estudo, parte-se do efeito para elucidar as causas (PEREIRA, 1995). O delineamento do presente estudo encontra-se esquematizado na Figura 4.

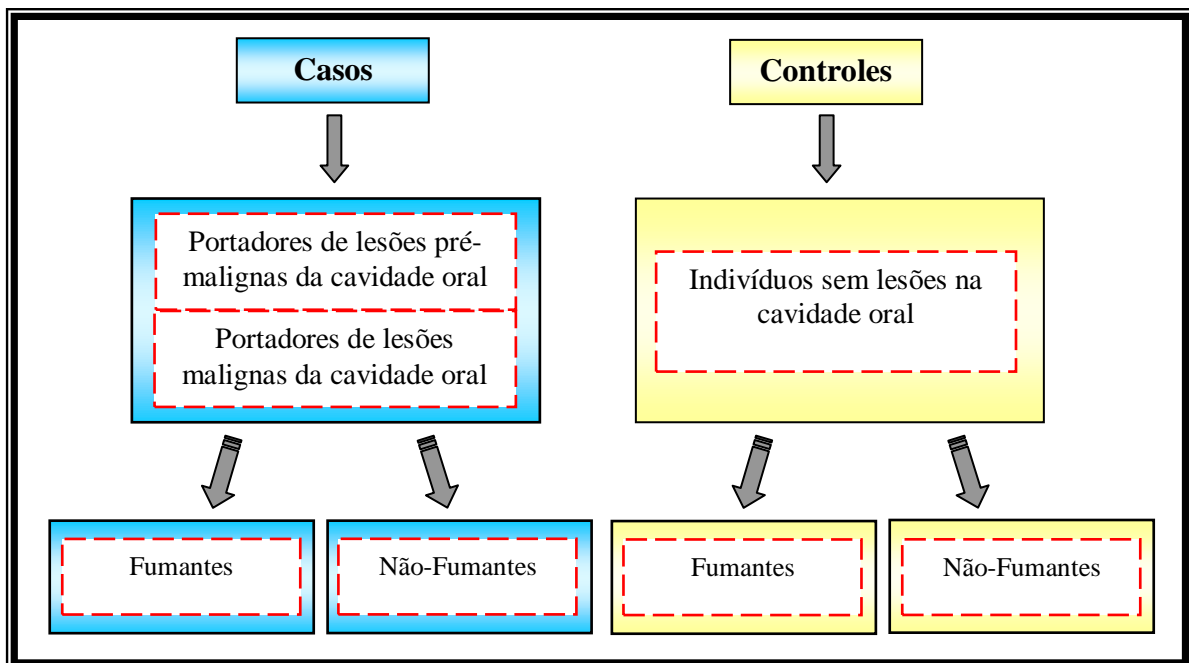


Figura 4: Delineamento do desenho de estudo caso-controle para avaliar associação entre hábito de fumar e lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral, através do Teste de Micronúcleo.

4.2 Campo de Estudo

O estudo foi realizado no Centro de Referência de Lesões Bucais da Universidade Estadual de Feira de Santana e nas Clínicas Odontológicas desta Universidade, onde foram coletados os dados e o material para estudo dos casos e controles.

As Clínicas Odontológicas da UEFS vêm funcionando regularmente desde a implantação do Curso de Odontologia e, em particular o Centro de Referência de Lesões Bucais tem sido considerado um modelo de excelência no atendimento à população de Feira de Santana e das regiões circunvizinhas.

O processamento do material para análise citogenética, assim como a análise dos dados e a análise citogenética foram realizadas no Laboratório de Genética Toxicológica na Universidade Estadual de Feira de Santana, que conta com recursos humanos qualificados, desenvolvendo linha de pesquisa com a utilização da mesma metodologia do presente estudo.

4.3 População do estudo

A população sob estudo foi constituída por um total 103 indivíduos atendidos rotineiramente no Centro de Referência de Lesões Bucais da Universidade Estadual de Feira de Santana e nas clínicas odontológicas, distribuídos em dois Grupos:

- ❖ Grupo Caso, constituído por uma amostra de trinta e um indivíduos portadores de lesões pré-malignas e malignas da mucosa bucal;
- ❖ Grupo Controle, constituído por uma amostra de setenta e dois indivíduos sem lesões bucais.

Para avaliação da ocorrência de micronúcleos e de apoptose na progressão à transformação maligna, a amostra foi subdividida em três novos grupos:

- ❖ Grupo I, formado pelos setenta e dois indivíduos sem alterações na mucosa oral;

- ❖ Grupo II, integrado por onze indivíduos que apresentavam lesões pré-malignas;
- ❖ Grupo III, constituído por vinte portadores de câncer oral.

Em função dos estudos de caso-controle não gerarem diretamente taxas de incidência e de prevalência, Pereira (1995) aponta para o fato de que nesse tipo de estudo, geralmente, a amostra é de conveniência. Nesse sentido, a população do estudo foi constituída, como já exposto, por uma amostra de trinta e um casos e setenta e dois controles. Estudos dessa natureza na literatura consideram que a amostra deve ser constituída por um mínimo de 20 indivíduos para cada grupo (TOLBERT et al., 1991; RAMIREZ, 2000; SANTOS, 2003). No presente estudo foram avaliados indivíduos em número superior ao sugerido por esses autores de forma a obter uma maior abrangência.

4.3.1 Critérios de inclusão:

Participaram do estudo homens e mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, que foram submetidos a exame odontológico clínico e os indivíduos com lesões pré-malignas (leucoplasia, eritroplasia e displasia liquenóide) e malignas (carcinoma escamocelular) da cavidade oral, que após leitura do Termo de Consentimento concordaram em participar do estudo.

4.3.2 Critérios de exclusão:

Foram excluídos os indivíduos:

- Em tratamento radio e/ou quimioterápico, ou que tinham sido submetidos a estas terapias há pelo menos seis meses;
- Submetidos à Biópsia há menos de três semanas;

- Relataram exposição recente (período menor do que seis meses) a genotóxicos conhecidos;
- Indivíduos que não se enquadraram nos critérios, quer para fumantes quer para não-fumantes;
- Apresentando lesões outras que não as estabelecidas nos critérios de inclusão.

4.4 Variáveis do Estudo

As seguintes variáveis foram estabelecidas para a avaliação do objeto de estudo:

- ❖ *Variável dependente*: lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral
- ❖ *Variável independente*: hábito de fumar

Foram analisados também, as características sócio-demográficas (relacionadas à idade, sexo e grau de instrução), antecedentes pessoais (uso de prótese, higiene bucal e uso de antissépticos bucais) e hábitos de vida (ingestão de bebidas alcoólicas) como co-variáveis.

4.5 Técnicas e instrumentos de coleta de dados

4.5.1 Dados pertinentes à caracterização da amostra

Formulário contendo indagações a respeito de idade, hábitos de higiene bucal, hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, uso de próteses, exposição a agentes genotóxicos conhecidos e ocorrência de câncer na família foi aplicado individualmente à totalidade da amostra (APÊNDICE A).

O formulário é um valioso instrumento de coleta de dados, vez que permite a obtenção de informações diretamente do entrevistado, sendo preenchido pelo pesquisador à medida que as

informações são obtidas. Em conseqüência, o formulário pode ser aplicado a todo segmento da população e, as possíveis dúvidas do pesquisado podem ser esclarecidas pelo pesquisador, facilitando o seu entendimento (FACHIN, 2003; MARCONI; LAKATO, 2005)

Os indivíduos com lesões bucais (casos) foram submetidos a exame clínico, anatomopatológico e análise citogenética (Teste de Micronúcleo) e os indivíduos sem lesões bucais (controles), a exame clínico e análise citogenética.

4.5.2 Parâmetros considerados ao exame clínico

Ao exame clínico foi pesquisada, além da presença de alterações pré-malignas e malignas em língua (bordo lateral) e epitélio da mucosa oral, a existência de próteses, dentes fraturados (com conseqüente irritação traumática) e de placas bacterianas para inferir sobre a higiene bucal.

4.5.3 Obtenção do material para estudo histopatológico

O material para análise histopatológica, quando indicada, a biópsia foi realizado por cirurgião dentista e enviado para o Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana.

4.5.4 Obtenção do material para estudo citológico

O material para análise citológica foi obtido mediante raspagem gentil da mucosa bucal, das regiões com lesão (Grupo Caso) e regiões com aspecto normal (Grupos Caso e Controle), utilizando escova para coleta de células cervicais, sendo uma escova para cada esfregaço (Figura 5). Com o material coletado, foi feito esfregaço em lâmina de vidro, com uma gota de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,09%) que foi deixado ao ar livre para secar (Figura 6).



Figura 5: Material coletado da mucosa bucal, utilizando escova cytobrush.

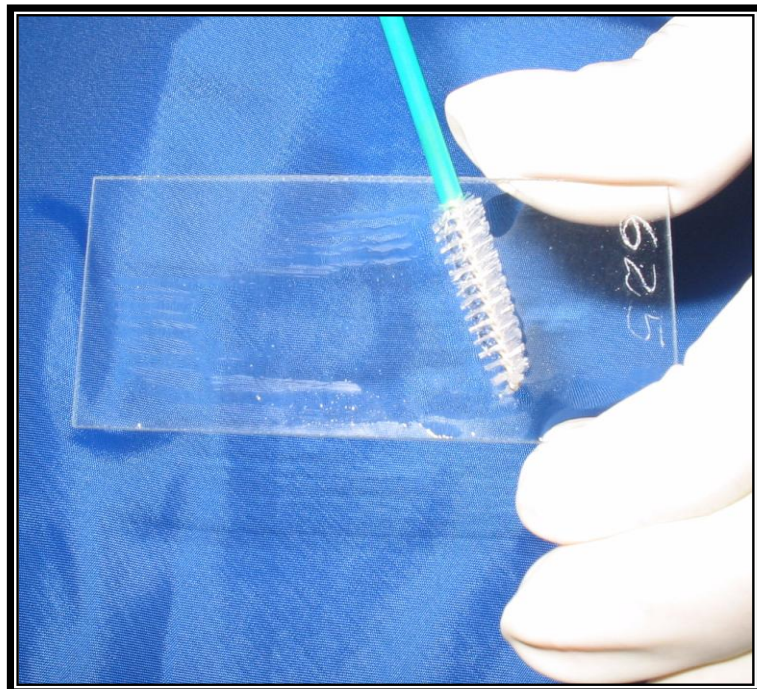


Figura 6: Esfregação do material coletado

4.5.5 Preparações citológicas

O material foi fixado em solução de metanol/ ácido acético (3:1). Após 24h as preparações foram coradas de acordo com o método de Feülgen e Rossenbeck (1924) e contra-coradas com Fast Green a 1% em álcool absoluto por 1 minuto. (Figuras 7, 8 e 9).

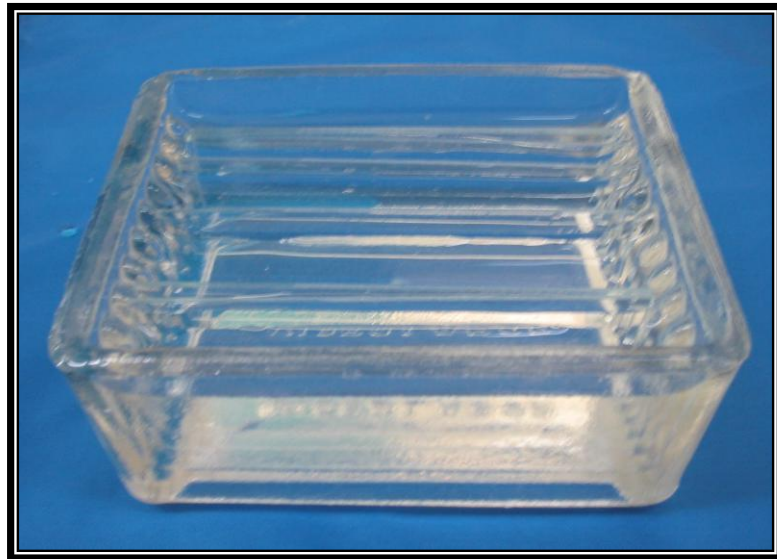


Figura 7: Fixação do material em metanol/ ácido acético (3:1)



Figura 8: Preparações coradas pelo método de Feulgen & Rossenbeck.

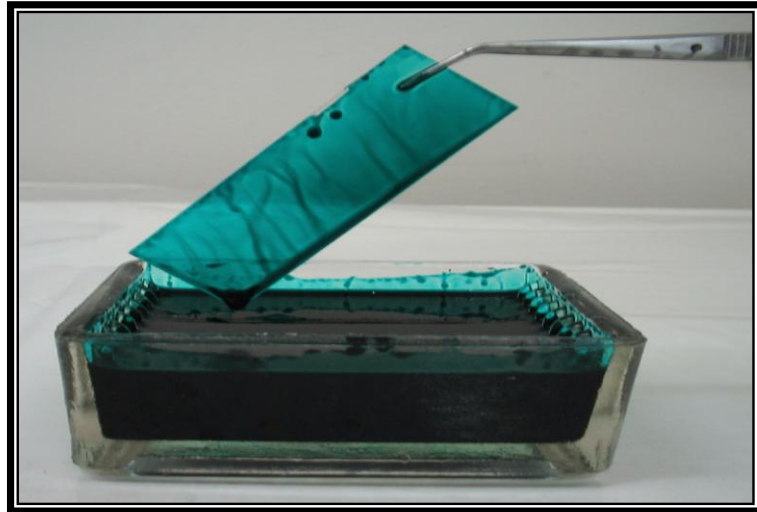


Figura 9: Preparações contra coradas com Fast green à 1%.

4.5.6 Análise de micronúcleos e alterações nucleares indicativas de apoptose

A análise citogenética foi feita sob microscopia óptica e em teste cego com relação aos dados da entrevista e resultado do exame anatomopatológico. Foram consideradas até um mínimo de 1.000 células por indivíduo. Micronúcleos foram identificados de acordo com os critérios descritos por Sarto et al. (1987) e Tolbert; Shy; Allen (1991): foram considerados micronúcleos as estruturas distintamente separadas do núcleo, com contorno bem definido, apresentando em relação a ele coloração e distribuição cromatínica similar, além de visualização em um mesmo plano. Além de micronúcleos, foi feito o cômputo separadamente das alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose: cariorréxis, cromatina condensada e picnose.

4.6 Elaboração do Banco de Dados e Análise Estatística

Um banco de dados foi montado com as informações obtidas na entrevista e nas análises de micronúcleos e de alterações nucleares indicativas de apoptose. Posteriormente estes dados

foram processados e analisados estatisticamente através do software de análise estatística SPSS 10.0 for Windows e pelo Programa Estatístico R version 2.4.0.

A avaliação das diferenças entre os Grupos relativa aos diversos parâmetros considerados foi feita com o uso de vários testes estatísticos:

- 1) Para análise de diferenças das médias, foi utilizado o Teste T Student
- 2) Para análise das tabelas de associação foi empregado o Teste de Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher;
- 3) A análise das variáveis quantitativas foi realizada através do Teste T de Student;
- 4) Toda a análise relativa à ocorrência de micronúcleos e de alterações nucleares degenerativas foi feita com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991), que é um teste de significância alternativo ao Teste de Qui-quadrado na linha Exata do Teste de Fisher (KALBFLEISCH, 1979) e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de determinada aberração cromossômica. Em todas as análises o nível de significância foi de 5%.

4.7 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana, vinculado ao CONEP, sob processo nº 059/2006.

A pesquisa, atendendo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 (BRASIL, 1996), foi realizada mediante a observação dos princípios éticos estabelecidos por esta Resolução, estando de acordo com o esclarecimento dos sujeitos quanto à justificativa, os objetivos do estudo e os procedimentos que foram utilizados, incluindo a aplicação do formulário e a coleta de material da mucosa bucal.



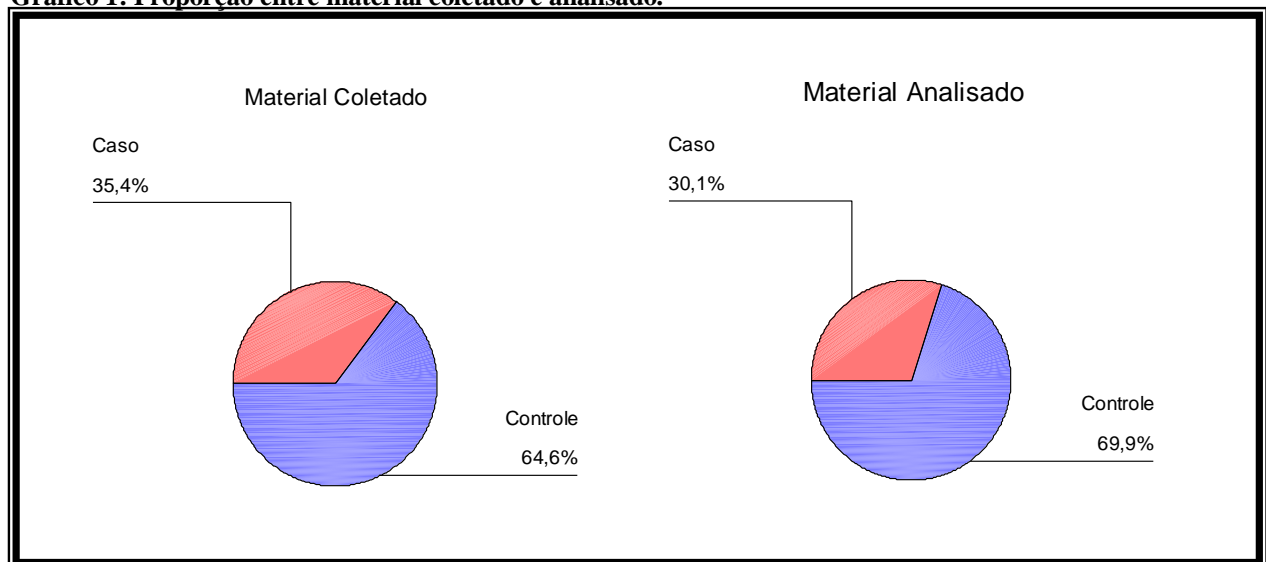
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Material Analisado

Cento e treze indivíduos, de ambos os sexos, concordaram em participar desse estudo. Destes, quarenta apresentavam lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral (Grupo Caso) e setenta e três apresentavam mucosa oral sem alterações (Grupo Controle). Dentre os quarenta indivíduos portadores de lesões pré-malignas e malignas do epitélio bucal, nove foram excluídos da amostra: um por ter sido submetido à radioterapia e oito porque as preparações destinadas ao estudo de micronúcleos se apresentaram impróprias para análise: quatro, devido ao grau avançado da lesão, evidenciando necrose; e, quatro, em função da quantidade insuficiente de células, em uma (dois indivíduos) ou em ambas as áreas coletadas (dois indivíduos). No Grupo Controle, um indivíduo foi excluído da amostra, devido ao número insuficiente de células. A amostra final foi, então, assim distribuída: Grupo Caso: 31 indivíduos; e, Grupo Controle: 72 indivíduos, perfazendo um total de 103 indivíduos.

Gráfico 1: Proporção entre material coletado e analisado.

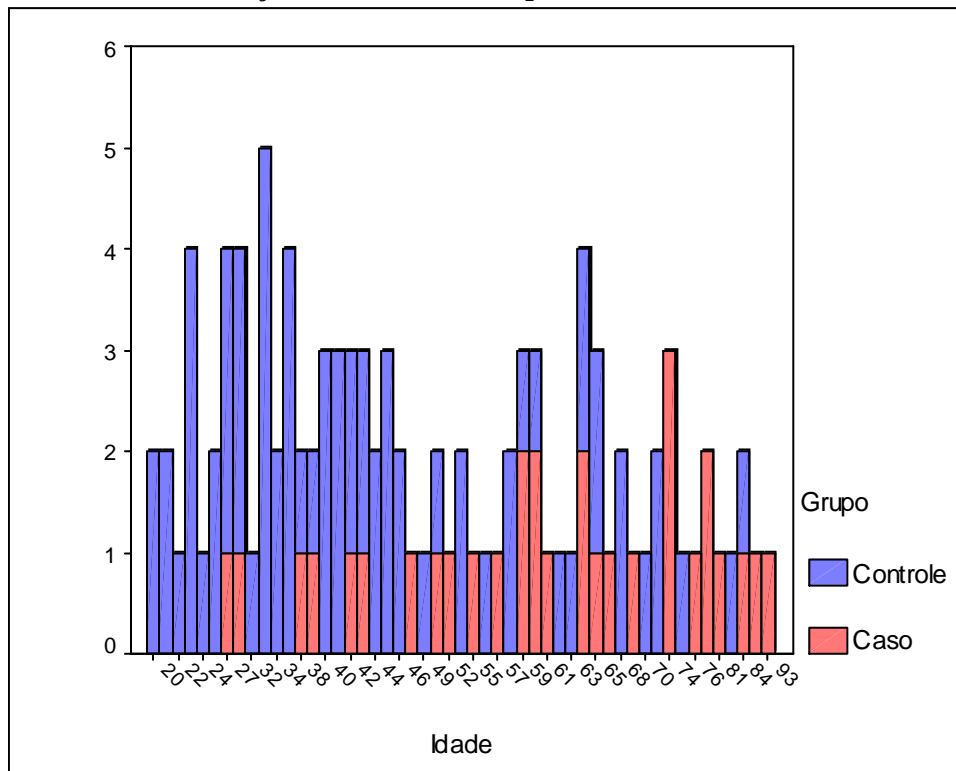


5.2 Características da Amostra

5.2.1 Idade

A média de idade da amostra total foi de $\bar{X}_{id} = 48,95 \pm 18,63$; e, as obtidas nos Grupos Caso e Controle foram, respectivamente, $\bar{X}_{id} = 61,74 \pm 16,89$ e $\bar{X}_{id} = 43,44 \pm 16,60$. A avaliação das diferenças entre os grupos, feita com o uso do Teste T de Student revelou diferenças significantes: $t = 5,104$; G.L. = 101; $p = 0,000001$. O gráfico II, apresenta a distribuição por idade nos Grupos Caso e Controle.

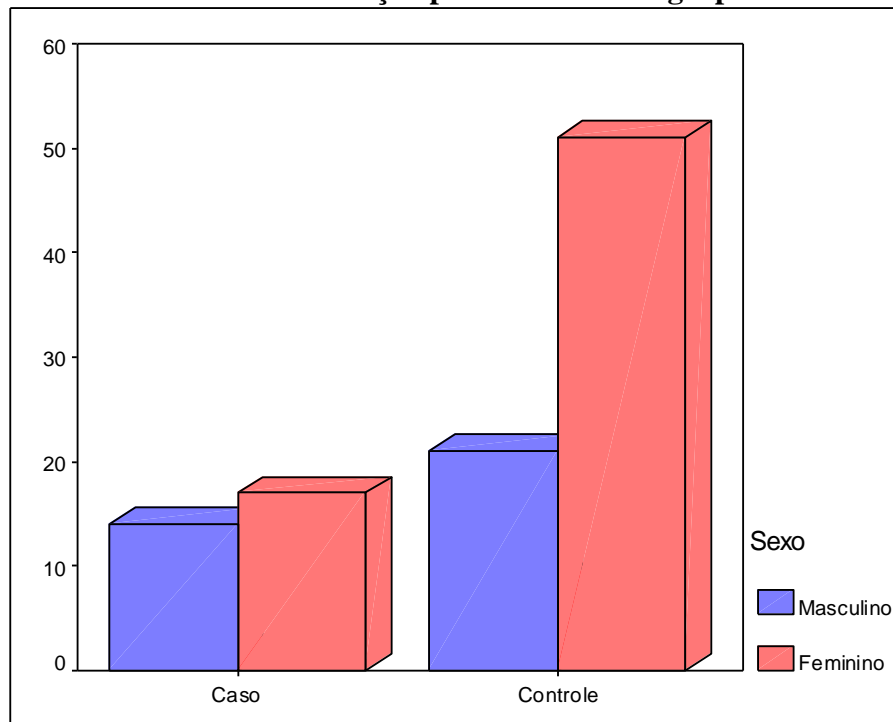
Gráfico 2: Distribuição da Idade nos Grupos Caso e Controle



5.2.2 Sexo

O Grupo Caso foi constituído por 14 homens (45,2%) e 17 mulheres (54,8%); o Grupo Controle por 21 homens (29,2%) e 51 mulheres (70,8%). A avaliação da diferença na proporção de homens e mulheres entre os grupos, feita com o uso do Teste de Qui-quadrado, não revelou diferença significativa ($\chi^2 = 2,4710$, G.L. = 1, $p = 0,1160$), assim como a avaliação da diferença da variável sexo dentro do Grupo Caso, também, não revelou diferenças significantes ($\chi^2 = 0,2903$; G.L. = 1; $p = 0,5900$). Contudo, considerando o Grupo Controle, foi observado que o número de mulheres é significativamente maior que o número de homens: $\chi^2 = 12,5000$; G.L. = 1, $p = 0,0004$. O Gráfico III mostra a distribuição por sexo entre os grupos.

Gráfico 3: Distribuição por sexo entre os grupos



5.2.3 Escolaridade

A variável Escolaridade foi categorizada levando em consideração apenas a oportunidade de acesso, ou não, à educação, em função do pequeno número de indivíduos que cursaram o 2º e

3º Grau no Grupo Caso (três e um indivíduos, respectivamente). Na amostra total, 17 indivíduos informaram serem analfabetos (16,7%); e 85 indivíduos tiveram a oportunidade de estudar (83,3%). Os dados referentes à distribuição entre os grupos relativa à escolaridade encontram-se na Tabela 1. A avaliação das diferenças entre os grupos relativa a esta variável, feita com o emprego do Teste de Qui-Quadrado, revelou que o número de indivíduos sem acesso à educação é significativamente maior no Grupo Caso do que no Grupo Controle: $\chi^2 = 15,5804$; G.L. = 1; $p < 0,0007$.

Tabela 1: Dados referentes à Escolaridade nos Grupos Caso e Controle

Escolaridade	Grupo				Total		P
	Caso		Controle		n	%	
	n	%	n [#]	%	n	%	
Sem escolaridade	12	38,7	5	7,0	17	16,7	$\chi^2 = 15,5804$; G.L. = 1; $p < 0,0007$
Com escolaridade	19	61,3	66	93,0	85	83,3	
Total	31	100,0	71	100,0	102	100,0	

[#] 1 informação perdida

5.2.4 Higiene Bucal

Dos 31 indivíduos do Grupo Caso em que foi clinicamente avaliada a higiene bucal esta foi considerada insatisfatória em 28 deles e em apenas três, como satisfatória. No Grupo Controle, 51 indivíduos se enquadraram dentro da classificação insatisfatória e 20 como higiene satisfatória. Os resultados, da avaliação da diferença entre os grupos, feita com o emprego do Teste do Qui-Quadrado, revelou que o número de indivíduos com higiene bucal insatisfatória é significativamente maior no Grupo Caso do que o observado no Grupo Controle: $\chi^2 = 4,225$; G.L.=1, $p = 0,040$.

Tabela 2: Dados referentes à higiene bucal entre os Grupos

Higiene Bucal	Grupo				Total		p
	Caso		Controle		n	%	
	n	%	n [#]	%	n	%	
Insatisfatória	28	90,3	51	71,8	79	77,5	$\chi^2 = 4,225$; G.L.=1 $p = 0,040$
Satisfatória	3	9,7	20	28,2	23	22,5	
Total	31	100,0	71	100,0	102	100,0	

[#] 1 informação perdida

5.2.5 Uso de Prótese Dentária

Dentre os 103 indivíduos da amostra, seis no Grupo Caso e 28 no Grupo Controle usavam prótese dentária. A avaliação da diferença na proporção de uso de prótese, com o emprego do Teste do Qui-Quadrado, revelou que a diferença entre os grupos apresenta significância estatística marginal ($\chi^2 = 3,739$, G.L. = 1, $p = 0,053$).

Tabela 3: Dados referentes ao uso de prótese dentária entre os Grupos

Uso de Prótese	Grupo				Total		P
	Caso		Controle		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Sim	6	19,4	28	38,9	34	33,0	$\chi^2 = 3,739$ G.L. = 1 $p = 0,053$
Não	25	80,6	44	61,1	69	67,0	
Total	31	100,0	72	100,0	103	100,0	

5.2.6 Hábito de Fumar

Foram considerados fumantes, os indivíduos que fumavam diária e regularmente, três ou mais cigarros industrializados, ou não, por um período igual ou superior a um ano, assim como os indivíduos que deixaram de fumar há, no máximo, seis meses atrás. Os indivíduos que faziam uso atual e regular do cachimbo, ou que o fizeram até seis meses atrás foram também considerados como fumantes. Como não-fumantes foram considerados, os indivíduos que deixaram de fumar ou de usar cachimbo há um tempo igual ou superior a cinco anos, além, evidentemente, dos indivíduos que nunca fumaram (CERQUEIRA et al., 1998).

Dentro desses critérios a amostra total foi composta por quarenta e um indivíduos fumantes (39,8%) e sessenta e dois não-fumantes (60,2%). Dos trinta e um indivíduos que constituíram o Grupo Caso, 12 não fumavam e, 19 eram fumantes (oito consumiam cigarro

industrializado, seis usavam cigarro de palha e cinco eram usuários de cachimbo). No Grupo Controle, 50 indivíduos foram classificados como não-fumantes e 22 como fumantes (vinte e um usuários de cigarro industrializado e um de cigarro de palha). A análise da diferença na proporção de fumantes e não-fumantes entre os grupos, com o emprego do Teste de Qui-Quadrado, mostrou que o número de fumantes no Grupo Caso é significativamente maior do que no Grupo Controle: $\chi^2=8,5430$; G.L.=1; $p=0,0030$.

O consumo de tabaco foi avaliado pelo número máximo de cigarros consumidos por dia (cig./dia) ou pela frequência diária do uso de cachimbo (cach./dia). Considerando o valor da mediana do consumo de tabaco ($M_{\text{constab}}=10$), esta variável foi dicotomizada em: menor ou igual a 10 unidades/dia e maior que 10 unidades/dia. A duração do hábito de fumar foi levada em consideração tomando também como base o valor da mediana ($M_{\text{durháb}}=20$), sendo dicotomizada em: menor ou igual há 20 anos e maior que 20 anos. A avaliação das diferenças entre os grupos em função da exposição dos fumantes, feita com o emprego do Teste de Qui-Quadrado mostrou que: 1) não há diferença estatística entre os grupos em relação à quantidade do consumo de tabaco ($\chi^2=0,006$; G.L.= 1; $p=0,938$); 2) a duração do hábito de fumar é significativamente maior entre os indivíduos do Grupo Caso quando comparada aos indivíduos do Grupo Controle ($\chi^2=23,468$; G.L. = 1, $p<0,00001$). Os dados referentes ao hábito de fumar na amostra estudada encontram-se sumarizados na Tabela 4.

5.2.7 Consumo de Bebidas Alcoólicas

Foram considerados bebedores, os indivíduos que ingeriam bebidas alcoólicas duas ou mais vezes por semana (KEHDY et al., 2007). Com base neste critério, onze indivíduos foram classificados como etilistas (oito casos e três controles); e noventa e dois como não bebedores (23 casos e 69 controles). Dentre os bebedores, sete indivíduos informaram o consumo do álcool com frequência diária (cinco casos e dois controles) e; quatro, bebiam de duas a três vezes por semana (três casos e um controle). A distribuição nos Grupos, Caso e Controle, em função do consumo de bebidas alcoólicas é apresentada na Tabela 4. A avaliação da diferença na proporção de bebedores e não-bebedores entre os grupos, realizada através do Teste de Qui-Quadrado, revelou

que o número de bebedores no Grupo Caso é significativamente maior que no Grupo Controle: $\chi^2 = 10,6379$; G.L. = 1, $p = 0,001$.

Os dados relacionados à frequência do consumo de bebidas alcoólicas e à quantidade encontram-se sumarizados na Tabela 4. A avaliação da diferença entre os grupos relativa a essas variáveis, feita com o uso do Teste Exato de Fisher, mostra que não há diferença significativa em relação à frequência do consumo de bebidas alcoólicas ($p = 0,7879$), e nem quanto à quantidade de álcool consumida ($p = 0,4242$).

5.2.8 Hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas

Considerando os quarenta e um indivíduos classificados como fumantes nesse estudo, 11 faziam uso concomitante de bebidas alcoólicas: oito casos e três controles. A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa ao uso concomitante do tabaco e álcool, feita com emprego do teste de Qui-Quadrado, revelou que o número de indivíduos fumantes e bebedores é significativamente maior no Grupo Caso do que no Grupo Controle: $\chi^2 = 4,2091$; G.L. = 1; $p = 0,040$. Dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Dados relacionados aos hábitos de fumar e/ou de beber nos Grupos Caso e Controle.

CARACTERIZAÇÃO DOS HÁBITOS DE FUMAR E/OU BEBER					
	Grupo				p-valor*
	Caso N=31		Controle N=72		
	N	%	n	%	
Fuma					
Sim	19	61,3	22	30,6	0,003 ^a
Não	12	38,7	50	69,4	
Qtde (cig. ou cach/dia) ^{1,2}					
≤10 unidades	11	57,9	13	59,1	0,938 ^b
>10 unidades	8	42,1	9	40,9	
Duração do hábito (anos) ^{1,3}					
≤20 anos	2	10,5	19	86,4	0,000001 ^a
>20 anos	17	89,5	3	13,6	
Bebe⁵					
Sim	8	25,8	3	4,2	0,001 ^a
Não	23	74,2	69	95,8	
Freqüência álcool⁴					
Diariamente	5	62,5	2	66,7	0,7879 ^b
02-03 vezes/semana	3	37,5	1	33,3	
Qdade de Bebida (copos) ⁴					
≤3 copos	5	62,5	1	33,3	0,4242 ^b
>3 copos	3	37,5	2	66,7	
Hábito de fumar e de Ingerir Bebidas Alcoólicas¹					
Sim	8	42,1	3	13,6	0,040 ^a
Não	11	57,9	19	86,4	

¹ Excluídos 62 não fumantes; ² $M_{constab} = 10$; ³ $M_{durháb} = 20$; ⁴ Excluídos 92 não bebedores; * p-valor<0,05; ^a diferença estatisticamente significativa; ^b não significativa

5.2.9 Uso de Antissépticos Bucais

Dentre os 103 indivíduos que constituem a amostra estudada, dezesseis informaram uso regular de antisséptico bucal. Os dados referentes ao uso dessas substâncias pelos indivíduos dos Grupos Caso e Controle encontram-se detalhados na Tabela 5. A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa ao uso de antisséptico bucal não revelou significância estatística: $\chi^2 = 1,678$; G.L.= 1; $p = 0,195$.

Tabela 5: Dados relacionados ao uso de antisséptico bucal nos Grupos Caso e Controle.

Uso de Antisséptico Bucal	Grupo				Total		p
	Caso		Controle		n	%	
	n	%	N	%	n	%	
Sim	7	22,6	9	12,5	16	15,5	$\chi^2 = 1,678$
Não	24	77,4	63	87,5	87	84,5	G.L. = 1
Total	31	100,0	72	100,0	103	100,0	$p = 0,195$

5.3 Caracterização das Lesões Pré-Malignas e Malignas

5.3.1 Análise Histopatológica

Os resultados do exame anatomopatológico, realizado a partir do material coletado por biópsia da lesão, mostraram que entre os 31 indivíduos que compõem o Grupo Caso; 11 apresentavam lesão pré-maligna e 20, câncer de boca. Os dados relativos ao diagnóstico das lesões estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Dados relativos ao diagnóstico das Lesões

Diagnóstico	n	%
Displasia Liquenóide	1	3,2
Leucoplasia	10	32,3
Carcinoma Escamocelular	20	64,5
Total	31	100

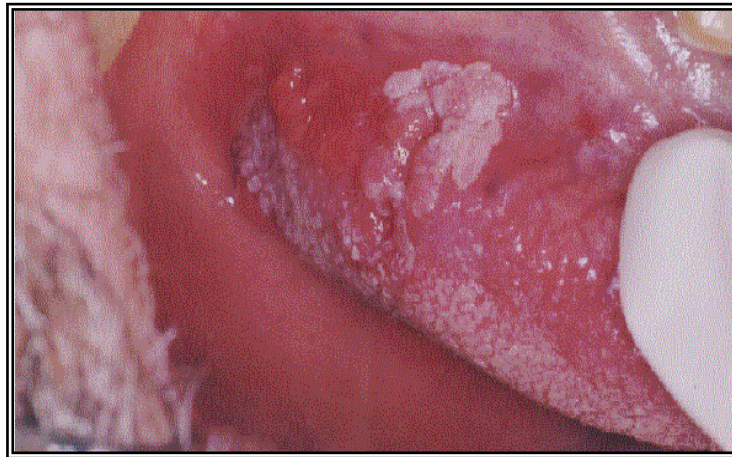


Figura 10: Lesão Pré-Maligna
(Leucoplasia localizado em borda lateral da língua)

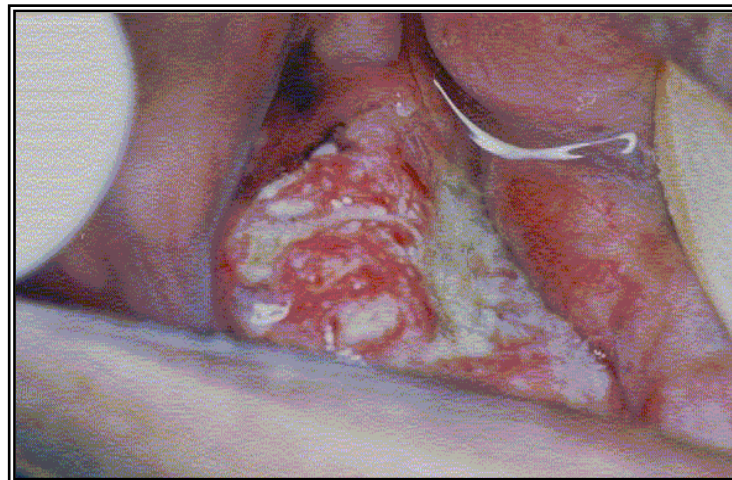


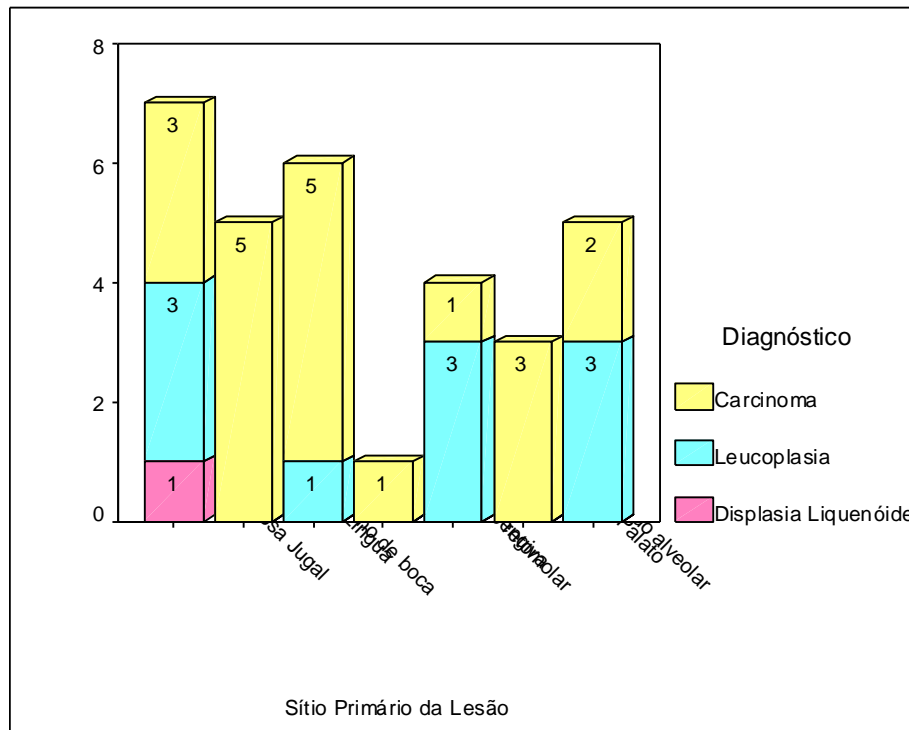
Figura 11: Lesão Maligna
(Carcinoma escamocelular localizado em assoalho de boca)

5.3.2 Localização das Lesões Pré-Malignas e Malignas

A localização mais freqüente de lesão foi a mucosa jugal correspondendo a 22,6% das lesões, seguida do assoalho de boca e palato duro (16,1%, cada), gengiva (12,9%), rebordo alveolar, borda lateral de língua e dorso de língua (9,7 %, cada) e, região retromolar (3,2%).

No Gráfico 4, estão apresentados dados referentes à localização da lesão e ao diagnóstico correspondente. Com base na análise desse gráfico, pode-se observar que a língua e o assoalho de boca foram as localizações mais acometidas pelo carcinoma escamocelular (25%, cada). Considerando ainda essa lesão, outras localizações do epitélio oral foram acometidas: mucosa jugal e rebordo alveolar (15%, cada); palato duro (10%) e; gengiva e região retromolar (5%, cada). Em relação às lesões pré-malignas, as localizações mais comuns foram: mucosa jugal (quatro indivíduos); gengiva (três indivíduos); palato duro (três indivíduos) e; língua (um indivíduo).

Gráfico 4: Distribuição em função do Diagnóstico e localização da Lesão.



5.3.3 Hábito de Fumar em função do diagnóstico anatomopatológico

Dentre os indivíduos portadores de lesões pré-malignas, quatro eram fumantes e sete não-fumantes e entre os portadores de lesões malignas, 15 eram fumantes e cinco não-fumantes. A avaliação da diferença na proporção de fumantes e não-fumantes entre os indivíduos com lesões pré-malignas e malignas, feita com o emprego do Teste Exato de Fisher, não revelou diferença significativa ($p= 0,9939$).

A totalidade dos indivíduos com lesões pré-malignas e malignas fuma há mais de 10 anos. Na Tabela 7, encontram-se os dados sobre a caracterização do hábito de fumar dos portadores de lesões Pré-malignas e Malignas.

5.3.4 Consumo de Bebidas Alcoólicas em função do diagnóstico anatomopatológico

Dentre os 31 indivíduos com lesões orais, apenas oito foram considerados bebedores. Todos os bebedores deste grupo apresentavam diagnóstico de carcinoma. Considerando os 23 indivíduos abstêmios de álcool; 11, correspondem à totalidade dos portadores de lesões pré-malignas e; 12, com lesões malignas. Na Tabela7, encontra-se a distribuição de bebedores e não bebedores em função do diagnóstico da lesão.

Tabela 7: Dados referentes ao hábito de fumar ou de consumir bebidas alcoólicas entre os portadores de lesões Pré-Malignas e Malignas.

		Pré-Maligna		Maligna	Total
		Displasia Liqueenóide	Leucoplasia	CA Escamocelular	
Fumo					
Sim	n	1	3	15	19
	%	5,3	15,9	78,8	100,0
Não	n	0	7	5	12
	%	0	58,3	41,7	100,0
Tipo de Cigarro					
Industrial	n	1	2	5	8
	%	12,5	25,0	62,5	100,0
Palha	n	0	0	6	6
	%	0	0	100,0	100,0
Cachimbo	n	0	1	4	5
	%	0	20,0	80,0	100,0
Duração (anos)					
11-15	n	0	1	0	1
	%	0	100	0	100,0
16-20	n	0	0	1	1
	%	0	0	100	100,0
> 20	n	1	2	14	17
	%	5,9	11,8	82,4	100,0
Bebe					
Sim	n	0	0	8	8
	%	0	0	100	100,0
Não	n	1	10	12	31
	%	3,2	32,3	64,5	100,0

5.4 Análise citológica (Micronúcleo e Apoptose)

5.4.1 Análise de Micronúcleo

5.4.1.1 Ocorrência de Micronúcleos na amostra total e nos distintos Grupos

Um total de 305.086 células foi analisado na amostra. As sessenta e duas preparações do Grupo Caso (trinta e uma, da área de lesão e; trinta e uma, da área de mucosa normal) totalizaram 141.679 células. Foram observados 93 micronúcleos nas 60.504 células do material coletado das

áreas de lesão e; 41 micronúcleos nas 81.175 células do material coletado das áreas de mucosa normal dos indivíduos do Grupo Caso. Considerando as setenta e duas preparações do Grupo Controle, foram observados 78 micronúcleos nas 163.407 células analisadas do material coletado dos indivíduos sem lesões bucais.

As frequências médias de micronúcleos por 1.000 células ($\bar{X}_{MN}\% \pm d.p.$) calculadas para o Grupo Caso, considerando as áreas de lesão e de mucosa normal foram, respectivamente: $1,63 \pm 0,28$ e $0,55 \pm 0,19$. Em relação ao Grupo Controle, a média de micronúcleos por 1.000 células ($\bar{X}_{MN}\% \pm d.p.$) foi de $0,45 \pm 0,09$. Os dados referentes à ocorrência de micronúcleos (Figura 12) na amostra total e nos Grupos Caso e Controle encontram-se discriminados na Tabela 8.

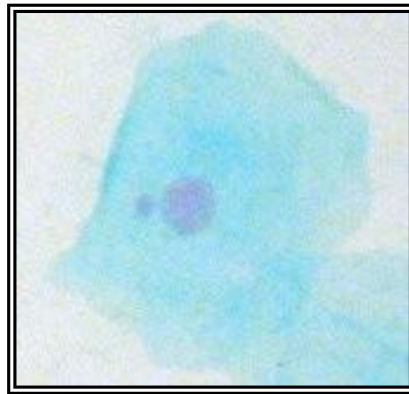


Figura 12: Fotomicrografia de célula esfoliada da mucosa bucal contendo Micronúcleo

Tabela 8: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos na amostra total e nos Grupos Caso e Controle.

	Grupo			Total (lâminas) n=134
	Caso		Controle	
	Área de Lesão (n=31)	Área Normal (n=31)	n=72	
MN observado	93	41	78	212
Total de Células	60.504	81.175	163.407	305.086
$\bar{X}_{MN}\% \pm d.p.$	$1,63 \pm 0,28$	$0,55 \pm 0,19$	$0,45 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,10$

A avaliação das diferenças entre as médias de micronúcleos nos Grupos Caso (área da lesão) e Controle, feita com o uso do Teste T de Student, revelou diferença significativa: $t= 5,163$; G.L.= 101; $p < 0,00001$. Resultados semelhantes foram obtidos quando feita a comparação intra-individual (área de lesão X mucosa normal): $t= 3,220$; G.L.= 60; $p= 0,002$. Não foram, contudo, detectadas diferenças quando avaliadas as médias observadas entre Grupo Controle e Caso quando as células foram obtidas das áreas de mucosa normal dos indivíduos que compunham este Grupo: $t= 0,536$; G.L.= 101; $p= 0,593$.

A avaliação das diferenças entre os Grupos, relativa à ocorrência de micronúcleos, foi realizada, também, utilizando o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros. Resultados similares aos descritos quando feita a comparação entre as médias foram obtidos (Dados apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área de lesão) e Controle

Grupo	N	MN _(obs)	MN _(esp)	# cels	χ^2
Caso	31	93	46,2067	60.504	64,93334
Controle	72	78	124,7933	163.407	G.L.= 1
TOTAL	103	171	171	223.911	$p < 0,000001$

MN_(obs) = micronúcleo observado/ MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

Tabela 10. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos no Grupo Caso: área de lesão X área de mucosa normal

Grupo Caso	n	MN _(obs)	MN _(esp)	# cels	χ^2
Área de Lesão	31	93	57,22468	60.504	39,03613
Área Normal	31	41	76,77532	81.175	G.L.= 1
TOTAL	62	134	134	141.679	$p < 0,000001$

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

Tabela 11. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área normal) e Controle

Grupo	n	MN _(obs)	MN _(esp)	# cels	χ^2
Caso-área normal	31	41	39,49524	81.175	0,08581102
Controle	72	78	79,50476	163.407	G.L.= 1
TOTAL	103	119	119	244.582	$p= 0,769571$

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

As diferenças na ocorrência de micronúcleos entre os grupos foram, ainda, avaliadas através do Teste de Qui-quadrado, com os dados previamente arrumados pelo valor da mediana ($M=0,48$), e para tal, foi criada uma nova variável relativa ao número de micronúcleos por 1000 células valendo zero, quando igual ou abaixo da mediana e; 1, quando acima desta.

Os resultados da comparação assim realizada corroboraram os obtidos com os outros testes, revelando que: 1) o Grupo Caso (área de lesão) apresenta um número significativamente maior de micronúcleos acima do valor da mediana que o observado no Grupo Controle (Tabela 12); 2) a ocorrência de micronúcleos acima do valor da mediana é significativamente maior na área de lesão quando comparada à área de mucosa normal desses mesmos indivíduos que constituem o Grupo Caso (Tabela 13); e, 3) não foi observada diferença estatística na ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área normal) e Controle (Tabela 14).

Tabela 12. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área de lesão) e Controle, com base no valor da Mediana.

	Caso Lesão		Controle		Total		χ^2
	N	%	N	%	N	%	
MN>0,48	28	90,3	22	30,6	50	48,5	30,989
MN≤0,48	3	9,7	50	69,4	53	51,5	G.L.=1
TOTAL	31	100,0	72	100,0	103	100,0	p =0,00000002

MN= micronúcleo

Tabela 13 Dados referentes à ocorrência de micronúcleos no Grupo Caso - área de lesão e área normal, com base no valor da Mediana.

	Caso Lesão		Caso Normal		Total		χ^2
	N	%	N	%	N	%	
MN≤0,48	7	22,6	23	74,2	30	48,4	16,54
MN>0,48	24	77,4	8	25,8	32	51,6	G.L.=1
TOTAL	31	100,0	31	100,0	62	100,0	p =0,00004

MN= micronúcleo

Tabela 14. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos Caso (área normal) e Controle, com base no valor da Mediana.

	Caso Normal		Controle		Total		χ^2
	N	%	N	%	N	%	
MN \leq 0,48	23	74,2	50	69,4	73	70,9	0,237
MN $>$ 0,48	8	25,8	22	30,6	30	29,1	G.L.=1
TOTAL	31	100,0	72	100,0	103	100,0	p =0,627

MN= micronúcleo

5.4.1.2 Ocorrência de Micronúcleos em função dos parâmetros avaliados

A avaliação dos efeitos da idade, sexo, escolaridade, higiene bucal, uso de prótese, uso de antissépticos bucais e hábito de fumar na indução de micronúcleos foi feita na amostra total, considerando no Grupo Caso as células obtidas da mucosa normal. Efeitos do hábito de ingerir bebidas alcoólicas não foram avaliados dado o reduzido número de indivíduos que informaram este hábito, e a pouca quantidade de bebida por eles consumida. A avaliação estatística de todos os parâmetros considerados neste estudo foi feita com o uso do teste para comparação de proporções em situações de eventos raros. Não foram detectados efeitos do aumento da idade, escolaridade, higiene bucal, uso de prótese. O número de micronúcleos foi significativamente maior entre as mulheres ($\chi^2= 4,9264$; G.L. = 1, p= 0,0264); entre fumantes ($\chi^2= 11,3474$, G.L. = 1, p= 0,0007) e entre usuários de antissépticos orais ($\chi^2= 31,4660$; G.L. = 1; p< 0,0002) (Dados apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 15: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do sexo.

Sexo	n	MN _(obs)	# céls	MN _(esp)	χ^2
Masculino	35	29	83.179	40,4703	4,9264
Feminino	68	90	161.403	78,5297	G.L.=1
Total	103	119	244.582	119	p=0,0264

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

Tabela 16: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do hábito de fumar.

Fumo	n	MN _(obs)	# céls	MN _(esp)	χ^2
Não-fumante	62	54	147.912	71,9657	11,3474
Fumante	41	65	96.670	47,0343	G.L.=1
Total	103	119	244.582	119	p=0,0007

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels= total de células

Tabela 17: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total, em função do uso de antissépticos bucais.

Uso de antissépticos	n	MN _(obs)	# céls	MN _(esp)	χ^2
Não	87	76	203.308	98,9184	31,4660
Sim	16	43	41.274	20,0816	G.L.=1
Total	103	119	244.582	119	p<0,0002

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels= total de células

Os efeitos da exposição ao tabaco sobre a indução de micronúcleos, na amostra total, foram também avaliados considerando a quantidade de cigarros consumidos por dia ou a frequência do uso do cachimbo por dia.

Os efeitos da quantidade de tabaco consumida foram avaliados considerando o número máximo de cigarros diários, com a amostra classificada em três categorias (não fumantes e fumantes com valores abaixo e igual ou acima da mediana ($M_{cig} = 10$)). Os resultados revelam diferenças significantes: $\chi^2 = 12,3273$; G.L. = 2; p = 0,0021. As partições de χ^2 mostram que o número de micronúcleos observados em fumantes, tanto menor que a mediana quanto igual ou acima desta, são significativamente maiores que o número observado dessas estruturas em não fumantes ($\chi^2 = 9,5172$; G.L. = 1; p = 0,0020 e $\chi^2 = 7,1913$; G.L. = 1; p = 0,0073; respectivamente). Não foi observada diferença estatística entre fumantes com base no valor da mediana ($\chi^2 = 0,7090$; G.L. = 1; p = 0,3998). (Tabela 18)

Tabela 18: Análise da ocorrência de micronúcleos em função do número máximo de cigarros diários

Quantidade	N	MN _(obs)	# céls	MN _(esp)	χ^2	Partições do χ^2 , G.L.=1
Não-fumante ^(a)	62	54	147.912	71,9658	12,3273	^{(a)x(b)} : 9,5172; p=0,0020
Nº cig <M _{cig} ^(b)	13	22	28.133	13,6879	G.L.=2	^{(a)x(c)} : 7,1913; p=0,0073
Nº cig ≥ M _{cig} ^(c)	28	43	68.537	33,3463	p=0,0021	^{(b)x(c)} : 0,7090; p=0,3998
Total	103	119	244.582	119		

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels= total de células
M_{cig}: Mediana do número de cigarros/dia = 10

Os efeitos da duração do hábito de fumar (tempo - em anos) foram avaliados com a amostra, também, classificada em três categorias: não fumantes e fumantes distinguidos pelo valor da mediana - M_{dur}=20). Os resultados revelam diferenças significantes: $\chi^2 = 11,4251$; G.L. = 2; p= 0,0033. As partições de χ^2 revelam que os resultados são semelhantes aos achados para a quantidade de consumo de tabaco (Tabela 19).

Tabela 19: Análise da ocorrência de micronúcleos em função da duração do hábito de fumar.

Duração	n	MN _(obs)	# céls	MN _(esp)	χ^2	Partições do χ^2 , G.L.=1
Não-fumante ^(a)	62	54	147.912	71,9657	11,4251	^{(a)x(b)} : 6,8893;p=0,0086
T < M _{dur} ^(b)	13	22	31.388	15,2717	G.L.=2	^{(a)x(c)} : 8,5809;p=0,0034
T ≥ M _{dur} ^(c)	28	43	65.282	31,7626	p=0,0033	^{(b)x(c)} : 0,0562;p=0,8126
Total	103	119	244.582	119		

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels= total de células
M_{dur}: Mediana da duração do hábito de fumar em anos = 20

5.4.1.3 Ocorrência de Micronúcleos em função do diagnóstico histopatológico

A avaliação da ocorrência de micronúcleos em função do diagnóstico histopatológico foi feita com a amostra subdividida em três novos grupos: Grupo I, formado pelos indivíduos sem alterações na mucosa oral; Grupo II, integrado pelos indivíduos que apresentavam lesões pré-malignas e; Grupo III, constituído por portadores de câncer oral. Na Tabela 20, encontram-se

dados referentes à ocorrência de micronúcleos, na amostra total e nos Grupos I, II e III, considerando para os Grupos II e III as células obtidas das áreas de lesão.

Tabela 20: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos na amostra total e nos Grupos I, II e III

	Grupo			
	Grupo I n=72	Grupo II n=11	Grupo III n=20	Total (lâminas) n=103
MN observado	78	17	76	171
Total de Células	163.407	19.425	41.079	223.911
$\bar{X}_{MN}\% \pm d.p.$	0,45 \pm 0,09	0,82 \pm 0,16	2,07 \pm 0,39	0,80 \pm 0,12

A avaliação da ocorrência de micronúcleos entre esses Grupos, considerando para os Grupos II e III o material coletado da área de lesão, feita com o emprego do teste condicional de proporção em situações de eventos raros, revelou diferenças significantes: $\chi^2 = 81,3478$; G.L. = 2; $p < 0,0001$. As partições de χ^2 mostram que o número observado de micronúcleos nos portadores de lesões malignas é significativamente maior do que o observado entre os que apresentam lesões pré-malignas e, também, significativamente maior do que o observado entre os indivíduos do Grupo I ($\chi^2 = 8,16$; G.L.=1; $p = 0,0043$; $\chi^2 = 82,14$; G.L.=1; $p < 0,000001$; respectivamente). A ocorrência de micronúcleos é, também, significativamente maior entre os portadores de lesões pré-malignas quando comparado ao Grupo I ($\chi^2 = 5,2880$; G.L.=1; $p = 0,0214$). Na Tabela 21, encontram-se os dados referentes à avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos sem lesões (Grupo I) e com lesões Pré-Malignas e Malignas (Grupos II e III, respectivamente).

Tabela 21: Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos sem lesão (Grupo Controle) e com lesões Pré- Malignas e Malignas.

Grupo	n	MN _(obs)	MN _(esp)	# cels	χ^2	Partições χ^2 G.L.=1
I	72	78	124,7933	163.407	81,3478	(I)x(II): 5,2880; $p=0,0214$
II	11	17	14,8348	19.425	G.L.= 2	(I)x(III): 82,14; $p < 0,000001$
III	20	76	31,3719	41.079	$p < 0,0001$	(II)x(III): 8,16; $p = 0,0043$
TOTAL	103	171	171	223.911		

$MN_{(obs)}$ = micronúcleo observado / $MN_{(esp)}$ = micronúcleo esperado / # cels= total de células

A avaliação da ocorrência de micronúcleos, considerando para os Grupos II e III o material obtido da mucosa normal dos indivíduos, não revelou diferença significativa: $\chi^2 = 0,16182$; G.L.=2; $p = 0,9223$ (Tabela 22).

Tabela 22: Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos normais (Grupo Controle) e de mucosa normal dos indivíduos dos Grupos II e III.

Grupos	n	MN _(obs)	MN _(esp)	# cels	χ^2
I	72	78	79,50476	163.407	0,1618189
II (Lado Normal)	11	16	14,60704	30.022	G.L.= 2
III (Lado Normal)	20	25	24,88820	51.153	p= 0,9223
TOTAL	103	119	119	244.582	

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels = total de células

5.4.1.3.1 Influência do hábito de fumar na ocorrência de Micronúcleos em função do diagnóstico histopatológico

A avaliação da ocorrência de micronúcleos relativa ao hábito de fumar em função do diagnóstico histopatológico, feita com o teste condicional de proporções em situações de eventos raros, revelou diferenças significantes tanto para fumantes quanto para não-fumantes: $\chi^2 = 27,3918$; G.L.=2; $p < 0,0001$ e $\chi^2 = 37,66521$; G.L.=2; $p < 0,0006$ (Tabelas 23 e 24).

Considerando os fumantes, as partições de χ^2 mostram que: 1) o número observado de micronúcleos no Grupo III é significativamente maior que o número observado dessas estruturas tanto no Grupo II, quanto no Grupo I ($\chi^2 = 5,0583$; G.L.=1; $p = 0,025$ e $\chi^2 = 25,87$; G.L.=1; $p < 0,0003$; respectivamente); 2) não foi observada diferença estatística na ocorrência de micronúcleos quando feita comparação entre os Grupos II e I ($\chi^2 = 0,059$; G.L.=1; $p = 0,807$) (Tabela 23).

Tabela 23: Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos fumantes relativa ao diagnóstico.

Grupo	n	MN(f) (obs)	MN (f) (esp)	# cels	χ^2	Partições χ^2 G.L.=1
Controle (I)	22	37	58,1483	52.222	27,3918	(I)x(II): 0,059; p= 0,807
Pré-maligna (II)	4	6	8,4680	7.605	G.L.= 2	(I)x(III): 25,87; p< 0,0003
Maligna (III)	15	53	29,3837	26.389	p< 0,0001	(II)x(III): 5,0583; p= 0,025
TOTAL	41	96	96	86.216		

(f)= fumante/ MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

A análise das diferenças entre os não-fumantes revela que: 1) não há diferenças significantes na ocorrência de micronúcleos entre os Grupos III e II ($\chi^2= 2,0597$; G.L.= 1; p= 0,1512). Contudo, há diferenças significantes quando comparados esses dois Grupos com o Grupo I, apontando que o número observado de micronúcleos, tanto no Grupo III quanto II, é significativamente maior que o número observado no Grupo I ($\chi^2= 36,5620$; G.L.= 1; p< 0,0001 e $\chi^2= 7,9787$; G.L.= 1; p= 0,0047). (Tabela 24).

Tabela 24: Avaliação da ocorrência de micronúcleos em indivíduos não-fumantes relativa ao diagnóstico.

Grupo	n	MN(ñf) (obs)	MN (ñf) (esp)	# cels	χ^2	Partições χ^2 G.L.=1
Controle (I)	50	41	60,5605	111.185	37,66521	(I)x(II): 7,9787; p = 0,0047
Pré-maligna (II)	7	11	6,4381	11.820	G.L.= 2	(I)x(III): 36,5620; p < 0,0001
Maligna (III)	5	23	8,0014	14.690	p< 0,0006	(II)x(III): 2,0597; p= 0,1512
TOTAL	62	75	75	137.695		

(ñf)= não-fumante/ MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado/ # cels= total de células

A análise das diferenças no número de micronúcleos foi feita, ainda, levando em consideração fumantes e não-fumantes, separadamente, em cada um dos grupos, usando, também, o teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros. Não foram encontradas diferenças significantes entre fumantes e não-fumantes com lesões malignas, ($\chi^2= 0,99$; G.L.= 1; p= 0,32) e, também, não foram detectadas diferenças significantes no número de micronúcleos entre fumantes e não-fumantes com lesões pré-malignas ($\chi^2= 0,106$; G.L.= 1; p= 0,7446). Um número significativamente maior de micronúcleos foi observado, contudo, quanto

feita a comparação entre fumantes e não-fumantes do Grupo I: $\chi^2 = 8,59$; G.L.= 1; $p = 0,0034$ (Tabela25).

Tabela 25: Avaliação da ocorrência de micronúcleos por tipo diagnóstico relativa ao hábito de fumar.

Grupo	N	MN(f) (obs)	MN (f) (esp)	# cels(f)	N	MN(ñf) (obs)	MN (ñf) (esp)	# cels (ñf)	χ^2 G.L.=1
I	22	37	24,9274	52.222	50	41	53,0726	111.185	8,59;p=0,0034
II	4	6	6,6556	7.605	7	11	10,3444	11.820	0,106;p=0,7446
III	15	53	48,8221	26.389	5	23	27,1779	14.690	0,99;p=0,32

(f)= fumante / (ñf)= não-fumante

MN_(obs) = micronúcleo observado / MN_(esp) = micronúcleo esperado / # cels= total de células

5.4.2 Análise de Apoptose

A avaliação da ocorrência de alterações indicativas de apoptose (Figura 13) foi realizada considerando o somatório de cariorréxis (A), cromatina condensada (B) e picnose (C) utilizando, também, o teste para comparação de proporções em situação de eventos raros.

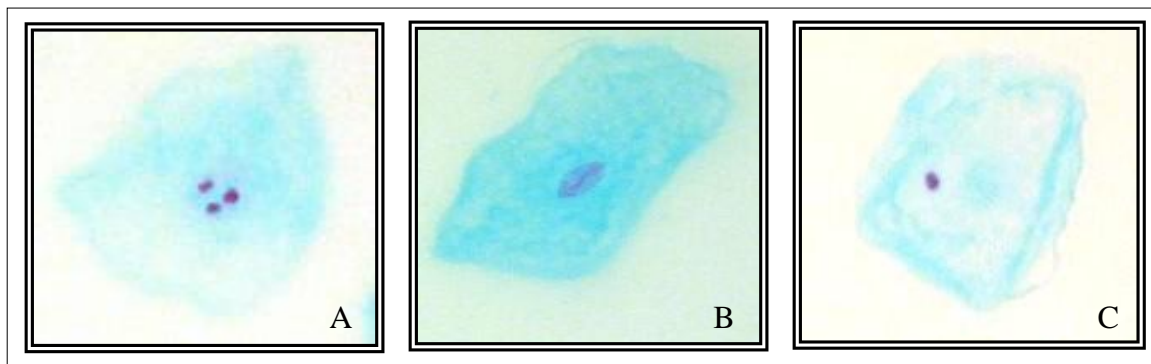


Figura 13: Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal contendo alterações indicativas de apoptose: Cariorréxis (A); Cromatina Condensada (B) e Picnose (C).

Considerando para os indivíduos dos Grupos II e III, o material obtido das áreas de lesão, e a mucosa normal de indivíduos do Grupo I, diferenças significantes foram apontadas: $\chi^2 = 559,2772$; G.L.= 2; $p < 0,0001$. As Partições de χ^2 revelam que a ocorrência de apoptose é significativamente menor nas células dos indivíduos do Grupo III quando comparados tanto ao

Grupo II quanto ao Grupo I ($\chi^2= 4,8852$; G.L.= 1; $p= 0,0270$ e $\chi^2= 436,0805$; G.L.= 1; $p< 0,0001$). A ocorrência de alterações nucleares indicativas de apoptose foi, também, significativamente menor nas células dos indivíduos do Grupo II quando comparados às dos indivíduos do Grupo I ($\chi^2= 165,4471$; G.L.= 1; $p< 0,0001$). Dados apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Dados referentes à ocorrência de apoptose nos Grupos I, II e III (área de lesão).

Grupo	n	AP _(obs)	AP _(esp)	# cels	χ^2	Partições χ^2 G.L.=1
I	72	8.450	7395,646	163.407	559,2772	(I)x(II): 165,4471; $p< 0,0001$
II	11	583	879,157	19.425	G.L.= 2	(I)x(III): 436,0805; $p< 0,0001$
III	20	1.101	1859,197	41.079	$p< 0,0001$	(II)x(III): 4,8852; $p= 0,027$
TOTAL	103	10.134	10.134	223.911		

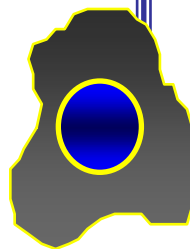
AP_(obs) = apoptose observado / AP_(esp) = apoptose esperado / # cels= total de células

Diferenças significantes na ocorrência de apoptose foram, também, observadas quando considerados as células obtidas das áreas de mucosa normal: $\chi^2= 1.123,51$; G.L.= 2; $p< 0,0001$. As partições de χ^2 revelam que apoptose ocorreu em número significativamente menor nas células normais tanto dos indivíduos do Grupo II quanto às dos indivíduos do Grupo I quando comparadas às células normais dos indivíduos do Grupo I ($\chi^2= 661,5135$; G.L. =1; $p< 0,0001$ e $\chi^2= 563,1553$; G.L.= 1; $p< 0,0001$). A maior frequência de apoptose foi observada nas células dos indivíduos do Grupo Controle (I). Dados apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Dados referentes à ocorrência de apoptose nos Grupos I, II e III (área de mucosa normal).

Grupo	n	AP _(obs)	AP _(esp)	# cels	χ^2	Partições χ^2 G.L.=1
I	72	8.450	6875,491	163.407	1123,51	(I)x(II): 661,5135; $p< 0,0001$
II Normal	11	509	1263,202	30.022	G.L.= 2	(I)x(III): 563,1553; $p< 0,0001$
III Normal	20	1.332	2152,307	51.153	$p< 0,0001$	(II)x(III): 68,8549; $p< 0,0001$
TOTAL	103	10.291	10.291	244.582		

AP_(obs) = apoptose observado / AP_(esp) = apoptose esperado / # cels= total de células



Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos metodológicos relevantes

Na caracterização da amostra, a aplicação do questionário pela pesquisadora e por estagiária previamente treinada, e a garantia do sigilo das informações obtidas com concordância espontânea dos entrevistados, permitem acreditar na credibilidade das informações obtidas.

O exame clínico, o estudo anatomopatológico, a identificação das variáveis dentais e da higiene bucal pelo próprio dentista que procedeu ao exame clínico e a análise citogenética realizados por profissionais competentes e com ampla experiência em suas áreas específicas foram fatores que contribuíram para a fidedignidade dos dados obtidos.

A escolha do Teste de Micronúcleo para avaliação de danos cromossômicos constituiu-se em escolha adequada para este tipo de análise. Este é um teste relativamente simples, econômico, não invasivo e adequado ao monitoramento de lesões pré-malignas e de populações expostas a agentes genotóxicos (STICH; ROSIN, 1983; CERQUEIRA, 1998).

O protocolo sugerido por Tolbert et al. (1991; 1992), adotado neste estudo permitiu avaliar, além dos danos cromossômicos expressos como micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares degenerativas relacionadas a apoptose. Tais alterações são habitualmente observadas em epitélios que estão em constante renovação, mas que ocorrendo em frequências maiores que as habituais são *per se*, indicativas de genotoxicidade.

Apesar de todos estes aspectos favoráveis ao estudo, é preciso destacar alguns fatores que limitaram o tamanho amostral, próprios ou não, de um estudo do tipo caso-controle. Em relação a este tipo de estudo, há obrigatoriedade (e oportunidade) de diagnóstico para inclusão do indivíduo no Grupo Caso. Por interferência de fatores alheios à natureza do estudo, vale considerar que 1) a maioria das clínicas para atendimento odontológico de rotina da UEFS não possui rotatividade e; 2) durante um período de três meses, por conta de greve deflagrada pelos professores, as clínicas odontológicas da UEFS permaneceram fechadas.

6.2 Perfil da amostra estudada

A média de idade calculada para o Grupo Caso ($\bar{X}_{id}= 61,74 \pm 16,89$) foi significativamente maior que a média de idade do Grupo Controle ($\bar{X}_{id}=43,44 \pm 16,60$), corroborando dados da literatura que apontam o câncer de boca, assim como a maioria dos tipos de cânceres e, também, as lesões pré-malignas, acometendo homens e mulheres em idades mais avançadas, por volta da 5ª e 6ª décadas de vida (RODRIGUES et al., 2000; CARVALHO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Ocorrência de câncer oral, ou de suas lesões precursoras, em indivíduos jovens tem sido, contudo, descrita em alguns estudos e a investigação da etiologia dessas lesões nesses indivíduos não tem evidenciado os hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas em associação com o seu desenvolvimento e, nesses casos, fatores outros como a susceptibilidade genética e/ou a infecção por tipos oncogênicos dos HPVs têm sido evocados (LLEWELLYN et al., 2004; CHITAPANARUX et al., 2006).

Em relação ao sexo, não foi observada diferença significante entre os Grupos Caso e Controle na proporção de homens e mulheres. Contudo, o número de mulheres foi maior em ambos os Grupos, com significância estatística apenas para o Grupo Controle. Predomínio de câncer oral em indivíduos do sexo masculino em relação ao feminino tem sido observado na maioria dos estudos, ocorrendo diferença em sua incidência em uma proporção de aproximadamente 5:1 (CARVALHO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Segundo estes autores, contudo, a crescente adoção pelas mulheres de hábitos antes quase exclusivos dos homens tem contribuído para o aumento da ocorrência deste tipo de câncer em mulheres. Proporções mais baixas que a 5:1 descrita por Carvalho et al. (2001) e Oliveira et al. (2006), de 3:1; 3,35:1 e 3,6:1 foram descritas, respectivamente por Perussi et al. (2002), Dedivitis et al. (2004) e Siriwardena et al. (2006). Proporção ainda menor na ocorrência de câncer oral invasivo, entre homens e mulheres da ordem de 1,5:1 foi descrita em estudo retrospectivo (1998-2003), realizado no Hospital Escola da Universidade de Nigéria por Oji e Chukwuneke (2007). O maior número de mulheres integrando o Grupo Controle, observado no presente estudo, sugere que as mulheres em Feira de Santana procuram os serviços de saúde odontológicos em maior frequência do que os homens. Embora não haja diferença estatística significante entre o número de homens e mulheres no Grupo Caso, estas foram maioria apontando para a tendência no aumento de casos

de câncer oral entre as mulheres, provavelmente, e como já sugerido por outros autores, em função da adoção dos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas. Vale destacar que do total de indivíduos que apresentam lesões pré-malignas 72,7% são mulheres, sendo possível supor que estas procuram mais assiduamente que os homens por serviços de saúde em estágios precoces da doença onde a intervenção e o tratamento são menos traumáticos.

Condições socioeconômicas adversas são historicamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas morbidades. Dentre os indicadores socioeconômicos mais utilizados em estudos epidemiológicos para avaliação de sua associação com o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço inclui-se a escolaridade (ABDO; GARROCHO; AGUIAR, 2002; HASHIBE et al. 2003; MELO et al., 2005; WONG et al., 2006). Nesse estudo, aproximadamente 40% dos indivíduos do Grupo Caso são analfabetos, enquanto que no Grupo Controle, apenas 7% nunca estudaram. Nesse sentido, os indivíduos portadores de lesões, foram caracterizados por pouca ou nenhuma escolaridade, corroborando outros estudos na literatura que relataram risco mais elevado de desenvolver neoplasias malignas de cabeça e pescoço em indivíduos sem escolaridade ou com pouca escolaridade, quando comparados aos indivíduos com maior escolaridade (MAIER; TISCH, 1997; RAO; DESAI, 1998; ESCRIBANO-UZCUDUN et al., 2002; HASHIBE et al. 2003; MELO et al., 2005; WONG et al., 2006; OJI; CHUKWUNEKE, 2007). Esses achados revelam a necessidade de atenção voltada aos grupos da população sem instrução, incluindo na agenda dos municípios a educação em saúde, vez que o câncer de boca é, maioria das vezes, evitável, não só pela cessação dos hábitos considerados de risco, mas, também, pelo auto-exame permitindo a identificação precoce de lesões na boca. Refletem ainda, a necessidade de padronização da metodologia para avaliação da variável escolaridade, vez que na maioria das investigações é feita categorização por anos de estudo, não traduzindo fielmente a maior ou menor instrução dos indivíduos estudados.

A higiene bucal foi considerada como insatisfatória em 90,3% dos indivíduos do Grupo Caso, e 71,8% do Grupo Controle, corroborando os resultados observados por Bonan et al. (2006). Estes autores avaliaram a condição odontológica de 40 indivíduos de baixo nível socioeconômico portadores de carcinoma espinocelular de cabeça ou de pescoço e observaram que a totalidade dos indivíduos apresentava higiene oral deficiente. Alguns autores sugerem que a má higiene oral pode estar relacionada ao desenvolvimento do câncer oral e de suas lesões precursoras por propiciar, por mais tempo, o contato da mucosa oral com o álcool presente nas

bebidas alcoólicas e com carcinógenos presentes no tabaco (VELLY et al., 1998; DEDIVITIS et al., 2004).

Estudos epidemiológicos realizados na década de 90 apontaram o uso de prótese dentária como relacionado ao desenvolvimento do câncer oral (BUNDGAARD et al., 1995; REIS et al., 1997; SCHILDT et al., 1998; VELLY et al., 1998). Em estudo mais recente, contudo, tal associação não tem sido observada (TOPORCOV et al., 2004), o que está em consonância com os resultados obtidos nesse estudo e também com os descritos por Dedivitis et al. (2004), em estudo retrospectivo, no qual foi detectado uso de prótese em apenas nove dos 45 portadores de câncer de cabeça e pescoço. Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira et al. (2006), que realizaram também estudo retrospectivo, e constataram que dentre os 340 indivíduos com carcinoma oral, o traumatismo causado por prótese estava presente em 55 deles (20%).

Na amostra analisada neste estudo, o hábito de fumar, fator de risco mais comumente associado ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do epitélio bucal, foi informado por 61,3% e 30,6% dos indivíduos que integraram, respectivamente, os Grupos Caso e Controle. Freqüências elevadas de usuários de tabaco, acima de 50%, em amostras de portadores de carcinomas orais e leucoplasias foram encontradas, também, por diversos autores: Kulasegaram et al., 1995; Schepman et al., 1998; Jaber et al., 1999; Dedivitis et al., 2004; Bonan et al., 2006; Chitapanarux et al., 2006.

Diversos estudos na literatura, em que os efeitos da quantidade de cigarros consumida e a duração do hábito de fumar foram avaliados mostram uma relação do tipo dose/resposta entre os indivíduos portadores de lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral (BLOT et al., 1996; JABER et al., 1999; MORENO-LÓPEZ et al., 2000; DEDIVITIS et al., 2004). Rautava et al. (2007) em estudo que incluiu 186 indivíduos portadores de carcinoma escamocelular da cavidade oral (102 dos quais eram fumantes) relatam que entre os fumantes, a duração do hábito estava fortemente relacionada com o estágio mais avançado da doença, ocorrendo aumento do risco da doença de 34% a cada dez anos do hábito de fumar ($p = 0,05$). Na amostra analisada neste estudo, a maioria dos indivíduos, tanto no Grupo Caso quanto no Grupo Controle consumia uma quantidade menor ou igual a 10 cigarros/dia, o que provavelmente explica o fato de não ter sido detectado efeito do tipo dose-resposta. Apesar de no Grupo Caso, a totalidade dos indivíduos fumar há mais de 20 anos, efeitos do tipo dose resposta também não foram observados, o que

pode ser devido ao fato de que tais efeitos só sejam observados em indivíduos que são consumidores de um grande número de cigarros.

Assim como o hábito de fumar, a ingestão de bebidas alcoólicas tem sido apontada como fator de risco na carcinogênese oral, quer isoladamente ou em concomitância com o hábito de fumar (ZAVRAS et al., 2001; LLEWELLYN et al., 2003; SALASPURO, 2003). Em estudo realizado por Dedivitis et al. (2004), o etilismo foi relatado por 74% dos indivíduos com carcinoma escamocelular de boca, enquanto os demais relataram não ingerir bebida alcoólica. A proporção de indivíduos com lesões orais que referiram uso de bebidas alcoólicas neste estudo é de apenas 25%, mas significativamente maior do que o observado no Grupo Controle (4,2%).

Os antissépticos bucais são soluções que contém, maioria das vezes, elevadas concentrações de álcool. Como são utilizadas em bochechos de mais ou menos 60 segundos a ação tópica desta substância se faz de modo mais duradouro do que quando o indivíduo procede à ingestão de bebidas alcoólicas, o que poderia exercer efeito lesivo ao epitélio oral. No presente estudo não foi detectada diferença no uso de antissépticos bucais entre os indivíduos dos grupos Caso e Controle. Resultados semelhantes foram descritos por Morse et al. (1997) em estudo do tipo caso controle que incluiu 254 indivíduos com displasia epitelial e igual número de controles. Reis et al. (1997) e Blot et al. (1988), contudo encontraram associação entre uso de antissépticos bucais e o desenvolvimento de câncer da mucosa jugal e da orofaringe. Corroborando os dados obtidos neste estudo, os resultados descritos por Kabat et al. (1989); Elmore ; Horwitz (1995) e Winn et al. (2001) não revelaram tal associação.

6.3.1 Sítio de origem das lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral

As lesões pré-malignas do epitélio oral, embora possam se desenvolver em qualquer região da cavidade oral têm sido mais frequentemente descritas na mucosa jugal, língua e assoalho de boca (MORSE et al., 1997; SCHEPMAN et al., 1998; JABER et al., 2003; FREITAS et al., 2006; LEE et al., 2006; RAUTAVA et al., 2007; THOMSON; HAMADAH, 2007). No presente estudo, a mucosa jugal foi a localização mais freqüente dessas lesões, corroborando dados da literatura. Em relação ao carcinoma escamocelular, assim como nas lesões pré-

malignas, a língua e o assoalho são apontados na literatura como as localizações predominantes na cavidade oral (CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; PERUSSI et al., 2002; DEDIVITIS, 2004; OJI; CHUKWUNEKE, 2007; RAUTAVA et al., 2007). Perussi et al. (2002) relataram as seguintes freqüências de localização desse câncer: língua (41%), língua e assoalho bucal (30%), gengiva (13%), palato (12%) e região jugal (4%). Em estudo realizado por Gervásio et al. (2001), a língua foi também o sítio mais comum de ocorrência do carcinoma escamocelular, correspondendo a 44% dos casos, seguido pelo assoalho bucal com 16%. Dedivitis et al. (2004) observaram ainda freqüência maior de acometimento desse câncer na língua (51,1%); seguindo-se na seqüência: assoalho de boca (26%), região retromolar (9%), pilar anterior (7%), mucosa jugal (5%) e rebordo alveolar (2%). A língua (24 indivíduos) e o assoalho (17 indivíduos) foram, também, as áreas mais acometidas por carcinomas orais, em estudo realizado por Oji; Chukwuneke (2007). A mucosa jugal foi o sítio de maior incidência relatado em pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço acima de 60 anos (AMAR et al., 2002). Os resultados obtidos no estudo aqui apresentado corroboram aqueles que apontam língua e assoalho da boca como as regiões mais freqüentes em que se desenvolvem o carcinoma escamocelular e; nas lesões pré-malignas, a mucosa jugal.

6.4 Ocorrência de Micronúcleos

A ocorrência de danos cromossômicos e sua relação com a carcinogênese tem sido avaliada através do Teste de Micronúcleo, tanto em linfócitos como em células esfoliadas de diversos tecidos (CERQUEIRA et al., 1998; CASARTELLI et al., 2000; LEAL-GARZA et al., 2002; HALDER et al., 2004). No epitélio oral, micronúcleos são considerados importantes biomarcadores do risco de desenvolvimento de câncer e da progressão neoplásica (CASARTELLI et al., 2000; DELFINO et al., 2002; HALDER et al., 2004; SARAN et al., 2007).

As células coletadas das áreas com lesão dos indivíduos que neste estudo integraram o Grupo Caso apresentaram uma freqüência de micronúcleos significativamente maior do que a observada nas células da mucosa oral normal dos indivíduos deste Grupo e, também, do Grupo Controle em todas as análises estatísticas empregadas, corroborando estudos que revelam o

processo de transformação maligna no epitélio oral, a exemplo de outros epitélios, em associação com o aumento da frequência de danos genéticos (CASARTELLI et al., 2000; HALDER et al., 2004; SARAN et al., 2007; RAMIREZ; SALDANHA, 2002). Em consonância com os resultados obtidos por esses autores, neste estudo as frequências de micronúcleos não diferiram quando comparadas células obtidas da mucosa oral normal dos indivíduos do Grupo Caso e indivíduos do Grupo Controle.

6.4.1. Ocorrência de Micronúcleos em função dos parâmetros avaliados

Diversos estudos na literatura têm avaliado a influência da idade, do sexo e da exposição a agentes genotóxicos (relacionados, sobretudo, aos hábitos e estilo de vida) na indução de micronúcleos em diversos tipos celulares (ODAGIRI; UCHIDA, 1998; ALBERTINI et al., 2000; DIETZ et al., 2000; FENECH et al.; 2001; BONASSI et al., 2003; SUHAS et al., 2004; Wu et al., 2004; FREITA et al., 2005; MEIRELES, 2003). Os resultados desses estudos, contudo, são conflitantes sendo apontado em alguns deles associações entre esses parâmetros, enquanto em outros não são observadas associações, o que pode ser devido a diferenças metodológicas e/ou a diferenças inerentes à própria variabilidade intra e inter individual das amostras analisadas.

Idade

Em alguns trabalhos tem sido relatada associação entre o aumento de idade e aumento no número de micronúcleos (FENECH & MORLEY, 1985a; THIERENS, 1991; HOLMEN, 1995; BARALE, 1998; ODAGIRI & UCHIDA, 1998; ALBERTINI et al., 2000; TESTA et al., 2002; JOSEPH; PATWARDHAN; SAMUEL, 2004; SUHAS et al., 2004). Outros estudos, entretanto não apontam para essa associação (KARAHALIL et al., 1999; JAGETIA et al., 2001; RAMÍREZ; SALDANHA, 2002; KONOPACHA, 2003;). Esta associação é mais consistentemente relatada nas análises feitas em linfócitos periféricos (FENECH & MORLEY, 1985a; THIERENS, 1991; HOLMEN, 1995; BARALE, 1998; ODAGIRI & UCHIDA, 1998).

do que em células esfoliadas (SARTO et al., 1987; ÖZKUL et al., 1997; CERQUEIRA et al., 1998; KARAHALIL et al., 1999).

Em células esfoliadas do epitélio oral, falta de associação entre a ocorrência de micronúcleos e aumento da idade foi relatada por Sarto et al. (1987); Özkul et al. (1997); Karahalil et al. (1999); Ramírez ; Saldanha (2002) e Konopacha (2003). Em concordância com esses estudos, nesta investigação não foi detectada significância estatística na ocorrência de micronúcleos em função do aumento da idade, resultados que diferem daqueles descritos por Pinto et al. (2000); Wu et al. (2004), Suhas et al. (2004) e Bloching et al. (2007).

Possivelmente, a perda da efetividade dos mecanismos de reparo do DNA com o aumento da idade em consequência do acúmulo de mutações, é um fator que pode contribuir para associação positiva entre frequência de MN e aumento da idade (CERQUEIRA; 2005).

Sexo

A ocorrência de micronúcleo em função do sexo, a exemplo da idade, tem sido descrita de modo controverso na literatura, quer quando avaliada sua ocorrência em linfócitos quanto em células esfoliadas. Os estudos em que não foi observada associação entre sexo e ocorrência de micronúcleos incluem aqueles realizados por Burgaz et al. (1999); Karahalil et al. (1999); Dietz et al. (2000); He et al. (2000); Fenech et al. (2001); Jagetia et al. (2001); Maffei et al. (2002); Konopacha et al. (2003), Joseph; Patwardhan; Samuel (2004); Zakeri ; Assaei (2004). Em contraposição a esses resultados, e em consonância com os obtidos no presente estudo, nas investigações conduzidas por Barale et al. (1998); Fenech et al. (1998); Bonassi et al. (2001); Testa et al. (2002); Joksic ; Petrovic (2004); Angelini et al. (2005), frequências significativamente maiores de micronúcleos foram relatadas entre as mulheres. Santos (2003); Meireles et al. (2006) e Bloching et al. (2007), contudo, observaram ocorrência significativamente maior dessas estruturas entre os homens.

Escolaridade

Nos últimos anos, a avaliação dos fatores sócio-econômicos, a exemplo da escolaridade, relacionados ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral tem sido alvo

de interesse de inúmeros pesquisadores. Contudo, os estudos nessa linha estão voltados para análise descritiva (ABDO; GARROCHO; AGUIAR, 2002; HASHIBE et al. 2003; MELO et al., 2005; WONG et al., 2006; OJI; CHUKWUNEKE, 2007), não havendo registro na literatura de estudos, a exemplo deste em que a influência da escolaridade sobre a ocorrência de micronúcleos foi avaliada. A falta de associação entre essas variáveis detectada neste estudo deve ser vista em função da disparidade no grau de instrução entre os indivíduos analisados, haja vista por exemplo o fato de que apenas cinco indivíduos no Grupo Controle serem analfabetos, enquanto 38,7 % destes entre os integrantes do Grupo caso estavam incluídos nesta categoria. Além disso, por limitações metodológicas, foram agrupados indivíduos com baixa escolaridade no subgrupo “com escolaridade” do Grupo Caso, onde a maioria dos indivíduos sequer concluiu o primeiro grau. Nesse sentido, há necessidade de melhor padronização dessa variável, o que seria idealmente feito com amostras maiores. A incorporação dessa análise em estudos similares a este se faz necessária para conclusões mais consistentes e é recomendada dado o reconhecido impacto de fatores sócio-econômicos na saúde.

Higiene Bucal e Uso de Prótese Dentária

A higiene bucal e o uso de prótese dentária têm sido apontada, principalmente em estudos realizados em tempos mais pretéritos, em associação com a carcinogênese oral (BUNDGAARD et al., 1995; SCHILDT et al., 1998; VELLY et al., 1998; MORENO-LÓPEZ et al., 2000).

Estudo objetivando a avaliação da associação entre a ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal e a higiene oral e fatores dentais foi realizado por Bloching et al. (2007). Os resultados encontrados pelos autores, do mesmo modo que os obtidos neste estudo, não revelam diferença com significância estatística em relação à qualidade da higiene oral, nem quanto ao uso de prótese. No entanto, nos indivíduos com periodontite severa a ocorrência de micronúcleos foi mais elevada ($2,16 \pm 0,85$), seguido dos indivíduos com periodontite de moderada a severa ($1,91 \pm 1,04$) e indivíduos sem doença periodontal ($1,50 \pm 1,06$).

Apesar de não haver evidências que sustentem essa associação, deve ser considerado o fato de que a má higiene oral permite que os carcinógenos presentes no tabaco, e o álcool presente nas bebidas alcoólicas, permaneçam mais tempo em contato com a mucosa oral, e que o

traumatismo conseqüente ao uso de próteses mal adaptadas, leva ao aumento da proliferação celular para reconstituir o tecido lesionado, o que possibilita maior oportunidade para a ocorrência de falhas cromossômicas quando da divisão celular.

Hábito de Fumar

A avaliação de danos cromossômicos em conseqüência do hábito de fumar feita através da análise de micronúcleos tem registro amplo na literatura, embora com resultados controversos tanto quando feita avaliação em linfócitos quanto em células esfoliadas do epitélio oral (STICH; ROSIN, 1983; TOMANIN et al., 1991; BARALE et al., 1998; BONASSI et al., 2003; WU et al., 2004; FREITA et al., 2005; HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005).

Em linfócitos periféricos, alguns estudos apontam para a associação positiva (TOMANIN et al., 1991; HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005) enquanto outros relatam resultados negativos (BARALE et al., 1998; BONASSI et al., 2003). Objetivando a avaliação dos efeitos do hábito de fumar na indução de micronúcleos nessas células, Bonassi et al. (2003) realizaram uma re-análise da literatura envolvendo os resultados de 24 bancos de dados do HUMN (*Human MicroNucleus project*). Dentre os 5.710 indivíduos que constituíram a amostra, 3.501 não fumavam, 1.409 eram fumantes e 800 indivíduos ex-fumantes. A comparação da ocorrência de micronúcleos entre fumantes e ex-fumantes com os não-fumantes não revelou diferenças significantes: FR = 0,97; IC = 0,93-1,01 e; FR = 0,96; IC = 0,91-1,01; respectivamente.

Em células esfoliadas do epitélio oral, nos estudos realizados por Stich; Rosin (1983) e Freita et al. (2005) não foram detectadas diferenças significantes na ocorrência de micronúcleos entre fumantes e não-fumantes. Os autores sugerem que a falta de associação se deve ao fato que os indivíduos que constituíram a amostra fumavam menos de 10 cigarros por dia.

Associação positiva na ocorrência de micronúcleos entre fumantes e não-fumantes em função da quantidade de cigarros foi descrita por Wu et al. (2004). Esses autores observaram em células esfoliadas da mucosa bucal freqüências mais elevadas de micronúcleos apenas entre fumantes de mais de 20 cigarros/dia quando comparados aos não-fumantes. Resultados semelhantes, foram descritos por Bloching et al. (2000) em estudo que incluiu indivíduos

saudáveis, pacientes com câncer de cabeça e pescoço e pacientes com leucoplasia, e, também, por Ozkül et al. (1997) que também relataram frequência significativamente maior de micronúcleos em células da mucosa oral de fumantes de mais de dez cigarros por dia.

Neste estudo, o consumo de tabaco informado pelos indivíduos foi em torno de dez unidades/dia (M=10) tendo sido observado aumento significativo na frequência de micronúcleos quando comparados fumantes e não-fumantes. Resultados semelhantes a esse foram descritos por Sarto et al. (1987); Özkul et al., (1997); Duffaud et al., (1999); Bloching et al., (2000); Konopacka (2003).

Efeitos do tipo dose resposta não foram detectados neste estudo, e também não foi observada associação com a duração do hábito de fumar. Resultados similares foram descritos por Hoffmann ; Speit (2005) que não observaram diferenças na ocorrência de danos genéticos (avaliados pelo Teste de Micronúcleo e pelo Ensaio Cometa) quando comparados fumantes que consumiam mais de vinte cigarros/dia e fumantes com consumo inferior a esta quantidade.

Antissépticos Bucais

A indução de danos genéticos em consequência do uso de antissépticos bucais foi avaliada no estudo de Freita et al. (2005). Esses autores relataram frequência significativamente maior de micronúcleos entre os indivíduos que faziam uso de antissépticos bucal, quando comparados a um grupo controle. Na discussão desses resultados, Freita et al. (2005) chamam a atenção para o pequeno número de indivíduos que fazia uso dessas soluções (cinco), razão porque deveriam ser vistos com reserva. Os resultados obtidos no presente estudo, relativo ao uso de antissépticos bucais, corroboram os obtidos por esses autores e são referentes a uma amostra significativamente maior do que a analisada por eles, apontando para o potencial dos antissépticos bucais na indução de micronúcleos, o que pode ser devido à presença de etanol nessas preparações.

6.4.2 Ocorrência de micronúcleos na progressão da transformação maligna

O Teste de Micronúcleo em células esfoliadas tem sido aplicado no biomonitoramento de lesões pré-malignas tanto no cérvix uterino como na cavidade oral e resultados semelhantes têm sido relatados, apontando para a eficácia de sua utilização na avaliação de danos genéticos no evoluir do processo de transformação maligna (CERQUEIRA et al., 1998; CASARTELLI et al., 2000; LEAL-GARZA et al., 2002; HALDER et al., 2004; SARAN et al., 2007).

No presente estudo, a avaliação da ocorrência de micronúcleos na progressão maligna foi avaliada com a amostra subdividida em três grupos: Grupo I, formado pelos indivíduos sem alterações na mucosa oral; Grupo II, integrado pelos indivíduos que apresentavam lesões pré-malignas e; Grupo III, constituído por portadores de câncer oral. Os indivíduos do Grupo III (portadores de câncer oral) apresentaram uma frequência de micronúcleos significativamente maior do que a observada nas células dos indivíduos tanto do Grupo II (lesões pré-malignas) quanto do Grupo I (sem alterações na mucosa oral). A frequência de micronúcleos foi significativamente maior nas células coletadas dos indivíduos do Grupo II quando comparados aos do Grupo I. Esses resultados corroboram os obtidos por Bloching et al. (2000), Casartelli et al. (2000), Delfino et al. (2002); Halder et al. (2004) e Saran et al. (2007), mostrando que a transformação maligna envolve um aumento na frequência de células com danos cromossômicos, sugerindo que o micronúcleo pode ser um marcador da carcinogênese oral.

A frequência média de micronúcleos observada neste estudo entre os indivíduos com lesões pré-malignas, quando analisadas as células obtidas das áreas onde elas se desenvolvem, é aproximadamente duas vezes maior do que a observada no Grupo Controle ($\bar{X}_{MN} = 0,82$ e $\bar{X}_{MN} = 0,45$, respectivamente) e semelhantes às descritas por Bloching et al. (2000), que encontraram uma frequência de micronúcleos duas vezes mais elevada entre indivíduos com leucoplasias (n=16) quando da comparação com 99 indivíduos sem alterações da mucosa oral. Frequências maiores de micronúcleos entre portadores de lesões, tanto pré-malignas quanto malignas, do epitélio oral em comparação com indivíduos apresentando mucosa oral normal foram também descritas por Delfino et al. (2002).

O estudo de Casartelli et al. (2000) diferiu deste por incluir na amostra, além dos indivíduos com mucosa oral normal (GC); com lesões pré-malignas (LP) e com câncer oral (CE), indivíduos que tinham sido submetidos à cirurgia ou radioterapia em conseqüência de carcinomas

orais prévios (CP). Da análise de seus resultados, os autores concluem haver um gradiente na ocorrência de micronúcleos em que $GC < LP = CP < CE$. A falta de diferença observada entre os portadores de lesões pré-malignas e os indivíduos com carcinomas prévios, provavelmente se deve ao fato de que a radioterapia, procedimento terapêutico a que alguns dos indivíduos foram submetidos tenha induzido a formação de micronúcleos.

A metodologia empregada por Halder et al. (2004), na avaliação da ocorrência de micronúcleos no evoluir das lesões pré-malignas do epitélio oral foi similar à utilizada por Casartelli et al. (2000), e os resultados obtidos revelam também a existência de um gradiente de frequência a partir da mucosa oral normal para o câncer (GC: 0,35%; LP: 0,63%; CO: 1,36%). A frequência observada entre os indivíduos que foram submetidos a tratamento prévio do câncer oral foi intermediária entre a observada nos indivíduos com mucosa oral normal e a daqueles apresentando lesões pré-neoplásicas (CP = 0,44%).

O Teste de Micronúcleo foi um dos três marcadores utilizados por Saran et al. (2007) em estudo que objetivou o biomonitoramento das lesões pré-malignas na cavidade oral. A amostra desse estudo foi constituída por 129 indivíduos com câncer oral, 138 com lesões pré-malignas e 176 indivíduos controles. Os autores também descrevem aumento gradual na ocorrência de micronúcleos a partir do epitélio normal até as lesões malignas.

Semelhante ao que ocorre no epitélio bucal, Cerqueira et al. (1998); Leal-Garza et al. (2002) e Guzmán et al. (2003) detectaram uma maior ocorrência de micronúcleos nas mulheres com lesões mais severas do epitélio cervical do que a observada entre as mulheres com lesões de menor gravidade, sugerindo que a progressão para a transformação maligna está associada à maior ocorrência de células com danos cromossômicos e que micronúcleos em células esfoliadas do cérvix uterino pode ser um critério adicional no estabelecimento dos riscos de desenvolvimento do câncer cervical.

Em linfócitos, danos cromossômicos relacionados à progressão neoplásica analisados, também, pelo Teste de Micronúcleo foram descritos por Duffaud et al. (1999) e Leal-Garza et al. (2002). Duffaud et al. (1999) observaram em pacientes não-fumantes com câncer de cabeça e pescoço, uma frequência de micronúcleos significativamente maior do que em indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos por Leal-Garza et al. (2002), em estudo que avaliou a ocorrência de micronúcleos em linfócitos de mulheres sem alterações do cérvix uterino; mulheres com diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NICs I, II e III) e mulheres portadoras de

câncer cervical, revelam um gradiente na frequência de micronúcleos (cérvix normal < NIC < câncer cervical).

6.4.3 Influência do hábito de fumar na ocorrência de Micronúcleos em função do diagnóstico histopatológico

A ocorrência de danos cromossômicos consequentes ao hábito de fumar e sua relação com a progressão maligna, avaliadas através do Teste de Micronúcleo, foi investigada por Cerqueira et al. (1998) em células esfoliadas do cérvix uterino. Os autores observaram que em mulheres não-fumantes com diferentes graus de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) a ocorrência de micronúcleos era significativamente maior entre as que apresentavam lesões de maior gravidade (NIC, II+III) quando comparadas àquelas exibindo lesões de menor gravidade (NIC I). Tal associação, contudo, não foi observada entre as mulheres fumantes. Nestas, as frequências de micronúcleos não diferiram entre mulheres com NICs II + III e mulheres com NIC I. Segundo os autores, estes resultados sugerem que o hábito de fumar introduz um risco adicional à ocorrência de micronúcleos e levantam a hipótese de que as mulheres com NIC I que são fumantes estariam sob um risco maior de progressão para as lesões mais graves por apresentarem uma maior proporção de danos citogenéticos.

Na presente investigação, a ocorrência de micronúcleos nas células esfoliadas do epitélio bucal dos fumantes foi significativamente maior nas células coletadas dos indivíduos com lesões malignas (Grupo III) tanto quando feita comparação com sua ocorrência nas lesões pré-malignas (Grupo II) quanto no epitélio normal (Grupo I). A ocorrência de micronúcleos entre portadores de lesões pré-malignas e controles não foi significativamente diferente. Estes resultados, embora apontem para o incremento da ocorrência de danos cromossômicos em consequência do hábito de fumar devem ser vistos com reserva dado o pequeno número de indivíduos fumantes apresentando lesões pré-malignas (apenas quatro).

Considerando os indivíduos não-fumantes, foi observado que a ocorrência de micronúcleos nas lesões malignas e pré-malignas é significativamente maior do que a observada nos indivíduos apresentando mucosa oral normal, o que corrobora os estudos que apontam para uma maior ocorrência de danos cromossômicos no processo de transformação maligna. Não foi, contudo, detectada diferença significativa na ocorrência dessas estruturas quando feita comparação entre os

Grupos II e III, revelando que o gradiente na ocorrência de micronúcleos a partir do epitélio oral normal que foi evidenciado na amostra total se deve, além da instabilidade genética associada à progressão da transformação maligna, a efeitos genotóxicos adicionais conseqüentes ao hábito de fumar.

A comparação da ocorrência de micronúcleos entre fumantes e não-fumantes dentro de cada grupo, revelou diferença apenas para os indivíduos do Grupo I, traduzida em um número significativamente maior de micronúcleos em fumantes quando comparados aos não-fumantes. Esses resultados revelam os efeitos genotóxicos do tabaco na indução de micronúcleos nos indivíduos apresentando epitélio oral normal, contudo esses efeitos não se fazem sentir quando as lesões pré-malignas e malignas já estão instaladas.


6.5 Ocorrência de Apoptose

O processo de transformação maligna está associado à perda da capacidade da célula, frente aos danos genéticos, em evoluir para a morte (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Diversos estudos na literatura têm avaliado a apoptose em lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral utilizando diferentes marcadores (BIRCHALL et al., 1995; SCHOELCH et al., 1999; RAMIREZ, 2000; KUROPKAT et al., 2002; PIATTELLI et al., 2002; CHENG et al., 2004; BEN-IZHAK et al., 2005). O protocolo diferenciado de Tolbert et al. (1991,1992), metodologia adotada no presente estudo, oferece vantagens por permitir a observação, adicionalmente aos micronúcleos, de alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e necrose (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose).

Neste estudo, a ocorrência de alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose foi significativamente menor nas células obtidas das áreas de lesões malignas (Grupo III), quando comparada tanto às células obtidas das lesões pré-malignas (Grupo II) quanto às células normais dos indivíduos do Grupo I. Foi, também, significativamente menor nas células obtidas das áreas de lesões pré-malignas, quando comparadas às de mucosa normal. Esses resultados corroboram o fato de que o processo de transformação maligna está associado à perda da capacidade da célula em evoluir para a morte, frente a danos no DNA, estando de acordo com os resultados descritos por Ramirez; Saldanha (2002), que utilizando o mesmo protocolo adotado neste estudo,

observaram também menor frequência de apoptose nas células dos indivíduos portadores de carcinomas orais.

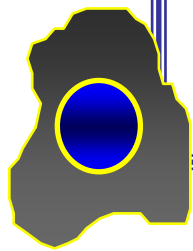
A menor ocorrência de apoptose observada nas células obtidas da mucosa normal dos indivíduos dos Grupos II e III em relação aos indivíduos do Grupo Controle é um dado novo e que surpreende, sugerindo fortemente que o comprometimento do processo de apoptose acomete o epitélio de forma generalizada e constitui-se em evento que antecede e propicia o desenvolvimento da transformação maligna.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O processo de transformação maligna no epitélio oral se faz acompanhar por um aumento na frequência de danos cromossômicos;
- Na transformação maligna ocorre perda da capacidade celular em evoluir para a morte frente aos danos ao DNA;
- Apoptose ocorre de modo generalizado em um epitélio no qual se desenvolve o processo de transformação maligna, antecedendo sua instalação;
- Compostos do cigarro são efetivos na indução de danos cromossômicos em células esfoliadas do epitélio oral
- Efeitos do tipo dose/resposta relativos ao hábito de fumar, não são observados sob baixa exposição;
- Uso de antisséptico bucal está associado à indução de danos cromossômicos.



Referências

REFERÊNCIAS

ABDO EM, GARROCHO A.A, AGUIAR, MCF. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. **Rev Bras. Cancerol.** 2002; 48(3):357-362.

ALBERTINI, R.J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat Res.**, v. 463, p. 111-172, 2000.

AMAR, A.; FRANZI, A.S.; RAPOPORT, A.; BISORDI, C.; LEHN, C.N. Qualidade de vida e prognóstico nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**; 68(3): 400-403, 2002.

ANDREOTTI, M.; RODRIGUES, N.A.; CARDOSO, L.M.N.; FIGUEIREDO, R.A.O.; ELUF-NETO, J.; WÜNSCH-FILHO, V. Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. **Cad. Saúde Pública** 2006; 22(3):543-552

ANGELINI, S.; KUMARB, R.; CARBONEA, F.; MAFFEIA, F.; FORTIA, G. C.; VIOLANTEB, F. S.; LODIB, V.; CURTI, S.; HEMMINKI, K.; HRELIA, P. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. **Mutat. Res.**, vol. 570, p. 105-117, 2005.

ARCHER, M.C. Cáncer y dieta. In: Ziegler EE, Filer Jr LJ, editors. **Conocimientos actuales sobre nutrición**, Publicación científica No 565. Organización Panamericana de la Salud: Washington, p. 515–20, 1997.

BARALE, R. et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population:II. Contribution of sex, age and lifestyle. **Environ Mol Mutagen.**, v. 31, p. 228-242, 1998.

BARALE, R.; CHELOTTI, L.; DAVINI, T.; DEL-REY, S.; ANDREASSI, M.G.; BALLARDIN, M.; BULLERI, M.; HE, J.; BALDACCI, S.; DI-PEDE, F.; GEMIGNANI, F.; LANDI, S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population. Part II. Contribution of sex, age and lifestyle. **Environ. Mol. Mutagen.**, 31: 228-242, 1998.

BEN-IZHAK, O.; KABLAN, F.; LASTER, Z.; NAGLER, R.M. Oropharyngeal cancer pathogenesis: Ubiquitin proteolytic, apoptotic and epidermal growth factor related pathways act in concert—first report. **Oral Oncology**: 41, 851–860, 2005

BIAZEVIC, M.G.H et al. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 22(10):2105-2114, 2006

BIRCHALL, M.A.; WINTERFORD, C.M.; ALLAN, D.J.; HARMON, B.V. Apoptosis in Normal Epithelium, Premalignant and Malignant Lesions of the Oropharynx and Oral Cavity: a Preliminary Study. **Oral Oncol, Eur J Cancer**, Vol. 31B, No. 6, pp. 380-383, 1995.

BLOCHING, M.; HOFMANN, A.; LAUTENSCHLÄGER, C.; BERGHAUS, A.; GRUMMT, T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay, **Oral Oncol.**, vol. 36, p. 550–555, 2000.

BLOCHING, M.; REICH, W.; SCHUBERT, J.; GRUMMT, T.; SANDNER, A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial, **Oral Oncology**, article in press doi:10.1016/j.oraloncology.2007.02.002, 2007

BLOT, W.J., Mc LAUGHLIN, J.K., WINN, D. M., AUSTIN, D. F., GREENBERG, R. S., PRESTON-MARTIN, S., BERNSTEIN, L., SCHOENBERG, J. B., STEMHAGEN, A., FRAUMENI Jr., J. F. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res.**, v. 48, n.11, p. 3282-87, 1988.

BLOT, W.J.; MCLAUGHLIN, J.K.; DEVESA, S.S.; FRAUMENI Jr., J.F. Cancers of the oral cavity and pharynx. In: SCHOTTENFELD, D.; FRAUMENI Jr., J.F, editors. **Cancer epidemiology and prevention**, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1996.

BONAN, P.R.F.; LOPES, M.A.; PIRES, F.R *et al.* Dental management of low socioeconomic level patients before radiotherapy of the head and neck with special emphasis on the prevention of osteoradionecrosis. **Braz. Dent. J.**, 2006, vol.17, no.4, p.336-342. ISSN 0103-6440.

BONASSI, S. et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**: 543, 155–166, 2003

BONASSI, S.; et al. Human Micronucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. Part I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. **Environ. Mol. Mutagen.**, vol. 37, p. 31-45, 2001.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M.N, RODRIGUES, M.A. LA. R., MONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese : Métodos e critérios de avaliação.** São Paulo: Sociedade Brasileira de genética, p.113-21, 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA) Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer (Pro- Onco). **Câncer de Boca: Manual de Detecção de Lesões Suspeitas**, Rio de Janeiro , p. 7-10, 1996.

BRASIL, Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, **Resolução N° 196 de 10 de Outubro de 1996**, 59ª Reunião Ordinária, 1996 b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 94p., 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 94p. il, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 94 p.il., 2007.

BUNDGAARD, T.; WILDT, J.; FRYDENBERG, M.; ELBROND, O.; NIELSEN, J.E. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. **Cancer Causes Control**, vol. 6, p. 57-67, 1995.

BURGAZ, S.; ISCAN, A.; BÜYÜKBİNGÖL, Z.K.; BOZKURT, A.; KARAKAYA, A.E. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers **Mutat. Res.**, vol. 335, p. 163-169, 1995.

BURGAZ, S.; KARAHALIL, B.; BAYRAK, P.; TASKIN, L.; YAVUZASLAN, F.; BOEKESYOY, I.; ANZION, R. B. M.; BOS, R. P.; PLATIN, N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. **Mutat. Res.**, vol. 439, p. 97-104, 1999.

CARVALHO, M.B.; et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino, **Rev Ass Med Brasil**; 47(3): 208-14, 2001

CASARTELLI, G; BONATTI, S.; FERRARI, M. De; et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma, **Anal. Quant. Cytol. Histol.** vol. 22 (6), p. 486– 492, 2000.

CASTELLI, E.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. ; FIMOIGNARI, C. ; FOSCHI, F.G. ; CAPUTO, F.; CANTELLI FORTI, G.; STEFANINI, G.F. ; GASBARRINI, G. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. **Hepato-Gastroenterol.**, vol. 46, p. 1664-1668, 1999.

CERQUEIRA, E.M.M. et al. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol.**, v. 42, p. 639-649, 1998.

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

CHENG, B. et al. Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral premalignant and malignant lesions: A preliminary study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**;97:465-70, 2004

CHITAPANARUX, I; et al. Oral cavity cancers at a young age: Analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. **Oral Oncology**: 42; 83–88, 2006.

CLARKE, A.R. et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. **Nature**, v. 362, p. 849-852, 1993.

DAVE, B. J. Role of areca nut consumption in day cause of oral cancers. **Cancer**, vol. 70, n. 5, p.1017-23, 1992.

DEDIVITIS, R.A. et al. Características clínico-epidemiológicas no Carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**. V. 70, n.1, 35-40, 2004

DELFINO, V.; CASARTELLI, G.; GARZOGLIO, B.; SCALA, M. et al. Micronuclei and p53 accumulation in preneoplastic and malignant lesions of the head and neck. **Mutagenesis**: 17(1), 73-77, 2002

DEMARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutat. Res.**, vol. 567, p. 447–474, 2004.

DERKA, S. et al. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. **Oral Oncology**: 42, 540–550, 2006.

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

DRUMMOND, S. N.; GOMEZ, R. S.; NORONHA, J.C.M.; PORDEUS, I.A.; BARBOSA, A.A., DE MARCO, L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects **Oral Oncology**, vol. 41, p. 515–519, 2005.

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

DUENSING, A.; DUENSING, S. Review Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 331, p. 694–700, 2005.

DUFFAUD, F. et al. Micronucleated lymphocyte rates from head-and-neck cancer patients. **Mutation Research**: 439, 259–266, 1999.

DURST, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., ZUR HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 80, p.3812-15, 1983.

EISENBERG, E.; D.J, KRUTCHKOFF, Lichenoid lesions of oral pathology. Diagnostic criteria and their importance in the alleged relationship to oral cancer. **Oral Surg Oral Path Oral Med**. 74:699-703, 1992.

ELMORE, J.G.; HORWITZ, R.I. Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. **Otolaryngol. Head Neck Surgery**; vol. 11, p. 253-261, 1995.

ENWONWU, C.O.; MEEKS, V.I. Bionutrition and oral cancers in Humans. **J. Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, vol. 6, p. 17-55, 1995.

ESCRIBANO-UZCUDUN, A.; et al. Pharyngeal cancer prevention: evidence from a case-control study involving 232 consecutive patients. **J Laryngol Otol**;116(7):523-31; 2002.

FACHIN, O. **Fundamentos de Metodologia**. 4. ed. São Paulo: Saraiva, 2003

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. **Mutat. Res.** 147: 29-36, 1985a.

FENECH, M. ; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation. **Mutat Res.**, v. 161, p. 193-198, 1986.

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat. Res.**, vol. 475(1-2), p. 57-67, 2001.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. **Mutat Res**, vol. 148, p. 99 –105, 1985b.

FERLAY, J.; PARKIN, D.M.; PISANI, P. **Globocan 2000: Cancer incidence and mortality worldwide**. Lyon, France: IARC, 2001.

FERNANDES, L. S.; PERES, M.A. Associação entre atenção básica em saúde bucal e indicadores socioeconômicos municipais. **Rev. Saúde Pública**; 39(6): 930-936, 2005.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus dre thymonucleinsäure und die daralf bestehende elektive farbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparate. **Z. Fisiol. Chem.**, vol. 135, p. 203-48, 1924.

FORNATORA, M.; JONES, A.C., KERPEL, S.; FREEDMAN, P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia) : An entity of unknown biologic potential . **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, vol. 82, p. 47-56, 1996.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues **Oral Oncology**, vol. 36, p. 106–115, 2000.

FRANCESCHI, S.; TALAMINI, R.; BARRA, S.; BARON, A.E.; NEGRI, E.; BIDOLI, E. et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. **Cancer Research**, vol. 50, p. 6502-6507, 1990.

FRANCO, E. L. , KOWALSKI, L.P, OLIVEIRA, B.V., CURADO, M.P., PEREIRA, R.N., SILVA, M. E., FAVA, A. S., TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, v. 43 (6), p. 992-1000, 1989.

FREITAS, M.D.; BLANCO-CARRIÓN, A.; GÁNDARA-VILA, P.; ANTÚNEZ-LÓPEZ, J.; GARCÍA-GARCÍA, A.; REY, J.M.G. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. Vol. 102: 199-203, 2006

FREITA, V.S. et al. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, p. 189-199, 2005.

GAREWAL, H. Antioxidants in oral cancer prevention. **Am. J. Clin. Nutr.**, vol. 62 (6): 140S-6S, 1995.

GERVÁSIO, O.L.A.S.; DUTRA, R.A.; TARTAGLIA, S.M.A.; VASCONCELOS, W.A.; BARBOSA, A.A.; AGUIAR, M.C.F. Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian Population. **Braz Dent J**;12(1):57-61, 2001

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. [traduzido por Paulo A. Motta]. Guanabara Koogan, 2006.

GOMEZ-ARROYO, S.; DIAZ-SANCHEZ, Y.; MENESES-PEREZ, M. A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; LEON-RODRIGUEZ, J.D. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides, **Mutat. Res.**, vol. 466, p. 117–124, 2000.

GONZÁLEZ-MOLES, M.A.; BASCONES-ILUNDAIN, C.; GIL MONTOYA, J.A.; RUIZ-AVILA, I.; DELGADO-RODRÍGUEZ, M.; BASCONES-MARTÍNEZ, A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: Molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. **Archives of Oral Biology**: 51, 1093—1103, 2006.

GRANVIL, L.; HAYS, D.D.S.; SCOTT, M.; LIPMAN, M.D.; CATHERINE, M.; FLAITSZ, D.D.S.; et al. Co-Carcinogenesis and field cancerization: oral lesions offer first signs. **Jada**, vol. 126, p. 47-51, 1995.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C.K.; MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. **Eur. J. Cancer**, vol. 37, p. 948–965, 2001.

GROSS, A.; MC DONNELL, J.J.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Dev**;13: 1899–911; 1999.

GUPTA, P.C.; HERBERT, J.R.; BHONSLE, R.B.; MURTI, P.R.; MEHTA, H.; MEHTA, F.S. Influence of dietary factors on oral precancerous lesions in a population-based case-control study in Kerala, India. **Cancer**, vol. 85, p. 1883-1885, 1999.

GUZMÁN, P.; SOTELO-REGIL, R.C.; MOHAR, A.; GONSEBATT, M.E. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in Papanicolaou smears. **Environ Mol Mutagen**. 41(5): 339-43, 2003.

HALDER, A. et al. Comparative study of exfoliated oral mucosal cell micronuclei frequency in normal, precancerous and malignant epithelium. **Int J Hum Genet.**, v. 4, p. 257-260, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, vol. 100, p. 57-70, 2000.

HARRINGTON, K.J. Biology of Cancer. *Cancer Biology and Imaging – Medicine*: 36(1), 1-4, 2007.

HASHIBE, M. et al. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncology**: 39, 664–671, 2003

HE, J.L.; CHEN, W.L.; JIN, L.F.; JIN, H.Y. Comet assay and cytokinesis-blocked micronucleus test for monitoring the genotoxic effects of X-ray radiation in humans. **Mutat. Res.**, vol. 469, p. 223-231, 2000.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, vol. 123, p. 61-118, 1983.

HEEPCHANTREE, W.; PARATASILPIN, T.; KANGWANPONG, D.A Comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer using the chromosome aberration and the micronucleus tests. **Mutat Res.**, v. 587, p. 134-139, 2005.

HEMEKING, H. ; EICK, D. Mediation of c-myc induced apoptosis by p53. **Science**, v. 265, p. 2091-2093, 1994.

HIETANEN, J.; PAASONENA, M.-R.; KUHLEFELT, M.; MALMSTRO, M. A retrospective study of oral lichen planus patients with concurrent or subsequent development of malignancy. **Oral Oncology**; 35: 278±282, 1999.

HOFFMANN, H. ; SPEIT, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. **Mutat Res.**, v. 581, p. 105-114, 2005.

HOLMEN, A.; KARLSSON, A.; BRATT, I.; HOGSTEDT, B. Increased frequencies of micronuclei in T8 lymphocytes of smokers. **Mutat. Res.**, vol. 334(2), p. 205-8, 1995.

HOMANN, N.; TILLONEN, J.; RINTAMÄKI, H.; SALASPURO, M.; LINDQVIST, C.; MEURMAN, J.H. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers **Oral Oncology**, v.37, p. 153-158, 2001.

HUSGAFVEL-PURSIANEN, K., MAKI-PAKKANEN, J., NORPPAHSORSA, M. Smoking and sister-chromatid exchange. **Hereditas**, vol. 92, p. 247-50, 1980.

IARC **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, Alcohol Drinking**, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vol. 44, p. 251–321, 1988.

IARC, **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human, Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut Related Nitrosamines**, International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon, France, vol. 85, p. 11–18, 2003.

IARC, **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans**, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vol. 83, 2004.

IBIETA, B.R. ; LIZANO, M.; FRÍAS-MENDIVIL, M.; BARRERA, J.L.; CARRILLO, A.; RUÍZ-GODOY, L.M.; MOHAR, A. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population, **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, vol. 99, p. 311-315, 2005.

JABER, M.A.; PORTER, S.R.; GILTHORPE, M.S.; BEDI, R.; SCULLY, C. Risk factors for oral epithelial dysplasia - the role of smoking and alcohol. **Oral Oncology**: 35, 151-156, 1999

JAGETIA, G. C.; JAYAKRISHNAN, A.; FERNANDES, D.; VIDYASAGAR, M. S Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. **Mutat. Res.**, vol. 491, p. 9-16, 2001.

JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, S.; TAVASSOLI, M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk markers for head and neck, especially oral cancer and precancer. **Eur. J. Cancer Prev.**, vol. 5, p. 5-17, 1996.

JOKSIC, G. ; PETROVIC, S. Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**, v. 23, p. 195-206, 2004.

JOSEPH, L.J.; PATWARDHAN, U.N.; SAMUEL, A.M. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. **Mutat Res.**, v. 564, p. 83-88, 2004.

KABAT, GC; HEBERT JR; WYNDER, EL. Risk factors for oral cancer in women **Cancer Research**, vol. 49, p. 2803-2806, 1989.

KALBFLEISCH, S.G. **Probability and statistical inference**, New York, Springer-Verlag, vol. 1 e 2, 1979.

KARAHALIL, B. et al. Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. **Mutat Res.**, v. 412, p. 261-269, 1999.

KARAHALIL, B.; KARAYAKA AE, BURGAZ S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic hydrocarbons. **Mut. Res.**, vol. 442, p. 29-35, 1999.

KASSIE F, DARROUDI F, KUNDI M, SCHULTE-HERMANN R, KNASMULLER S. Khat (Catha edulis) consumption causes genotoxic effects in humans. **Int. J. Câncer**, vol. 92(3), p. 329-32, 2001.

KEHDY, F.S.G.; CERQUEIRA, E.M.M.; BONJARDIM, M.B.; CAMELO, R.M.; CASTRO, M.C.L.C. Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. **Genet. Mol. Res.** 6 (3): 581-593, 2007.

KELLER, A. Cirrhosis of the liver, alcoholism and heavy smoking associated with cancer of the mouth and pharynx. **Cancer** , v. 20, p. 1015, 1967.

KELLER, A. The epidemiology of lip, oral, and pharyngeal cancers, and the association with selected systemic diseases. **Am. J. Public. Health.**, v. 53, p. 12-4, 1963.

KEY, T.J.; ALLEN, N.E.; SPENCER, E.A.; TRAVIS, R.C. The effect of diet on risk of cancer. **Lancet**, vol. 360, p. 861–868, 2002.

KONOPACHA, M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. **Neoplasma**, v. 50, p. 380-382, 2003.

KUFFER, R.; LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncology** 38, 125–130, 2002

KULASEGARAM, R.; DOWNER, M.C.; JULLIEN, J.A.; ZAKRZEWSKA, J.M. Case-control study of oral dysplasia and risk habits among patients of a Dental Hospital. **Oral Oncol**: Vol. 31B, No. 4, 227-231, 1995.

KUROPKAT,C. et al. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. **Auris Nasus Larynx**: 29, 165-174, 2002

LA VECCHIA, C. ; TAVANI, A.; FRANCESCHI, S. ; LEVI, F.; CORRAO G.; NEGRI, E. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer **Oral Oncology**, vol. 33 (5), p. 302-312, 1997.

LA VECCHIA, C., LUCCHINI, F., NEGRI, E., & LEVI, F. Trends in oral cancer mortality in Europe. **Oral Oncol**, vol. 40, p. 433–439, 2004.

LAMBERT, B., BERNDTSON, I., HOLMBERG, K.; NORDENSKJÖLD, M. The most effect of smoking on the frequency of sister-chromatid exchange in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, vol. 113, p. 273-74, 1983.

LEAL-GARZA, C.H.; CERDA-FLORES, R.M.; LEAL-ELIZONDO, E.; CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. **Mutat. Res.**, vol. 515, p. 57–62, 2002.

LEE, C.H.; KO, Y.C.; HUANG, H.L.; CHAO, Y.Y.; TSAI, C.C. ; SHIEH, T.Y.; LIN, L.M. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan, Br. **J. Cancer**, vol. 10, p. 366–372, 2003.

LEE, J.J. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; 101:472-80, 2006

LEITE, I.C.G.; KOIFMAN, S. Revisão dos fatores de risco para o Câncer de boca e faringe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 44 (4), p. 12-16, 1998.

LLEWELLYN, C. D.; LINKLATER, K.; BELL, J.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncology**, vol. 39, p. 106–114, 2003.

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

LODI, G. et al. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**;100:164-78, 2005.

LONGNECKER, M. Alcohol consumption and the risk of cancer in humans: an overview, **Alcohol**, vol. 12, p. 87–96, 1995.

LOWE, S.W. et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse lymphocytes. **Nature**, v. 362, p. 847-849, 1993.

MACKENZIE, J.; AH-SEE, K.; THAKKER, N.; SLOAN, P.; MARAN, A.G.; BIRCH, J.; MACFARLANE, G. J. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? **Oral Oncology**, v.36, p.387-389, 2000.

MAFFEI, F. et al. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. **Mutagenesis**, v. 17, p. 405-409, 2002.

MAIER H, TISCH M. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. **Acta Otolaryngol Suppl**; 527:160-4; 1997.

MAO, E-J, SEATTLE, W. Prevalence of human papillomavirus 16 and nuclear organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelial. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.80, p. 320-9, 1995.

MARCONI, M. A.; LAKATO, E. M. **Fundamentos de Metodologia Científica**, 6ª edição, São Paulo, Atlas, 2005

Mc CABE, M.L.; DAMINI, Z The Molecular mechanisms of oesophageal cancer **Rev. International Immunopharmacology**, vol. 5, p. 1113-1130, 2005.

MEIRELES, J.R.C.; LOPES M.A., ALVES, N.N.; CERQUEIRA, E.M.M. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 52(4): 337 - 343, 2006.

MEIJ, E.H. van der; SCHEPMAN, K.P.; WAAL, I. van der. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; 96(2): 164-71, 2003.

MEIJ, E.H. van der; MAST, H.; WAAL, I. van der. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A prospective five-year follow-up study of 192 patients. **Oral Oncol.**, doi:10.1016/j.oraloncology.2006.09.006, 2006

MELO, M.C.B.; LORENZATO, F.R.B.; FILHO, J.E.C.; MELO, Z.M.; CARDOSO, S.O. A família e o processo de adoecer de câncer bucal. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 10, n. 3, p. 413-419, 2005

MIGNOGNA, M.D.; LO RUSSO, L.; FEDELE, S.; RUOPPO, E.; CALIFANO, L.; MUZIO, LO. Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. **Euro. Jour. Surg. Onc.**; 28: 838±843, 2002

MILLER, C. S., WHITE, D.K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.82, p. 57-68, 1996.

MILLER, C. S., ZEUSS, M. S. , WHITE, D.K. Detection of HPV in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.77, p. 480-6, 1994.

MILLER, M.L. et al. Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. **Micron**, v. 33, p. 157-166, 2002.

MINETA, H; OGINO, T. ; AMANO, H.M. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, vol. 18, p. 4765-4768, 1998.

MOLLAOGLU, N. Oral lichen planus: a review. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**: 38, 370–377, 2000

MOORE, S.R; JOHNSON, N.W.; PIERCE, A.M.; WILSON, D.F. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. **Oral Diseases**, vol. 6, p. 65-74, 2000.

MORENO-LÓPEZ, L.A.; ESPARZA-GÓMEZ, G.C.; GONZÁLEZ-NAVARRO, A.; CERERO-LAPIEDRA, R.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M.J.; DOMÍNGUEZ-ROJAS Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain **Oral Oncology**, v. 36, p. 170-174, 2000.

MORK, J.; LIE, K.; GLATTRE, E. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N. Engl. J. Med.**, vol. 344, p. 1125-1131, 2001.

MORSE, D.E. et al. Mouthwash Use and Dentures in Relation to Oral Epithelial Dysplasia. **Oral Oncology**: 33(5), 338-343, 1997

MURRAH, V. A., GILCHRIST, E. P., MOYER, M. P. Attenuation of natural course of herpes simplex virus infection in human oral epithelial cell cultures by smokeless tobacco extract suggests the possibility of a synergistic mechanism for carcinogenesis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 81, n. 1, p. 63-8, 1996.

MUZIO, L.L. et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer Letters**: 225, 27–33, 2005.

NAIR, U.; OBE, G.; NAIR, J. Evaluation of frequency of micronucleated oral mucosa cells as a marker for genotoxic damage in chewers of betel quid with or without tobacco. **Mutat.Res.**, vol. 261, p. 163-168, 1991.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 2ª. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004.

ODAGIRI, Y. ; UCHIDA, H. Influence of serum micronutrients on the incidence of kinetochore-positive or negative micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 415, p. 35-45, 1998.

OJI, C.; CHUKWUNEKE, F.N. Oral cancer in Enugu, Nigeria, 1998–2003. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**: 45; 298–301, 2007.

OLIVEIRA, J. A., FARIA, S. L. Câncer. São Paulo: Contexto, 63 p., 1997.

OLIVEIRA, L. R., RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol.42, no.5, p.385-392, 2006.

ORBAK, R.; BAYRAKTAR, C.; KAVRUT, F.; GU'NDOGDU, F. Poor oral hygiene and dental trauma as the precipitating factors of squamous cell carcinoma. CASE REPORT. **Oral Oncology EXTRA**: 41, 109–113, 2005.

ÖZKUL, Y.; DOMMEZ, H.; ERENMEMISOGLU, A.; DERMITAS, H.; IMAMOGLU, N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. **Mutagenesis**, vol. 12, p. 285-7, 1997.

- PEREIRA, M. G. **Epidemiologia – Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995
- PERUSSI, M. R.; DENARDIN, O. V. P.; FAVA, A. S.; RAPOPORT, A. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**; 48(4): 341-4, 2002
- PIATELLI, A. et al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 Immunoreactivity and of Apoptosis in Normal Oral Epithelium and in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity. **J Oral Maxillofac Surg** 60:532-540, 2002
- PINTO, D. et al. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. **Mutat Res.**, v. 467, p. 105-111, 2000.
- RAMIREZ, A. **Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais**. (Tese de Mestrado – Departamento de Biociências da USP). São Paulo, 2000.
- RAMÍREZ, A. ; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet Mol Res.**, v. 1, p. 246-260, 2002.
- RAO, D.N.; DESAI, P.B. Risk assessment of tobacco, alcohol and diet in cancers of base tongue and oral tongue--a case control study. **Indian J Cancer**; 35(2):65-72, 1998.
- RAUTAVA, J. et al. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. **Oral Oncology**: 43, 911– 919, 2007
- REIS, S.R. A., LIMA, C.R., MARCHIONNI, A. M. T.; SETUBAL, M.G. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe: Fumo, alcool e outros determinantes. **R.P.G.**, vol. 4 (2), 1997.
- REICHART, P.A.; PHILIPSEN, H.P. Oral erythroplakia—a review. **Oral Oncology**: 41, 551–561, 2005
- RODRIGUES, T. L. C.; COSTA, L. J. da; SAMPAIO, M. C. C.; RODRIGUES, F. G.; COSTA, A. de L. L. Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológica. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 4, p. 357-361, out./dez. 2000.
- ROMAN C., SEDANO, H . O . Multifocal papilloma virus epithelial hyperplasia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, vol. 77, p. 631-5, 1994.
- ROTHMAN K.; KELLER, R. The effect of joint exposure of alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. **Journal of Chronic Diseases**, vol. 25, p. 711–716, 1972.
- ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA-FILHO, N. de. **Introdução à Epidemiologia Moderna**, 2ª edição, Belo Horizonte/ Salvador/ Rio de Janeiro: COOPMED/ABRASCO, 1992
- ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA-FILHO, N. de **Epidemiologia e Saúde**. 6ª edição, Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

RYDZANICZ, M.; WIERZBICKA, M.; GAJECKA, M.; SZYFTER, W., SZYFTER, K. The impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MPT) of the head and neck. **Cancer Letters**, vol. 224, p. 263–278, 2005.

SALAMA, S. A.; SERRANA, M.; AU, W.W. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. **Mutat. Res.**, vol. 436, p. 99–112, 1999.

SALASPURO, M.P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol. 17 (4), p. 679–694, 2003.

SANKARNARAYANAN, R. Oral cancer in India an epidemiological and clinical review. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Path.**, vol. 69, p. 280-286, 1990.

SANTOS, NNA. **Danos citogenéticos e citológicos em indivíduos sobre diferentes formas de exposição a mutágenos, avaliados pelo Teste de Micronúcleo.** (Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP) - São Paulo, 2003.

SARAN, R.; TIWARI, R.K.; REDDY, P.P.; AHUJA, Y.R. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. **Oral Oncology** (article in press), doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.002, 2007

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-17, 1987.

SARTO, F. et. al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-7, 1987.

SCHANTZ, S.P.; ZHANG, Z.-F.; SPITZ, M.S.; SUN, M.; HSU, T.C. Genetic Susceptibility to Head and Neck Cancer: Interaction Between Nutrition and Mutagen Sensitivity. **Laryngoscope**, vol. 107, p. 765-781, 1997.

SCHEPMAN, K.P.; VAN DER MEIJ, E.H.; SMEELE, L.E.; VAN DER WAAL, I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherland. **Oral Oncology**: 34, 270-275, 1998

SCHILD, E.B.; ERIKSSON, M.; HARDELL, L.; MAGNUSON, A. Oral infections and dental factors in relation to oral cancer: a Swedish case-control study. **Eur J Cancer Prev**, vol. 7, p. 201-206, 1998.

SCHOELCH, M.L. et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**: 35, 77±85, 1999

SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis, **Mutat Res.**, v. 464, p. 13-18, 2000.

SCULLY C.; CAWSON, R.C. Potentially malignant lesions. **J Epidemiol Biostat** 1996;1:3-12.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncol**;38:227–34, 2002

SCULLY, C.; SUDBO, J.; SPEIGHT, P.M. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. **J Oral Pathol Med**; 32(5):251–256, 2003.

SHIU, M.N.; CHEN, T.H. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. **Eur J Cancer Prev**;13(1):39–45, 2004.

SEITZ, H.K.; POSCHL, G. ; SIMANOWSKI, U.A. Alcohol and cancer, **Recent Dev. Alcohol**, vol. 14, p. 67–95, 1998.

SHANKS, T.G.; BURNS, D.M. Disease consequences of cigar smoking and tobacco control monograph 9. Cigars health effects and trends. Bethesda, MD: **National Cancer Institute**, p. 105-158, 1998.

SHAW, P. et al. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. **Proc Natl Acad Sci (USA)**., v. 89, p. 4495-4499, 1992.

SILVA JUNIOR JB, GOMES FBC, CEZÁRIO AC, MOURA L. Doenças não transmissíveis: bases epidemiológicas. In: Rouquayrol MZ, Almeida Filho N. **Epidemiologia e saúde**. 6a ed. São Paulo: Medsi; 2003.

SILVERMAN, S. Jr.; SHILLITOE, E.J. Etiology and predisposing factors. In: SILVERMAN, S. Jr. **Oral Cancer**, 3^a ed United States of America: American Cancer Society, p. 7-39, 1990.

SIRIWARDENA, B.S.M.S.; TILAKARATNE, A.; AMARATUNGA, E.A.P.D.; TILAKARATNE, W.M. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. **Oral Oncology**: 42, 831– 836, 2006

STICH, H. F, CURTIS, J. R., PARIDA, B. B. Application of the micronucleos test to exfoliated cells of a high cancer risk group: Tobacco chewers. **Int. J. Cancer**, vol. 30, p. 553-9, 1982.

STICH, H. F, ROSIN, M. P. Quantitating the Synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. **Int. J. Cancer**, vol. 31, p. 305-8, 1983.

STICH, H.F.; PARIDA, B.B. BRUNNEMANN, K.D. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of “reverse” smokers, khaini-tobacco chewers and gudakhu users. **Int. J. Cancer**, vol. 50, p. 172-6, 1992.

SUHAS, S. et al. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutat Res.**, v. 561, p. 15-21, 2004.

SUNILA, T.; ANITA, B. Oral cancers- a two-year survey, **J. Indian Acad. Oral Med. Radiol**, vol. 15 (1), p. 3-9, 2003.

- SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer **Journal of Clinical Virology**, vol. 32, p. 59-66, 2005.
- TESTA, A. et al. Cytogenetic biomonitoring of workers from laboratories of clinical analyses occupationally exposed to chemicals. **Mutat Res.**, v. 520, p. 73-82, 2002.
- THIERENS, H., VRAL, A. AND RIDDER DE, L. Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. **Health Phys.** Vol. 61, p. 623-630, 1991.
- THOMSON, P.J.; HAMADAH, O. Cancerisation within the oral cavity: The use of 'field mapping biopsies' in clinical management. **Oral Oncology**: 43, 20–26, 2007
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.**, 134: 840-50, 1991.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, vol. 271, p. 69-77, 1992.
- TOMANIN, R.; BALLARIN, C.; NARDINI, B.; MASTRANGELO, G.; SARTO, F. Influence of smokin habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. **Mutagenesis**, vol. 6, p. 123-6, 1991.
- TOPORCOV, T. N.; ANTUNES, J.L.F.; TAVARES, M.R. Fat food habitual intake and risk of oral cancer **Oral Oncology**, vol. 40, p. 925-931, 2004.
- TRIEGER N., TAYLOR, G.W. Cirrhosis and other predisposing factors in carcinoma of the tongue. **Cancer**, vol. 11, p. 357, 1958.
- VELLY, A. M., FRANCO, E.L.; SCHLECHT, N.; PINTOS, J.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V. et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncology**, vol. 34, p.284-291, 1998.
- WAGNER, A.J.; KOKONTIS, J.M.; HAY, N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21^{waf1/cip1}. **Genes and Dev.**, v. 8, p. 2617-2630, 1994.
- WARD, K. A. , NAPIER, S. S. , WINTER, P. C., MAW, R. D., DINSMORE, W. W. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, vol. 80, p. 80-63, 1995.
- WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence **Oral Oncology**, vol. 41, p. 244-260, 2005.

WINN DM, BLOT WJ, SHY CM, PICKLE LW, TOEDO A, FRAUMENI, JF. Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. **New England Journal of Medicine.**, vol. 304, p. 745-749, 1981.

WINN DM, DIEHL SR, BROWN LM, HARTY LC, BRAVO-OTERO E, FRAUMENI JF JR, KLEINMAN DV, HAYES RB Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. **Cancer Causes Control.**, vol. 12(5), p. 419-29, 2001.

WINN, D. M., BLOT, W. J., Mc LAUGHLIN, J.K., AUSTIN, D. F., GREEBERG, R. S., PRESTON-MARTIN, S., FRAUMENI Jr., J.F. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res.**, vol. 51(11), p. 3044-47, 1991.

WONG, Y.-K. et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. **Oral Oncology**: 42, 893– 906, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Collaborating Center for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesion: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**;46:518±39, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer. World cancer report.** In: STEWART BW, KLEIHUES P, editors. Oxford: Oxford University Press, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer. Fact sheet n ° 297.** Feb 2006. [on-line]. Geneva: World Health Organization; 2007 [citado em 2007-10-10]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>

WOUTERSEN, R.A.; APPEL, M.J.; VAN GARDEREN-HOETMER, A.; WIJNANDS, M.V.W. Dietary fat and carcinogenesis **Mutat Res**, vol. 443, p. 111–27, 1999.

WU, P.-A.; LOH, C.-H.; HSIEH, L.-L.; LIU, T.-Y.; CHEN, C.-J.; LIOU, S.-H. Clastogenic effect for cigarette smoking, but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells **Mutat. Res.**, vol. 562, p. 27–38, 2004.

WÜNSCH FILHO, V.; GATTÁS, G. J. F.; Biomarcadores moleculares em câncer: Implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 17(3) p.467-480, 2001.

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

WYNDER E. L., BROSS I.J., FELDMAN, R.M. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. **Cancer**, vol. 10, p. 1300, 1957.

WYNDER E. L.; KABAT, G.; ROSENBERG, S.; LEVENSTEIN, M. Oral cancer and mouthwash use. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 70(2), p. 255-260, 1983.

YONISH-ROUACH, E. et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. **Nature**, v. 353, p. 345-347, 1991.

XUE, K., WANG, S., MA, G., ZHOU, P., WU, P-Q., ZHANG, R., XU, Z., CHEN, W-S, WANG, Y-Q. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea drinking habits. **Int. J. Cancer**, vol. 50, p. 702-705, 1992.

ZAIN, R.B. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer- a brief overview **Oral Oncology**, vol. 37, p. 205-210, 2001.

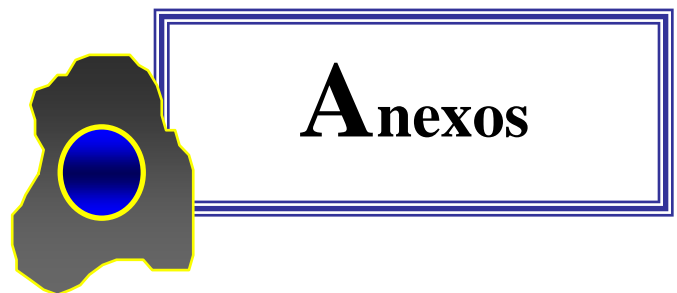
ZAKERI, F. ; ASSAEI, R.G. Cytogenetic monitoring of personnel working in angiocardiology laboratories in Iran hospitals. **Mutat Res.**, v. 562, p. 1-9, 2004.

ZAVRAS, A. I.; DOUGLASS, C. W.; JOSHIPURA, K.; LASKARIS, G.; PETRIDOU, E.; DOKIANAKIS, G.; SEGAS, J.; LEFANTZIS, D.; NOMIKOS, P.; WANG, Y.F.; DIEHL, S.R. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece **Oral Oncology**, vol.37, p.28-35, 2001.

ZHANG, Z.-F.; SHU, X.-M.; CORDON-CARDO, C.; ORLOW, I.; LU, M.-L.; MILLON, T.V.; CAO, P.-Q. ; CONNOLLY-JENKS, C. ; DALBAGNI, G. ; LIANES, P. ; LACOMBE, L.; REUTER, V.E.; SCHER, H.H. Cigarette smoking and chromosome 9 alterations in bladder cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, vol. 6, p. 321–326, 1997.

ZHENG, T.; BOYLE, P.; WILLET, W.; HU, H.; DAN, J.; EVSTIFEEVA, T.V.; NIU, S.; MACMAHON, B. A case control study of oral cancer in Beijing, Peoples's Republic of China. Associations with nutrients intakes, foods and food groups. **Oral Oncol Eur J. Cancer**, vol. 29, p. 45-55, 1993.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology**, vol. 184, p. 9-13, 1991.



ANEXO 1: FORMULÁRIO PARA ENTREVISTA**DADOS GERAIS**

01. QUESTIONÁRIO N.º _____		03. DATA ____/____/____	
02. PRONTUÁRIO N.º _____			
04. LOCAL <input type="checkbox"/> 1- HAM 2- CRLB 3- Clinica Dentística		05. MUNICÍPIO <input type="checkbox"/> 1. Feira de Santana 2. Salvador	

IDENTIFICAÇÃO

06. NOME		07. DATA DE NASCIMENTO ____/____/____	
08. NOME DA MÃE		09. NATURALIDADE	
10. IDADE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos	11. SEXO <input type="checkbox"/> 1. Masculino 2. Feminino	12. ESTADO CIVIL <input type="checkbox"/> 1- Solteiro 2- Casado 3- Viúvo 4- Outros	
13. RAÇA <input type="checkbox"/> 1- Branco 2- Mulato claro 3- Mulato médio 4- Mulato escuro 5- Preto			
14. GRAU DE INSTRUÇÃO <input type="checkbox"/> 1- Analfabeto 2- 1º Grau Incomp. 3- 1º Grau Comp. 4- 2º Grau Incomp. 5- 2º Grau Comp. 6- 3º Grau Incomp. 7- 3º Grau Comp. 8- Ignorado			
15. ENDEREÇO (Rua, Av.)		16. N.º	17. APTO
18. BAIRRO	19. CIDADE	20. ESTADO	21. CEP □□□□□-□□□□

22. TELEFONE		23. ZONA <input type="checkbox"/> 1. Urbana 2. Rural	
24. OCUPAÇÃO ATUAL	25. TEMPO DE ATIVIDADE	26. OCUPAÇÃO ANTERIOR	

ANTECEDENTES FAMILIARES

27. CÂNCER NA FAMÍLIA <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não	28. LOCALIZAÇÃO TOPOGRÁFICA <input type="checkbox"/> 1. Boca 4. Próstata 2. Colo uterino 5. Pele 3. Mama 6. Outros 7. Não se aplica
--	--

ANTECEDENTES PESSOAIS

29. PACIENTE TRANSPLANTADO RENAL <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não	30. HISTÓRIA DE HPV <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não
31. HIGIENE BUCAL <input type="checkbox"/> 1. Péssima 3. Boa 2. Regular 4. Ótima	32. CONDIÇÃO DENTAL <input type="checkbox"/> 1. Dentes Fraturados/ arestas cortantes 2. Restaurações mal adaptadas 3. Não se aplica
33. USO DE PRÓTESE <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não	34. TIPO DE PRÓTESE <input type="checkbox"/> 1. Parcial Removível 2. Total 3. Fixa 4. Não se aplica

HÁBITOS DE FUMAR

<p>35. HÁBITOS TABAGISTAS</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Não</p>	<p>36. QUANTO TEMPO</p> <p>1. <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> anos</p> <p>2. <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> meses</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>37. TIPO DE CIGARRO</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Cigarro de palha 4. Charutos</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Cigarro Industrial 5. Outros</p> <p><input type="checkbox"/> 3. Cachimbo 6. Não se aplica</p>
<p>38. QUANTIDADE DE CIGARRO/DIA</p> <p><input type="checkbox"/> 1. De 01 a 05 5. De 21 a 30</p> <p><input type="checkbox"/> 2. De 06 a 10 6. Mais de 30</p> <p><input type="checkbox"/> 3. De 11 a 15 7. Não se aplica</p> <p><input type="checkbox"/> 4. De 16 a 20</p>		<p>39. TRAGA CIGARRO</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Não</p>
<p>41. JÁ FUMOU</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Não</p>		<p>42. HÁ QUANTO TEMPO DEIXOU DE FUMAR</p> <p>1. <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> anos</p> <p>2. <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> meses</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>
<p>43. QUANTOS CIGARROS FUMAVA</p> <p><input type="checkbox"/> 1. De 01 a 05 4. De 16 a 20</p> <p><input type="checkbox"/> 2. De 06 a 10 5. De 21 a 30</p> <p><input type="checkbox"/> 3. De 11 a 15 6. Mais de 30</p> <p><input type="checkbox"/> 7. Não se aplica</p>		<p>44. POR QUANTO TEMPO FUMOU</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Menos de 6 meses 4. 5 a 10 anos</p> <p><input type="checkbox"/> 2. 6 meses a 1 ano 5. Mais de 10 anos</p> <p><input type="checkbox"/> 3. 1 a 5 anos 6. Não sabe</p> <p><input type="checkbox"/> 7. Não se aplica</p>

HÁBITOS DE TOMAR CAFÉ

<p>45. CONSUMO DE CAFÉ</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não</p>	<p>46. QUANTAS XÍCARAS OU COPINHOS POR DIA</p> <p>1. _____</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Não sabe 3. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>
<p>47. HÁ QUANTOS ANOS TOMA CAFÉ</p> <p>1. _____</p>	<p>48. INFORMAÇÕES ADICIONAIS</p>

EXAMES LABORATORIAIS**73. ANÁLISE DE MICRONÚCLEO**

Número total de células analisadas _____

Número de células com micronúcleos _____

Frequência de células com micronúcleo _____

Frequência de micronúcleos por célula _____

Data da biópsia _____

74. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA
