

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

LUCIANA MARIA FELICIANO

**ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PORTADORES DE DESORDENS
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA ORAL**

**BOTUCATU – SP
2011**

LUCIANA MARIA FELICIANO

**ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PORTADORES DE DESORDENS
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu Universidade Estadual Paulista - UNESP – para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daisy Maria Favero Salvadori

Co-orientadora: Dr^a Eliana Maria Minicucci

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Feliciano, Luciana Maria.

Alterações citogenéticas em portadores de desordens potencialmente malignas e carcinoma oral / Luciana Maria Feliciano. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Co-orientador: Eliana Maria Minicucci

1. Boca – Câncer. 2. Leucoplasia bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal; Desordens potencialmente malignas, Leucoplasia; Líquen plano; Micronúcleo.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é uma dívida emocional impagável. A sincera gratidão é respeito e consideração, que reforça laços que se eternizam... laços de amizade! É impagável, porque, afinal... Amor não é dinheiro!

Agradeço aos acontecimentos, aos momentos inesquecíveis, as coisas inexplicáveis e todas as pessoas incomparáveis que cruzam meu caminho, as quais geraram em mim um sentimento muito bom, de admiração. Sinto gratidão por todas as pessoas que confiam a mim o seu melhor, sua humanidade, seu amor, seu respeito. Sinto por essas pessoas um imenso e sincero amor, o qual chamo de amizade. Sinto-me em falta com essas pessoas quando não consigo expressar todo esse meu sentimento de amor e consideração...é uma questão de prática, ainda estou me aprimorando.

Muitas são as pessoas que me foram fundamentais na realização deste trabalho, tenho aqui que relatar também que nem só diretamente essas pessoas me ajudaram, mas sem dúvidas foram fundamentais:

- *Primeiramente a Deus pela minha vida, e a coragem que me dá para vivê-la intensamente!*
- *Seguramente, sou grata a minha família e tudo que ela me traz;*
- *Aos meus pais: minha mãe Maria José S. Feliciano e meu pai Francisco Feliciano Netto (por toda dedicação, amor e paciência);*
- *Aos meus irmãos Luís Claudio Feliciano e sua esposa Elaine Soraia G. Feliciano – uma irmã para mim;*
- *Aos meus amados sobrinhos Luís Fernando G. Feliciano e Ana Laura G. Feliciano pelas alegrias e o amor recíproco;*
- *Aos meus tantos amigos pelas alegrias, parcerias, apoio, compreensão, pelos ótimos momentos e pelos não tão bons, especialmente aos que estiveram mais próximos nesse período da minha vida: Gabriela Dorth, Lucas Cardoso dos Santos, Thaís R. Carboni, Sara Fernandes e Elen Paulino;*

- *À minha orientadora, professora Daisy Maria Fávero Salvadori, adorei ter te conhecido!! Por todo o aprendizado que me concedeu, pela oportunidade, pelo carinho e amizade;*
- *À minha co-orientadora Eliana Maria Minicucci pela contribuição no desenvolvimento do projeto e coleta das amostras;*
- *Aos meus colegas e amigos do laboratório OMICS: Bruno, João Paulo, Elaine, Glenda, Danielle, Mariana, Juliana, Camila, Cristiana, Vanessa, Renato, Juliana e Mara.*
- *À CAPS pela concessão da bolsa de estudos*

SUMÁRIO

Listas de figuras i

Listas de tabelas ii

Listas de anexos iii

RESUMO

I. INTRODUÇÃO	7
I.1 Considerações iniciais	7
I.2 Desordens potencialmente malignas	9
I.3 Câncer de boca	10
I.4 Micronúcleos e outras anormalidades	12
I.5 Avaliação de alterações citogenéticas em esfoliado de células epiteliais	15
II. OBJETIVOS	17
III. MATERIAL E MÉTODOS	18
III.1 Casuística	18
III.2 Coleta e processamento das células da mucosa oral	20
III.3 Análise citogenética	20
III.4 Análise estatística	25
IV. RESULTADOS	26
V. CONCLUSÃO	31
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

Lista de figuras i

Figura 1. Epitélio escamoso estratificado queratinizado (a) e não queratinizado (a e b)	8
Figura 2. Representação esquemática das principais alterações avaliadas em células esfoliadas da mucosa bucal nos testes de mutagenicidade e citotoxicidade	14
Figura 3. Fotografia de leucoplasia oral	22
Figura 4. Fotografia de líquen plano oral.....	23
Figura 5. Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa oral	24

Lista de tabelas ii

Tabela 1. Características da população do estudo	19
Tabela 2. Frequência (‰) de células micronucleadas e com brotos nucleares em pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer bucal	27
Tabela 3. Proporção de células basais e diferenciadas (%) e frequência (‰) de células com alterações nucleares na mucosa bucal de pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer oral	29
Tabela 4. Resumo dos resultados do estudo	30

Lista de anexos iii

Anexo 1. Questionário	45
Anexo 2. Características individuais da população	47
Anexo 3. Dados individuais brutos da análise	50

RESUMO

A cavidade oral está constantemente exposta a traumas físicos, químicos e biológicos que fazem com que os tecidos respondam sob várias formas de manifestações clínicas. As lesões mais comuns são as traumáticas, as fúngicas, as virais, as bacterianas e as consideradas de etiologia multifatorial, como o câncer, as úlceras aftosas recorrentes, o líquen plano e as leucoplasias, sendo as duas últimas classificadas como desordens potencialmente malignas (DPM). As DPM e o câncer de boca apresentam alta incidência na população brasileira, e o diagnóstico geralmente se dá em fase tardia. A análise de alterações citogenéticas, incluindo a frequência de micronúcleo (MN) em células esfoliadas do tecido epitelial, tem sido utilizada como um “dosímetro endógeno” precoce para sítios que são alvos específicos de agentes genotóxicos e cancerígenos. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a frequência células basais e diferenciadas, bem como de marcadores de alterações genéticas (micronúcleos, brotos nucleares), de citotoxicidade e desregulação no ciclo celular (células binucleadas, cariólise, cariorréxe e núcleos com cromatina condensada) em células esfoliadas da mucosa oral de pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer da cavidade bucal. Foram avaliados 68 indivíduos na faixa etária entre 24 e 82 anos, dos quais 10 portadores de leucoplasia oral, 16 de líquen plano e 15 de câncer bucal. O grupo controle foi constituído de 27 indivíduos sem lesões orais, pareados por sexo e idade. Os resultados mostraram aumento significativo de alterações citogenéticas, não restritas à área da lesão, na mucosa oral dos portadores de leucoplasia, líquen plano e câncer. Esses achados confirmam a influência genética na etiologia e desenvolvimento dessas doenças, ao mesmo tempo em que sugerem que os mecanismos de citotoxicidade e mutagenicidade associados às leucoplasias, líquen plano e câncer bucal não estão relacionados, apenas, ao processo fisiopatológico da lesão. Além disso, os resultados sugerem a possibilidade de que essas lesões partilhem eventos comuns de gênese e desenvolvimento.

Palavras-chave: Câncer bucal, desordens potencialmente malignas, leucoplasia, líquen plano, micronúcleo.

I. INTRODUÇÃO

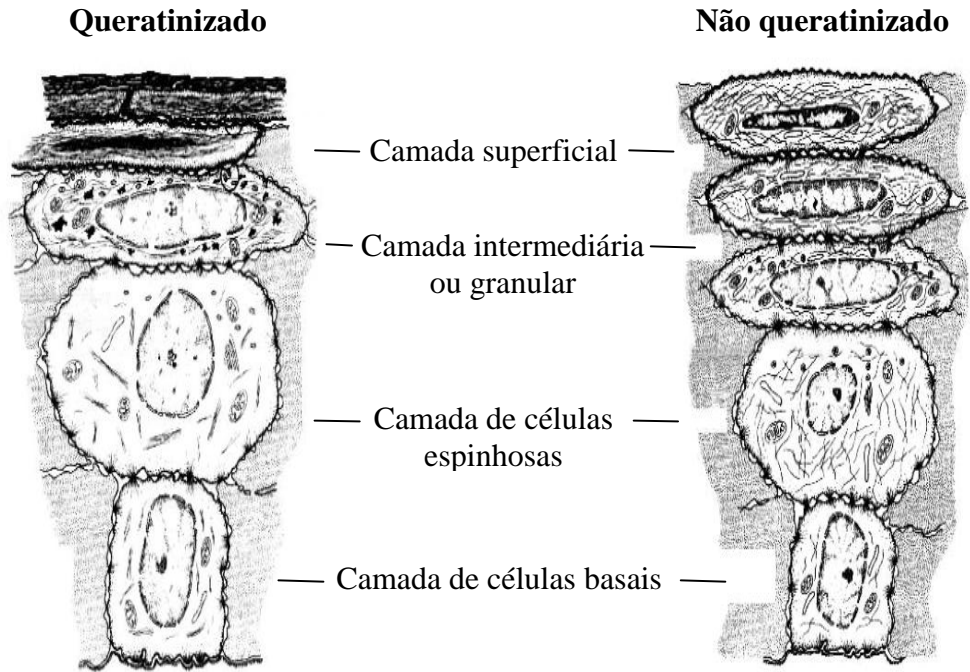
I.1 Considerações iniciais

A mucosa oral está constantemente exposta a traumas físicos, químicos e biológicos, que fazem com que os tecidos respondam por meio de diferentes manifestações clínicas. As lesões mais comuns da mucosa oral são as de origem traumática, fúngica, viral, bacteriana e as consideradas de etiologia multifatorial, como, por exemplo, as úlceras aftosas recorrentes, as lesões cancerosas, o líquen plano e a leucoplasia, sendo as duas últimas classificadas como desordens potencialmente malignas (DPM) (Esmeili et al., 2005; Warnakulasuriya et al. 2007; Figueiral et al., 2007; Mell, 2008; Scully & Porter, 2008).

A cavidade oral é composta por mucosa jugal, assoalho bucal, gengivas, palato e língua. A mucosa que a reveste é constituída por epitélio do tipo escamoso estratificado formado pelas camadas basal, espinhosa, granular ou intermediária e superficial, que pode ou não ser queratinizada (Figura 1). O epitélio escamoso se mantém por um sistema de renovação celular contínuo, no qual as novas células da camada basal migram para a superfície para substituir aquelas que são esfoliadas (Ten Cate et al., 1998; Celik et al., 2003). O tempo requerido para a divisão, maturação e migração da célula para a camada superficial varia de acordo com o tipo de tecido, sendo que as células da mucosa oral, que se renovam a cada 7–14 dias, levam aproximadamente três semanas para atingir a superfície (Tolbert et al., 1992). No entanto, essa dinâmica de renovação celular pode ser afetada por irritações físicas, químicas, ou ainda, por agentes infecciosos (Rossin, 1992).

Por vezes, a cavidade oral é descrita como um espelho que reflete a saúde, uma vez que as alterações observadas podem ser indicativas de doenças sistêmicas como diabetes, deficiências vitamínicas, efeitos do consumo crônico de tabaco e/ou álcool, ou, ainda, de efeitos de medicamentos que limitam a capacidade proliferativa dos epitélios, tornando a mucosa fina e/ou ulcerada. Indiretamente, as drogas antineoplásicas, por exemplo, podem afetar as glândulas salivares, reduzindo a produção de saliva e prejudicando a eficiência da barreira imunoprotetora da mucosa, aumentando, assim, o risco de infecções locais (Squier & Kremer, 2001).

(a)



(b)

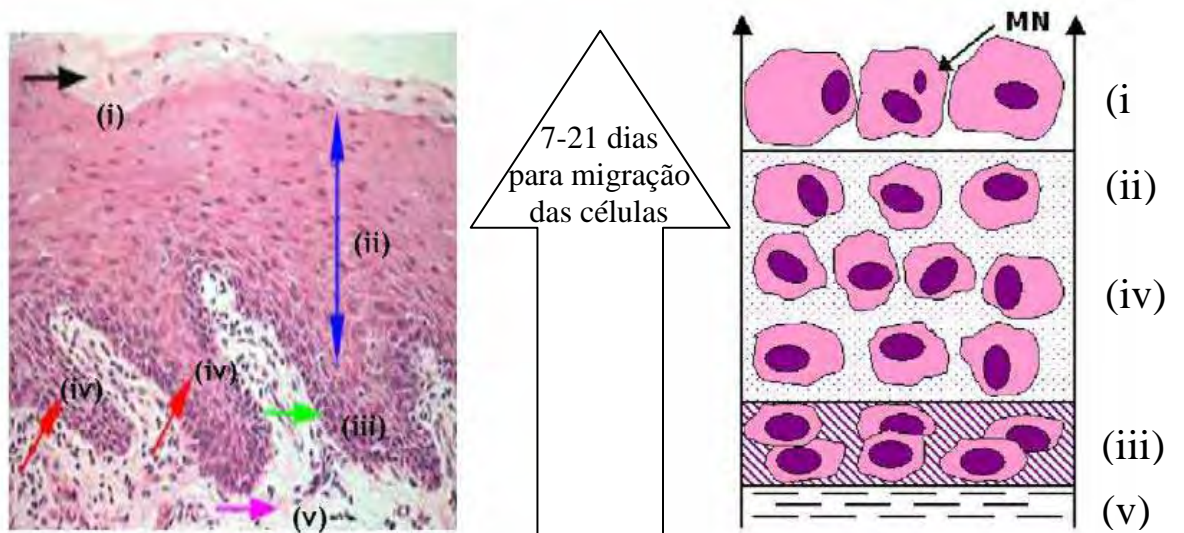


Figura 1. Epitélio escamoso estratificado queratinizado (a) e não queratinizado (a e b). (i) Camada superficial; (ii) camada intermediária; (iii) camada basal; (iv) camada de células espinhosas; (v) lâmina própria. (a) Esquema adaptado de Squier & Kremer (2001); (b) esquema adaptado de Holland et al.(2008).

As células da mucosa oral têm capacidade metabolizadora e, por se tratar da primeira barreira contra substâncias tóxicas e mutagênicas, ingeridas ou inaladas, são consideradas sistemas importantes para a avaliação de danos no DNA.

A análise toxicogenética utilizando células epiteliais esfoliadas da mucosa oral confere diversas vantagens, pois, além de ser alvo primário de exposição, a obtenção minimamente invasiva possibilita o monitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos e permite fazer associações entre o estilo de vida e os danos encontrados nesse epitélio (Holland et al. 2008).

As células epiteliais esfoliadas tem sido utilizadas há mais de duas décadas para a avaliação de danos nas cavidades oral e nasal, brônquios, esôfago, cérvix, bexiga e trato urinário (Stich & Rossin, 1983), devido à sua eficiência para a detecção de alterações citogenéticas, diagnósticos de condições com potencial de malignização e em pesquisas genômicas que podem preceder, predispor, ou até promover o desenvolvimento tumoral.

I.2. Desordens Potencialmente Malignas (DPM)

Desordem Potencialmente Maligna é o termo recomendado para denominar um grupo de lesões que apresentam alterações morfológicas e que podem ter potencial para a transformação maligna (Warnakulasuriya et al. 2007). São consideradas DPM a leucoplasia, a leucoplasia verrucosa proliferativa, a eritroplasia, a queilite actínica, a fibrose submucosa, o líquen plano e a atrofia por deficiência de ferro (Van Der Vaal, 2009).

A leucoplasia consiste em uma placa branca de risco questionável e etiologia desconhecida, mas que está principalmente relacionada ao tabagismo e ao consumo de álcool, sendo até seis vezes mais frequente entre fumantes (Dietrich et al., 2004; Maserejian et al., 2006). A leucoplasia oral faz parte de um grupo de lesões heterogêneas, das quais 5% a 15% são classificadas histopatologicamente como displasias (Suarez et al., 1998; Pindborg et al., 1997; Subdo & Reith, 2005; Warnakulasuriya et al (2007). Na literatura, há controvérsias em relação à incidência das leucoplasias que se convertem em carcinoma espinocelular, para a qual o índice de

malignização varia de 1,4% a 36%, em um período de 1 a 30 anos (Silverman et al., 1984; Lee et al., 2000; Warnakulasuriya, 2000; Saito et al., 2001, Kurokawa et al., 2002, Carinci et al., 2005).

Em 2003, a OMS classificou a displasia epitelial oral como leve, moderada, severa e carcinoma *in situ*, de acordo com a presença e severidade da atipia celular e da espessura da camada displásica, quando comparada à espessura total do epitélio normal. As displasias leves estão limitadas principalmente às camadas basal e parabasal, enquanto as moderadas afetam desde a camada basal até a porção média da camada espinhosa e as severas apresentam alterações desde a camada basal até um nível acima da porção média do epitélio (Barnes et al., 2005). O acúmulo de evidências tem demonstrado que a displasia epitelial é um provável marcador biológico de malignidade, uma vez que o risco de malignização das displasias moderadas ou severas é significativamente maior que o da displasia leve ou hiperplasia (Subdo et al., 2001; Subdo & Reith, 2005; Carinci et al., 2005).

O marcador tradicional de prognóstico da displasia epitelial é o seu tipo e o grau histológico (Warnakulasuriya, 2000, 2001). Entretanto, é sabido que lesões não displásicas também podem se transformar em câncer, e que nem todas as displasias tornam-se malignas, uma vez que sua regressão espontânea tem sido relacionada a mudanças de hábitos e estilo de vida (Sankaranarayanan, 1997; Reibel, 2003).

O líquen plano, por sua vez, é uma doença imunológica mucocutânea, caracterizada pela inflamação crônica da mucosa, de etiologia desconhecida, mas que parece estar relacionada a interações entre fatores genéticos, ambientais e individuais (Scully et al, 1998). Histologicamente, o líquen plano é caracterizado por infiltrado linfocitário na camada epitelial e lise das células da camada basal (Chainani-Wu et al, 2001; Bruno et al, 2002); clinicamente, apresenta-se de forma reticular, atrófica, bolhosa e erosiva (Edwards & Kelsch, 2002).

Alguns autores consideram as inflamações crônicas do epitélio como risco potencial para a malignização do líquen plano, embora essa capacidade seja ainda muito discutida (Valente et al, 2001, Kim et al 2001, Mignogna et al, 2001, Bromwich, 2002, Mignogna et al, 2002). Há pesquisadores que relatam a probabilidade de 0,2% para a transformação do líquen plano em carcinoma espinho-celular (CEC) (Sugerman & Savage, 2002), enquanto outros acreditam que somente as lesões liquenóides com

displasia epitelial são de alto risco para progressão em carcinoma oral (Zhang et al, 1997, 2000; Edwards & Kelsch, 2002). Recentemente, Gonzalez-Moles et al. (2008) concluíram que o potencial maligno do líquen plano permanece indefinido e ressaltaram a dificuldade em se diferenciar a malignização induzida pelo uso crônico de substâncias cancerígenas daquelas secundárias ao líquen plano.

I.3. Câncer de boca

O câncer de boca é o mais comum dentre os tumores de cabeça e pescoço, correspondendo a 40% dos casos (Jacobs et al., 1987, Lippman & Hong, 2001, Canevari & Rogatto, 2004), dentre os quais, o carcinoma espinocelular (CEC) representa de 90% a 95%, sendo o tipo histológico mais freqüente (Carvalho, 2001; Didevitis, 2004). No Brasil, a estimativa de câncer oral para 2011 é de 14.120 casos novos, sendo 10.330 em homens e 3790 em mulheres (INCA, 2009). Mundialmente, mais de 300.000 novos casos de carcinoma espinocelular são diagnosticados anualmente (Mork, 1998; Greenlee et al., 2000).

Os CEC apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com prognóstico que não se modificou nas últimas quatro décadas (Mork, 1998; Greenlee et al., 2000), devido, entre outros fatores, ao estágio clínico avançado no momento do diagnóstico (Vokes et al., 1993) e, conseqüentemente, tratamentos cada vez mais agressivos.

Os principais fatores associados ao risco para o desenvolvimento do câncer de boca são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas, principalmente aquelas de alto teor alcoólico (Hahn et al., 2002; Maserejian et al., 2006; INCA 2007), com um efeito sinérgico entre ambos e uma relação diretamente proporcional à quantidade e tempo de exposição (Lazarus & Park, 2000).

O álcool age como solvente que facilita a penetração de compostos cancerígenos ambientais na mucosa, assim como o alcoolismo crônico pode levar a atrofia do parênquima das glândulas parótidas e submandibulares, resultando no comprometimento funcional do fluxo e viscosidade da saliva e, com isso, expondo a superfície da mucosa a maiores concentrações de carcinógenos (Maier et al., 1986).

O tabaco, em suas diversas formas, além de importante fator de risco para o câncer bucal, é também responsável pelo surgimento de outras lesões na mucosa oral (Winn, 2001). Já está bem estabelecido que dentre os muitos carcinógenos presentes na fumaça do cigarro, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, as aminas aromáticas e as nitrosaminas são os mais ativos.

Inclui-se, ainda, entre os fatores de risco para o câncer de boca, dietas pobres em frutas e vegetais, alguns vírus, como o HPV e o da herpes simples, irritação mecânica crônica (ação de bordas cortantes dos dentes sobre a mucosa bucal e o uso de próteses mal-adaptadas), radiação solar (no caso de câncer labial), herança genética (Copper et al., 1995; Foulkes et al., 1996; Brown et al., 2001), fatores ocupacionais (asbesto e níquel) e má higiene bucal, que podem, também, propiciar alterações epiteliais que tornam a mucosa bucal mais vulnerável aos processos carcinogênicos (Thuler & Rebelo, 1999; Lissowska et al., 2003; Kozamara et al., 2005; Rosenquist et al., 2005; INCA 2007; Taghavi & Yazdi, 2007; Tsantoulis et al., 2007). A distribuição dos fatores de riscos varia consideravelmente entre as populações (Lazarus & Park, 2000), pois fatores genéticos desempenham papel importante no desenvolvimento de doenças bucais, influenciando o metabolismo de carcinógenos e a frequência de mutações responsáveis pela iniciação da carcinogênese (Spitz et al., 1999).

I.4. Micronúcleos e outras anormalidades nucleares (Figura 2)

Os micronúcleos (MNs) foram considerados marcadores de instabilidade genômica pela primeira vez por Boller e Schmid, em 1970. São definidos como corpúsculos de cromatina (fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros) envolvidos por membrana nuclear e que não foram incluídos no núcleo principal das células-filhas durante a divisão celular. Com isso, os MNs somente são visualizados em células que sofreram danos cromossômicos e que completaram pelo menos um ciclo de divisão (Schmid, 1975; Tolbert et al., 1992). Os MNs ficam localizados próximos ao núcleo principal, são morfológicamente indistinguíveis deste, sendo apenas identificados por seu tamanho menor (Fenech et al., 1997; Fenech et al., 1999), e se manifestam durante a anáfase, por defeitos no aparelho mitótico ou devido à presença de fragmentos cromossômicos acêntricos originados, por exemplo, pela ação de

substâncias mutagênicas (Heddle et al., 1991; Fenech et al.,1999). No caso de MNs formados por cromossomos inteiros, a hipometilação em sequências repetidas do DNA pericentromérico e centromérico (Fenech, 2005; Fenech 2006), cromossomos dicêntricos, defeitos no cinetocóro, defeitos no fuso e erros nos genes de *check points* na anáfase, podem ser os eventos responsáveis (Fenech et al., 2011).

Outra anormalidade nuclear que também é considerada um marcador de instabilidade genômica é o broto nuclear, cujo mecanismo de formação ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que represente amplificação gênica ou falha no sistema de reparo de DNA (Shimizu et al.,1998; Fenech et al.,2002). O broto nuclear é visualizado na periferia do núcleo e se originaria via recombinação entre regiões homólogas com sequências amplificadas, formando miniciclos de DNA acêntricos e ateloméricos ou, ainda, por excisão de sequências amplificadas após a segregação para regiões distintas no núcleo (Fenech, 2005). Tais fenômenos sugerem a capacidade nuclear de detectar excesso de DNA e desencadear processos de reparação. De acordo com alguns autores a formação do broto nuclear ocorre durante a fase S, porém a duração do processo e extrusão desse material continua desconhecido (Thomas et al., 2003; Fenech, 2006; Utani et al.,2007). De acordo com Lindeberg et al. (2007) a gênese do broto nuclear e do micronúcleo seria semelhante, pois qualquer DNA que fique no citoplasma, na mitose, é encapsulado pela membrana nuclear na fase S durante a reconstituição do envelope nuclear e síntese de DNA, formando um brotamento, o qual pode se desconectar do núcleo e formar um micronúcleo.

A citotoxicidade tem clara influência na cinética de divisão celular e nos sistemas controladores do ciclo celular. Alterações nucleares avaliadas com vistas a detectar agentes com potencial citotóxico são representadas por picnose, que é um mecanismo alternativo de desintegração nuclear (Chen et al., 2006; Holland et al., 2008); cariólise, que representa a perda do núcleo; cromatina condensada que está relacionada às fases iniciais de apoptose, estando relacionada, também, aos processos de diferenciação e maturação de células epiteliais; cariorréx, que é a fragmentação do núcleo e, além de indicar fase final da apoptose, pode ser considerada potencial biomarcador de doenças sistêmicas e de exposição a agentes genotóxicos (Tolbert et al., 1992; Thomas et al, 2007); e células binucleadas, que são reconhecidas como falha na mitose.

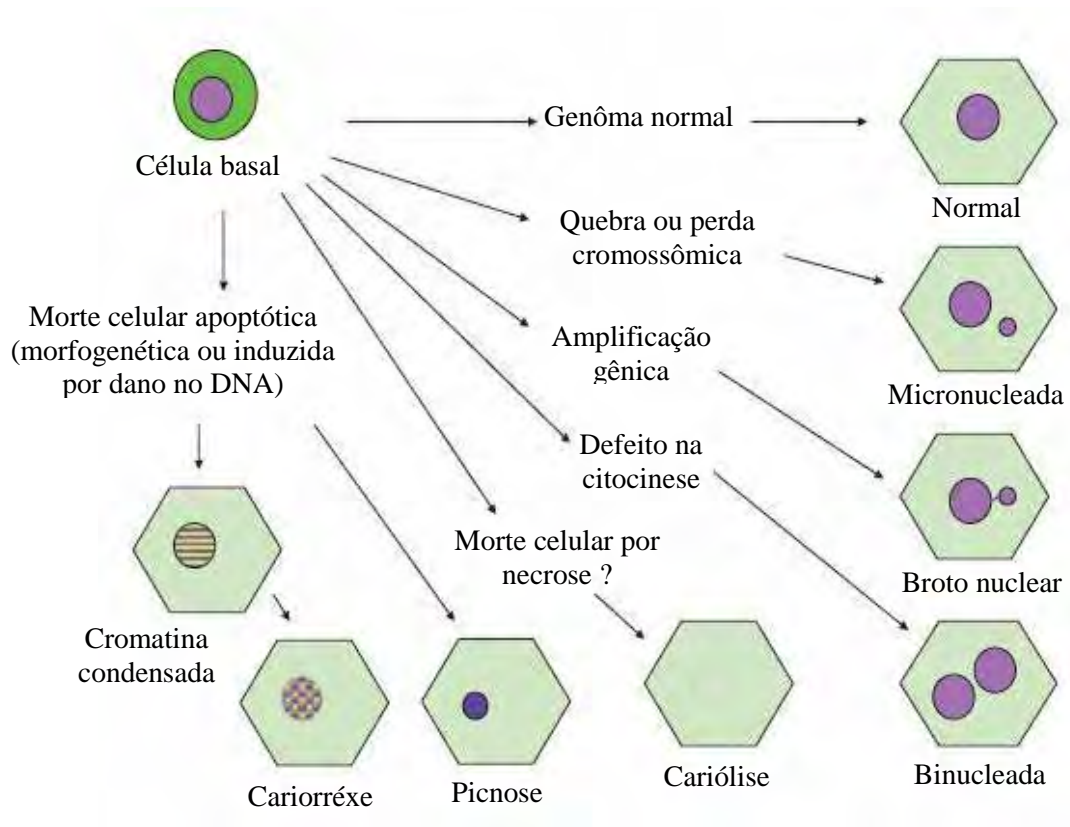


Figura 2. Representação esquemática das principais alterações avaliadas em células esfoliadas da mucosa bucal nos testes de mutagenicidade e citotoxicidade. Esquema adaptado de Thomas et al. (2009).

I.5 - Avaliação de alterações citogenéticas em esfoliado de células epiteliais

A avaliação da frequência de MN em diversos tipos celulares tem sido utilizada para identificar agentes mutagênicos em situações de exposição acidental ou ocupacional, para avaliar a influência do estilo de vida e para a detecção precoce de doenças relacionadas a desordens genéticas (Holland et al., 2008). Desde 1980, o teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares tem sido utilizado para monitorar danos genéticos em seres humanos (Fenech, 2011). Nos últimos anos, o teste do MN em células esfoliadas da mucosa bucal ganhou especial atenção pelo fato de serem estas a primeira barreira contra a inalação e ingestão de substâncias nocivas e por serem de fácil obtenção.

De acordo com Bonassi et al. (2009), a presença de MNs e outras anormalidades em células epiteliais está associada a defeitos genéticos na manutenção do genoma, envelhecimento acelerado, risco de câncer e de doenças neurodegenerativas. Já foram descritos aumentos na frequência de MN no epitélio oral de portadores de doenças sistêmicas como o *Diabetes mellitus* (Zúñiga-González, et al, 2007), de Síndrome de Down (Thomas et al, 2008) e com a Doença de Alzheimer (Thomas et al, 2007). Há estudos mostrando, também, o aumento de MN decorrente de radio (Sarto et al, 1987; Gil et al, 2000; Minicucci et al., 2005) e quimioterapias (Maluf et al., 2000; Baciuchka-Palmaro et al., 2002; Kopjar et al., 2002; Minicucci et al., 2008) para o câncer.

O teste do micronúcleo é considerado um método citogenético simples, rápido, de baixo custo e que permite a identificação de agentes clastogênicos e aneugênicos (Thierens et al., 1999; Bolognesi et al., 2004). Portanto, a avaliação da frequência de MN em células epiteliais esfoliadas vem sendo utilizada como um “dosímetro endógeno” da exposição a agentes genotóxicos e cancerígenos (Stich et al., 1985; Arlett et al., 1989), ou da presença de doenças relacionadas a alterações genéticas. Yakushiji et al (2003) sugeriram que a avaliação da presença de alterações genéticas em desordens orais pode auxiliar na identificação precoce de pacientes com risco para o desenvolvimento do câncer bucal e, com isso, aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Nos últimos anos foi também evidenciada a importância dos biomarcadores genéticos no prognóstico das desordens epiteliais potencialmente malignas,

principalmente as leucoplasias e os líquens planos (Scully & Burkhart, 1993; Lippman & Hong, 2001; Kamboj & Mahajan, 2007, Mihinkar et al., 2010).

Sabemos que a progressão maligna ocorre por meio de graus crescentes de displasias, que são resultantes do acúmulo de diversas alterações genéticas e moleculares (Vogelstein & Kinzler, 1993; Scully et al, 2000 a,b; Kim et al, 2001). Além disso, há dados na literatura que mostram a associação entre alterações genéticas e a progressão da displasia epitelial para o carcinoma espinocelular (Zang & Rosin, 2001; Subdo et al, 2001; Kovesi & Szende, 2002; Subdo et al, 2004; Van Houten et al, 2004; Brennan et al, 2007; Tsantoulis et al, 2007).

Nesse sentido, alguns pesquisadores tem utilizado o teste do micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral para a identificação de indivíduos com displasia e, portanto, com risco aumentado para a transformação maligna (Casartelli et al.,2000; Kamboj & Mahajan, 2007; Saran et al, 2008).

II. OBJETIVOS

Considerando as controvérsias existentes em relação ao comportamento das DPM, o presente estudo foi delineado visando a identificação de biomarcadores citogenéticos que pudessem estar associados à gênese e evolução dessas enfermidades e que permitam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos da carcinogênese bucal.

Objetivos específicos:

- avaliar a frequência células basais e diferenciadas, bem como a frequência de micronúcleos, brotos nucleares, células binucleadas, cariólise, cariorréxe e núcleos com cromatina condensada em células esfoliadas da mucosa oral de indivíduos com leucoplasia, líquen plano e câncer da cavidade bucal;
- correlacionar as frequências das alterações citogenéticas observadas nas células esfoliadas do local da lesão, com as observadas na área adjacente e contra lateral (sem lesão) à lesão, nas três doenças em estudo.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Processo n.337/08-CEP). De acordo com exigências da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), antes da coleta das amostras celulares, os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As características demográficas (idade, sexo e cor da pele), hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool, etc) e história médica (doenças de base, medicamentos de uso habitual, situação atual de saúde) da população do estudo, foram obtidas por meio de questionário (Anexo 1).

III.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 68 indivíduos, de ambos os sexos, na faixa etária entre 24 e 82 anos, sendo 10 portadores de leucoplasia oral (Figura 3), 16 de líquen plano (Figura 4) e 15 de câncer bucal. Como grupo controle foram incluídos 27 indivíduos saudáveis, sem lesões orais, e pareados por sexo e idade. Os portadores de leucoplasia e líquen plano oral eram pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Estomatologia do Departamento de Dermatologia e Radioterapia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP; os pacientes com câncer, ainda não submetidos a nenhum tipo de tratamento, estavam sob acompanhamento no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. A caracterização da população do estudo está apresentada na Tabela 1; as informações individualizadas estão no Anexo 2.

Tabela 1. Características da população do estudo

Variáveis	Controle N ^o (%)	Tipos de Lesão		
		Leucoplasia N ^o (%)	Líquen Plano N ^o (%)	Câncer N ^o (%)
Sexo				
Feminino	14 (51,9%)	5 (50%)	11(68,7%)	1 (6,7%)
Masculino	13 (48.1%)	5 (50%)	5 (31,3%)	14 (93,3%)
Total	27	10	16	15
Cor da pele				
Branco	24 (88,8%)	9 (90%)	14 (87,5%)	15 (100%)
Não Branco	3 (11,2%)	1 (10%)	2 (12,5%)	0 (0%)
Tabagismo				
Sim	4 (14,8%)	3 (30%)	2 (12,5%)	13 (86,6%)
Não	23 (85,2%)	7 (70%)	14 (87,5%)	2 (13,4%)
*Ex-tabagista	2 (8,6%)	3 (42,8%)	6 (42,8%)	1 (50%)
Etilismo				
Sim	5 (18,6%)	4 (40%)	0 (0%)	6 (40%)
Não	22 (81,4%)	6 (60%)	16 (100%)	9 (60%)
*Ex-etilista	1 (4,5%)	2 (3,3%)	2 (12,5%)	2 (22,2%)
Faixa etária	24 - 80	25-70	25 - 82	36 – 71
Média de idade ±	52,52 ± 14,9	52,1± 12,3	55,63 ± 16,0	61,8 ± 8,9
Desvio padrão				

* Os ex-tabagistas e ex-etilistas também fazem parte do grupo de não tabagistas e não etilistas, respectivamente.

III.2 Coleta e processamento das células da mucosa oral

De cada indivíduo foram coletadas amostras de células da mucosa com a lesão (região A); da mucosa adjacente à lesão (região B), a uma distância de aproximadamente 3 cm; e da mucosa saudável contra lateral (região C). Do grupo controle foi coletada apenas uma amostra, fazendo-se um *pool* de células esfoliadas da mucosa bucal direita e esquerda. As amostras celulares foram coletadas com espátula de madeira (abaixador de língua) umedecida em soro fisiológico, e a raspagem da mucosa foi realizada de modo a obter células da camada intermediária.

O material coletado foi transferido para tubos de centrífuga devidamente identificados e contendo 5 ml de soro fisiológico, e que foram armazenados em geladeira até o momento do processamento das células, de acordo com a técnica descrita por Sarto et al. (1987) e modificada por Berliën et al. (1995). Primeiramente, os tubos contendo a amostra celular em solução fisiológica foram centrifugados a 1000 rpm por cinco minutos e, em seguida, o sobrenadante foi parcialmente descartado, restando, aproximadamente, duas vezes o volume do sedimento de células. Posteriormente, foi acrescentada solução fixadora (metanol/ácido acético na proporção 3:1) até completar 5 ml; a suspensão foi agitada e novamente centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado e esta etapa repetida outras duas vezes. A suspensão resultante foi gotejada em lâminas limpas e deixada secar em temperatura ambiente, por 24 horas. A coloração foi feita pelo método de Feulgen/*fast green*, e as lâminas montadas para análise.

III.3 Análise citogenética

Todas as lâminas foram codificadas e as análises citogenéticas realizadas em teste cego, em microscópio óptico de luz, sob aumento de 400X. De cada região da mucosa oral foi avaliado um máximo de 2.000 células diferenciadas para a verificação da presença de micronúcleos e brotos nucleares, e de 1.000 células para a caracterização dos tipos celulares (basal ou diferenciada) e das anormalidades nucleares (células binucleadas, cariólise, cariorréxe e núcleos com cromatina condensada).

As alterações celulares foram classificadas com base nos critérios estabelecidos por Tolbert et al. (1991) e Thomas et al. (2009), e consideradas apenas aquelas que apresentavam pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes, e as que apresentavam citoplasma e núcleo bem delimitados, e intactos, e com pouca ou nenhuma dobra citoplasmática.

Os tipos e alterações celulares estão detalhados a seguir e documentados na Figura 5.

- *Células basais normais*: são pequenas, com um núcleo grande ovalado e uniformemente corado, citoplasma pouco angulado e com razão núcleo-citoplasma maior que o das células bucais diferenciadas.
- *Células diferenciadas normais*: núcleo pequeno, arredondado, uniformemente corado, citoplasma nitidamente angulado e razão núcleo-citoplasma menor comparativamente às células basais.
- *Células binucleadas*: com morfologia semelhante a das células normais diferenciadas, contêm dois núcleos com o mesmo tamanho, forma e coloração. Os núcleos são geralmente muito próximos entre si, podendo ou não se tocar.
- *Células picnóticas*: apresentam núcleos pequenos com coloração intensa e aparentemente condensados em relação à célula normal diferenciada.
- *Células micronucleadas*: aquelas que apresentam um núcleo principal e uma ou mais estruturas nucleares menores (micronúcleo - MN). Os MNs são redondos ou ovalados, com coloração igual a do núcleo principal e com diâmetro que varia entre 1/3 ou menos do núcleo principal.
- *Células com cariorréxe*: aquelas com o núcleo fragmentado e com aparência pontilhada.
- *Células cariолíticas*: aquelas que não possuem núcleo, sendo também denominadas *Feulgen* negativa.
- *Células com broto nuclear*: aquelas em que o núcleo apresenta um brotamento que permanece unido por meio de uma fina constrição; o broto pode ser 1/2 a 1/4 do tamanho do núcleo principal.
- *Células com cromatina condensada*: apresentam núcleo com padrão estriado, alternando regiões de cromatina bem corada e sem coloração.



Figura 3. Fotografia de leucoplasia oral: A – área da lesão; B – área adjacente à lesão; C – área contralateral à lesão (fotografia gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Claudia Navarro, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP).



Figura 4. Fotografia de líquen Plano oral: A – área da lesão; B – área adjacente à lesão; C – área contralateral à lesão (fotografia gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Cláudia Navarro – Disciplina de Medicina Bucal, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP).

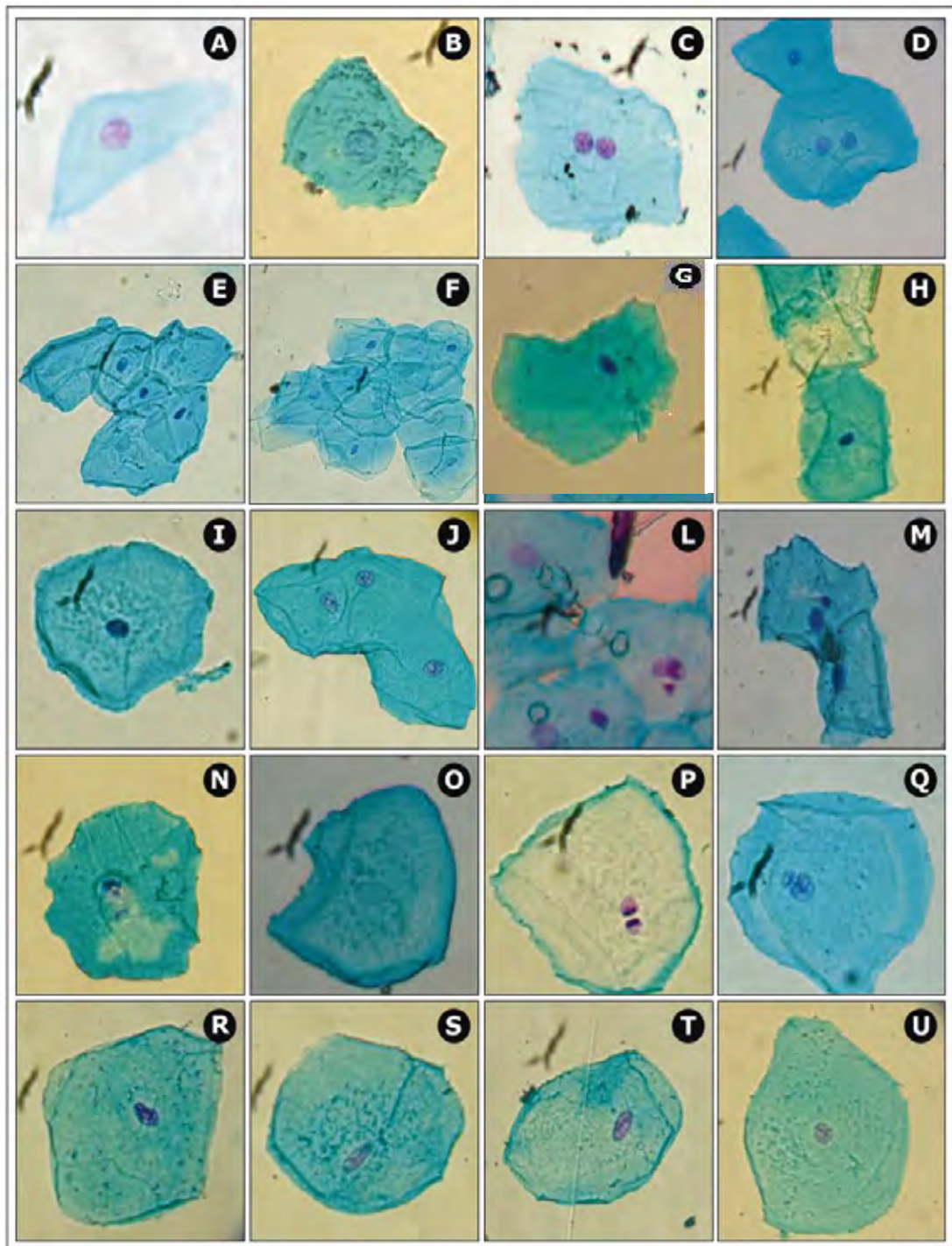


Figura 5: Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa oral. A e B - células basais; C e D - células binucleadas; E e F - células sobrepostas com citoplasma delimitado; G, H e I - células com núcleo picnótico; J - células com limites não identificados; L e M - células micronucleadas; N - célula com cariorréxe; O - célula com cariólise; P e Q - células com broto nuclear; R, S e T - células com núcleo com cromatina condensada; U- célula normal. Aumento de 400 X.

III.4 Análise estatística

De acordo com Thomas et al. (2009), foi utilizada a distribuição de Poisson para as análises dos biomarcadores sem super dispersão, que no caso deste estudo foram os micronúcleos, os brotos nucleares e as células binucleadas, e a distribuição binomial negativa para as contagens com super dispersão dos demais parâmetros (células basais, diferenciadas, picnose, cromatina condensada, cariorréxe e cariólise). O teste de Fischer foi utilizado para testar a associação entre as possíveis variáveis de interferência (p.ex. tabagismo e etilismo). Para significância foi adotado $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

As frequências de micronúcleo e brotos nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer são apresentadas na Tabela 2. Nas três enfermidades foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) de células micronucleadas (CMN) na área da lesão (A) em relação ao controle. No câncer, o Teste de Fischer mostrou que o aumento de CMN estava associado, também, ao consumo de álcool ($p < 0,05$). O mesmo aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado para a região contralateral saudável (C) das leucoplasias e do câncer oral, quando comparadas ao controle. Especificamente nas leucoplasias, a área de lesão (A) apresentou maior frequência de CMNs que a área adjacente (B), e estas maiores frequências que a área contralateral (C) ($p < 0,05$). Maior frequência de CMN foi também detectada na área contralateral (C) das leucoplasias em relação ao líquen plano. Para os brotos nucleares, a leucoplasia apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nas três áreas (A, B e C) e o líquen plano na área da lesão (A) e área adjacente (B), em relação ao controle. Nas leucoplasias, a área contralateral (C) apresentou maior frequência de brotos nucleares que as áreas de lesão (A) e adjacente (B); no líquen plano, a área de lesão (A) apresentou maior frequência que as áreas B e C ($p < 0,05$). Nos pacientes com câncer oral, foram observadas maiores frequências de brotos nucleares nas áreas da lesão (A) e contralateral (C), em relação à área adjacente à lesão ($p < 0,05$). Entre as doenças, o local da lesão (A) e a área adjacente (B) nas leucoplasias e líquen plano apresentaram aumentos significativos de brotos nucleares em relação ao câncer. Além disso, foi detectado aumento na frequência de brotos nucleares na área A do líquen em relação à mesma área da leucoplasia, e na área adjacente (B) da leucoplasia em relação à mesma área do líquen plano ($p < 0,05$).

Tabela 2. Frequência (%) de células micronucleadas e com brotos nucleares em pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer bucal

Tipo de lesão	Nº indivíduos	Nº células diferenciadas analisadas	Células com micronúcleo %	Brotos nucleares %
Controle[#]	27	54.000	0,11	0,18
Leucoplasia				
A	10	20.000	0,70 ^{¶+, a}	0,95 ^{¶*, a; 4+}
B	10	19.622	0,15 ^{b+}	1,38 ^{¶*, a; 4*; 3+}
C	10	16.461	0,91 ^{¶*, a, 3+}	2,19 ^{¶*, b+; 4*}
Líquen Plano				
A	16	30.971	0,45 ^{¶+, a}	1,32 ^{¶*, a+, 4*, 2+}
B	16	30.508	0,07 ^{b+}	0,75 ^{¶+, b, 4+}
C	16	30.569	0,20 ^a	0,39 ^b
Câncer				
A	15	30.000	0,33 ^{a, ¶+}	0,27 ^{ab+}
B	14	28.000	0,25 ^a	0,07 ^{b+}
C	14	28.000	0,46 ^{a, ¶+}	0,36 ^a

[#] Pool de célula da mucosa jugal esquerda e direita; A – região da lesão; B - mucosa adjacente à lesão; C - mucosa saudável contra lateral à lesão; ¶ representa diferença estatística em relação ao controle; ^{a, b} letras diferentes representam diferenças entre as áreas na mesma doença; ² representa diferença em relação à leucoplasia na respectiva área; ³ representa diferença em relação ao líquen plano na respectiva área; ⁴ representa diferença em relação ao câncer na respectiva área; + p < 0,05; * p < 0,01.

Na Tabela 3 são apresentadas as proporções de células basais e diferenciadas, bem como as frequências de células binucleadas (BN), com picnose (Pic), cromatina condensada (CC), cariorréxe (Crx) e com cariólise (Crl), na mucosa bucal dos pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer bucal. Com relação ao tipo celular, as mais frequentes nos quatro grupos (incluindo o controle) foram as células diferenciadas (> 80%). No entanto, nos pacientes com câncer a proporção de células basais e diferenciadas (respectivamente, 10,6% e 89,4%) foi estatisticamente diferente do controle (respectivamente, 5,5% e 54,5%) e dos pacientes com leucoplasia (respectivamente, 4,7% e 95,3%) e com líquen plano (respectivamente, 4,2% e 95,8%) ($p < 0,05$).

Para as anormalidades nucleares, os portadores de leucoplasia e líquen plano apresentaram, na área adjacente à lesão (B), frequências aumentadas de células BN (respectivamente, 3,6% e 2,9%) em relação ao controle (1,9%). Especificamente nas leucoplasias, a área contralateral (C; 4%) também apresentou maior frequência de células BN que o controle ($p < 0,05$). Quanto às células picnóticas, os portadores de leucoplasia apresentaram maiores frequências nas áreas adjacente (B; 61,2%) e contralateral (C; 66,6%) à lesão em relação aos pacientes com câncer. Da mesma forma, a área contralateral (C) da leucoplasia apresentou maior frequência de picnose que a mesma área (C; 40,9%) nos líquens planos ($p < 0,05$). Para as células com cromatina condensada, as três doenças apresentaram aumentos significativos ($p < 0,05$) na área de lesão (A) em relação ao controle. Além disso, os portadores de carcinoma oral e leucoplasia também apresentaram aumento significativo desse biomarcador nas áreas adjacente (B) e contralateral (C) à lesão em relação ao controle; maior frequência de células com CC foi ainda observada na área contralateral (C) da leucoplasia em relação à mesma área do líquen plano ($p < 0,05$). Com relação à cariorréxe, as áreas de lesão (A) das três doenças apresentaram aumento significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); apenas para o câncer o nível de significância foi ($p < 0,01$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) na frequência de cariorréxe foram também observadas entre as áreas avaliadas da mesma doença, isto é, na região de lesão (A) do câncer foi detectada maior quantidade de células com Crx que a área adjacente (B) e contralateral (C) à lesão. Da mesma forma, os portadores de líquen plano apresentaram aumento significativo de Crx na área de lesão (A) em relação à área contralateral (C) ($p < 0,05$). Para cariólise, os pacientes com câncer apresentaram frequência aumentada na área da

lesão em relação ao controle, e, também na área adjacente (B) em relação à mesma área no líquen plano ($p < 0,05$).

Tabela 3. Proporção de células basais e diferenciadas (%) e frequência (%) de células com alterações nucleares na mucosa bucal de pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer oral

Tipos de lesão	Indivíduos Nº	Células Nº	Tipo celular (%)		BN %	Pic %	CC %	Crx %	Crl %
			Basal	Diferenciado					
Controle[#]	27	27.000	5,5	94,5	1,9	47,5	11	2,1	48,7
Leucoplasia									
A	10	10.000	4,7	95,3	2,5	61,8	29,4	6,51	70,3
B	10	10.000	7,1	92,9	3,6 [¶]	61,2 ⁴	26,3	4,3	58,5
C	10	8.500	5	95	4,0 [¶]	66,6 ^{4,3}	25,7 ^{¶,3}	3,7	67,8
Líquén Plano									
A	16	16.000	4,2	95,8	2,5	49,4	23,91	5,71 ^{a+}	52,5
B	16	15.566	5,4	94,6	2,9 [¶]	46,9	17,1	5 ^b	51
C	16	15.582	4,6	95,4	2,2	40,9	15,7	2 ^b	40
Câncer									
A	15	15.000	10,6 [¶]	89,4 [¶]	2,1	48,4	26,31	12,8 ^{¶*,a}	91,4 [¶]
B	14	14.000	7,7	92,3	2,4	35,6	22,31	4,6 ^a	87,5 ³
C	14	14.000	6,9	93,1	2,2	33,2	21,51	2,8 ^{b+}	73,1

[#] Pool de células da mucosa jugal esquerda e direita; A – região da lesão; B - mucosa adjacente à lesão; C - mucosa saudável contra lateral à lesão; [¶] representa diferença estatística em relação ao controle; ^{a,b} letras diferentes representam diferenças entre as áreas na mesma doença; ² representa diferença em relação à leucoplasia na respectiva área; ³ representa diferença em relação ao líquen plano na respectiva área; ⁴ representa diferença em relação ao câncer na respectiva área; ⁺ $p < 0,05$; * $p < 0,01$.

Tabela 4. Resumo dos resultados do estudo.

Tipo de lesão/marcador	Grupos			
	Controle	Leucoplasia	Líquen plano	Câncer
Leucoplasia				
MN	A>;B=;C>	A=C>B	A=;B=;C>	A=;B=;C=
Broto	A>;B>;C>	A=B>C	A<;B>;C=	A>;B>;C>
BN	A=;B>;C>	A=B=C	A=;B=;C>	A=;B=;C=
Pic	A=;B=;C=	A=B=C	A=;B=;C>	A=;B>;C>
CC	A>;B>;C>	A=B=C	A=;B=;C>	A=;B=;C=
Crx	A=;B=;C=	A=B=C	A=;B=;C=	A=;B=;C=
CrI	A=;B=;C=	A=B=C	A=;B=;C=	A=;B=;C=
Líquen plano				
MN	A>;B=;C=		A=B>C	A=;B=;C=
Broto	A>;B>;C=		A>B=C	A=;B=;C=
BN	A=;B>;C=		A=B=C	A=;B=;C=
Pic	A=;B=;C=		A=B=C	A=;B=;C=
CC	A=;B=;C=		A=B=C	A=;B=;C=
Crx	A=;B=;C=		A>B=C	A=;B=;C=
CrI	A=;B=;C=		A=B=C	A=;B <;C=
Câncer				
MN	A>;B=;C>			A=B=C
Broto	A=;B=;C=			A>B<C
BN	A=;B=;C=			A=B=C
Pic	A=;B=;C=			A=B=C
CC	A=;B=;C=			A=B>C
Crx	A>;B=;C=			A=B>C
CrI	A>;B=;C=			A=B=C

MN – micronúcleo; Broto- brotos nucleares; BN- células binucleadas; Pic – picnose; CC – cromatina condensada; Crx – cariorréxe; CrI - cariólise. A – área da lesão; B – área adjacente; C- área contralateral

V. DISCUSSÃO

No Brasil e em várias partes do mundo a incidência de câncer de boca é maior em indivíduos do sexo masculino, brancos e na faixa etária de 50 a 70 anos (Aguiar et al., 2002; Dedivits et al.,2004; Oliveira et al.,2006; Abdo et al.,2007). Este tipo de câncer é considerado um problema de saúde pública, pois, além da alta incidência, apresenta alta taxa de mortalidade (INCA, 2007), especialmente pelo diagnóstico em estágios avançados, visto que as lesões iniciais são assintomáticas (Lowry & Craven, 1997; Scully & Porter, 2000).

A casuística do presente estudo confirmou os dados demográficos reportados na literatura no que diz respeito à média de idade, sexo e cor da pele dos pacientes. Especificamente para os casos do líquen plano, estudos prévios também demonstraram maior incidência em mulheres, predominantemente adultas e acima de 40 anos (Bowers et al., 2000). Antagonicamente, nas leucoplasias a maior incidência é no sexo masculino, a partir dos 30 anos de idade, mas com pico acima dos 50 anos (Van der Waal et al, 1997; Bagán-Sebastián et al.,1991).

No Brasil, há mais casos registrados de câncer de boca nas regiões sul e sudeste (Borges et al., 2009), sendo a língua a região topográfica mais incidente (44%), seguida pelo assoalho bucal com 16% (Abdo, 2001). Similarmente, no presente estudo as regiões topográficas de maior incidência das lesões cancerosas foram a língua (40%) e o assoalho bucal (26%) (dados não apresentados).

Os mecanismos de malignização das DPM não são ainda completamente conhecidos. Até o momento, as informações apresentadas na literatura têm por base estudos epidemiológicos e de biomarcadores moleculares relacionados, principalmente, à instabilidade genômica e cinética de divisão celular. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de micronúcleos e outras alterações celulares em pacientes com líquen plano, leucoplasia e câncer bucal.

A literatura mostra que os parâmetros que indicam processos relacionados à morte celular, tais como cariólise, cariorréxe, cromatina condensada e picnose (Thomas et al., 2007; Thomas et al., 2009), assim como os que indicam alterações genéticas e no

ciclo celular - MN, células binucleadas, brotos nucleares e frequência de células basais e diferenciadas (Thomas et al, 2009), podem ser utilizados para avaliar os riscos de malignização e/ou desregulação da cinética celular dentro de uma doença (Matsumoto et al.,2001; Ramirez & Saldanha et al. 2002; Thomas et al.,2007; Mahimkar et al.,2010).

O presente estudo mostrou aumento significativo de CMNs em pacientes com DPM e câncer. Resultados semelhantes haviam sido descritos por Chaterjee et al. (2009) avaliando esfoliado bucal de pacientes com doenças pré-malignas e carcinomas orais. Nesse estudo os autores também observaram frequência aumentada (em até 4 vezes) de CMNs. Saran et al. (2008) além de relatar o aumento de CMNs em pacientes com eritroplasia, leucoplasia, fibrose submucosa e líquen plano, relacionou esse achado ao desenvolvimento do câncer. Nossos dados, contudo, não permitem afirmar com certeza, que o aumento de CMNs nos pacientes com câncer estivesse exclusivamente relacionado à doença, uma vez que foi detectada associação significativa com o etilismo, sendo este um fator de confusão já descrito na literatura. Reis et al. (2006) avaliando alterações citogenéticas em mucosa oral de indivíduos usuários crônicos de álcool, concluíram que esse hábito poderia estar associado ao aumento dos danos genéticos encontrados. Da mesma forma, Ramirez & Saldanha (2002) encontraram aumento da frequência de micronúcleo e outras anormalidades nucleares em pacientes com carcinomas orais e com alto consumo de álcool. Recentemente, Kamboj & Mahajan (2007) postularam que a maior frequência de micronúcleos observada em portadores de leucoplasia e carcinoma oral estava relacionada ao tabagismo e ao consumo de álcool, com possível sinergismo entre ambos. Em nosso estudo, contudo, não encontramos associação entre o tabagismo e o aumento de CMNs, embora os grupos de portadores de leucoplasia e câncer apresentassem maior número de tabagistas e etilistas. Sabe-se que o álcool por si só não é mutagênico e que são múltiplos os mecanismos envolvidos na carcinogênese associada ao etilismo, dentre os quais está a ação do acetaldeído (AA), o primeiro metabólito da oxidação do etanol, que já se mostrou tóxico, mutagênico e carcinogênico em diversos modelos animais (Feron et. al., 1982; Woutersen et al.,1986; IARC, 2009).

Os dados ora obtidos para a frequência de micronúcleos confirmam aqueles descritos recentemente por Mahimkar et al. (2010), que detectaram aumento de CMN em portadores de leucoplasia. Em 2000, Bloching et al. já haviam reportado o aumento

de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal em pacientes com leucoplasia e com câncer no trato aerodigestivo superior, embora fossem raras as informações sobre a frequência de outros marcadores de instabilidade genética. Nossos resultados mostraram que os pacientes com leucoplasia apresentaram aumento significativo de brotos nucleares em relação ao grupo controle e aos portadores de câncer, e esta instabilidade genômica não esteve restrita à área da lesão. Embora os mecanismos de origem ainda não sejam completamente conhecidos, acredita-se que os brotos nucleares estejam relacionados à amplificação gênica (Thomas et al. 2009; Fenech, 2011).

Vários estudos têm sugerido a possível evolução do líquen plano para o câncer bucal (Zhang et al, 1997, 2000; Edwards & Kelsch, 2002). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que, igualmente ao câncer, os pacientes com líquen plano apresentaram aumentos na frequência de alterações genéticas (não apenas CMN, mas também brotos nucleares) no local da lesão. Em 2007, Buajeeb et al. (2007) também descreveram o aumento de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com líquen plano erosivo e atrófico.

Dentre as anormalidades celulares indicativas de citotoxicidade e morte celular, os pacientes com leucoplasia apresentaram, nas três regiões orais analisadas, aumentos significativos de células com cromatina condensada, indicativo de estágios primários da apoptose (Thomas et al., 2009). Além do aumento de células picnóticas (também representativas de apoptose), nossos resultados mostraram, também, que os pacientes com líquen plano apresentaram maior índice de cariorréxe na área da lesão, confirmando os achados de Nippelberg et al. (2001), que evidenciaram o processo de morte celular por apoptose na camada basal e parabasal na lesão em líquen plano.

A desregulação no ciclo celular faz com que a cinética de divisão seja alterada nos tumores, sendo esse descontrole um evento importante dentre as múltiplas etapas da tumorigênese (Canevari & Rogatto, 2004), e um dos fatores mais relevantes na carcinogênese bucal (Ribeiro et al. 2009; Minicucci et al. 2010; Queiroz et al. 2010). Nos pacientes com câncer de boca, nossos resultados confirmaram a intensa proliferação celular na área de lesão, uma vez que foi observado aumento significativo de células basais, embora os biomarcadores de morte celular por apoptose e necrose, respectivamente cariorréxe e cariólise, também estivessem aumentados na área de lesão.

É importante ressaltar que a apoptose, ou morte celular programada, ocorre em circunstâncias diversas, tais como organogênese normal e patológica, hematopoiese normal e patológica, seleção do sistema imune, resposta inflamatória, eliminação celular após injúrias por agentes genotóxicos etc (Ranganath & Nagasheere, 2001), sendo também considerada um sistema de defesa inato da manutenção numérica celular (Nicholson 2000). Segundo Barcinsk (2004), a malignidade é caracterizada pela expansão clonal de uma célula transformada, a qual sinergicamente perdeu o controle da proliferação e a capacidade de morrer por apoptose. Enquanto o tumor maligno apresenta intensa e rápida proliferação celular, no tumor benigno a proliferação é vagarosa (INCA, 2011). Derka et al. (2006) constataram em modelos animais que a proliferação celular e as taxas de apoptose são mais altas nos estágios iniciais da tumorigênese.

Finalizando, pode-se afirmar que pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer de boca apresentam frequências aumentadas de alterações citogenéticas, algumas delas não restritas à área da lesão. Esses achados confirmam a influência genética na etiologia e desenvolvimento dessas doenças, ao mesmo tempo em que sugerem que os mecanismos de citotoxicidade e mutagenicidade associados às leucoplasias, líquen plano e câncer bucal não estão relacionados, apenas, ao processo fisiopatológico da lesão. Além disso, os resultados sugerem a possibilidade de que essas lesões partilhem eventos comuns de gênese e desenvolvimento.

VI. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- pacientes com leucoplasia, líquen plano e câncer de boca apresentam maior incidência de alterações cromossômicas (micronúcleos) na mucosa bucal, mas que não são restritas à área da lesão;
- pacientes com líquen plano apresentam maior amplificação gênica (aumento de brotos nucleares) na área da lesão;
- pacientes com leucoplasia apresentam aumento da frequência de marcadores de citotoxicidade, desregulação do ciclo celular e morte celular na mucosa oral (picnose, células binucleadas e cromatina condensada)
- pacientes com líquen plano apresentam aumento da frequência do marcador de marcadores de desregulação do ciclo celular (células binucleadas), citotoxicidade e morte celular (cariorréxe) restrito à área da lesão;
- pacientes com câncer de boca apresentam aumento de proliferação celular na área da lesão e maiores índices de citotoxicidade e morte celular na área de lesão e adjacente.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo EN. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal em tratamento num hospital vinculado ao Sistema Único de Saúde em Belo Horizonte [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Aguiar MCF, Garrocho AA, Abdo EM. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. *Rev Bras Cancerologia* 2002 ; 48(3): 357-62.

Arlett C, Ashby J, Fielder RS, Scott D. Micronuclei: origins, applications and methodologies – a workshop sponsored by the health and safety executive held in Manchester, 23-25 May, 1989. *Mutagenesis*, 1989;4:182-5.

Baciuchka-Palmaro M, Orsiere T, Duffaud F, Sari-Minodier I, Pompili J, Bellon L, et al. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 2002; 520:189-98.

Bagán-Sebastián JV, Aguirre-Urizar JM, Milián-Masanet A, Peñarrocha-Diago M, García-Pola-Vallejo MJ. A morphometric study of 74 cases of oral lichen planus. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 1991; 92:265-8.

Barcinski MA. Morte Celular. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. n.1. São Paulo: Atheneu, 2004; p.57-63

Berliën JAM, Copper MP, Braakhuis BJM, et al. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*, 1995;16:2395-2400.

Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the head and neck*. Lyon: IARC Press;2005.

Boller K, Schmid W. Chemical mutagenesis in mammals. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. *Humangenetik*, 1970;11(1):35-54.

Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Burgaz S, et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis. COMMENTARY*. 2009, p. 1–8.

Bolognesi C, Landini E, Perrone E, Roggeri P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat Res*. 2004; 557(2):109-17.

Borges DML, Sena MF, Ferreira MF, Roncalli GA. Mortality for oral cancer and socioeconomic status in Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 2009; 25(2):321-327.

Bowers KE, Sexton J, Sugerman PB. Commentary. *Clin Dermatol*. 2000;18:497-498.

Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager 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* 2000;36:550–5.

Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103 suppl 1:S19.e1-12.

Bromwich M. Retrospective study of the progression of oral premalignant lesions to squamous cell carcinoma: a South Wales experience. *J Otolaryngol.* 2002;31:150-6.

Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, et al. Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. *Cancer.* 2001;92:2102-8.

Bruno E, Alessandrini M, Russo S, et al. Malignant degeneration of oral lichen planus: our clinical experience and review of the literature. *Otorrinolaringol Ibero Am.* 2002;29:349-57.

Buajeeb W, Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. *Mutat Res.* 2007;627:191–6.

Canevari RA, Rogatto SR. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular.* n.1. São Paulo: Atheneu, 2004; p.189-201

Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Palmieri A, Stabellini G, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol.* 2005; 41:365-374.

Carvalho MB, et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Assoc Med Bras.* 2001; 47(3).

Casartelli G, Bonatti S, De Ferrari M, Scala M, Mereu P, Margarino G, et al. A. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol,* 2000;22:486-92.

Çelik A, Çavas T, Ergene-Güzükara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis.* 2003.5 (18) p. 417-421.

Chainani-Wu N, Silverman SJr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc.* 2001;132:901-9.

Chatterjee S, Dhar S, Sengupta B, Ghosh A, De M, Roy S, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol Mech Methods.* 2009;19(6-7):427-33.

Chen Z, Lou J, Chen S, Heng W, Wu W, Jin L, et al. Evaluating the genotoxic effects of workers exposed to lead using micronucleus assay, comet assay and TCR gene mutation test. 2006; 223(3):219-26

Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121:157-60.

Dedivitis RF, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70(1): 35-40.

Derka S, Vairaktaris E, Papakosta V, Vassiliou S, Acil Y, Vylliotis A, Spyridonidou S, Lazaris AC, Mourouzis C, Kokkori A, Moulavasili P, Perrea D, Donta I, Yapijakis C, Patsouris E. *Oral Oncol.* 2006;42 (5):540-50

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2004;40:158-63.

Edwards PC, Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management..*J Can Dent Assoc.* 2002;68:494-9.

Esmeili T, Lozada-Nur F, Epstein J. Common benign oral soft tissue masses. *Dent Clin N Am,* 2005;49:223–240.

Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis -block micronucleus method. *Mutat Res.* 1997; 392: 11-8.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 2006; 600: 58–66.

Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The human micronucleus project-n international collaborative study on use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans *Mutat Res.* 1999;428:271-83.

Fenech, M. & Crott, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2002;504, 131–136.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011; 26: 1. 125–132, 2011.

Feron VJ, Krusse A, Woutersen RA. Respiratory tract tumors in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1982; 18(1):13-31.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. *Journal of Oral Rehabilitation* 2007;34: 448–455

Foulkes WD, Narod SA. Screening for cancer in high risk families. *Cancer Treat Res.* 1996;86:165-82.

Gill OM, Oliveira NG, Rodrigues AS, et al. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis,* 2000;15:60-75.

Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Diseases.* 2008;14, 229–243.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 2000;50:77-33.

Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Edkelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol.* 2002;38: 486-90.

Heddle JA. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakage syndromes. *Mutat Res.* 1991; 247(2):221-9

Holland, N, Bolognesi, C, Kirsch-Volders M, Bonassi, S, Zeiger, E, Knasmueller S and Fenech, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.*, 2008; 659 p.93–108

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2007.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). [homepage on the internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2011. [acesso 8 mar 2011]. Disponível em: www.inca.gov.br.

Jacobs C, Goffinet DR, Goffinet L, Kohler M, Fu WE. Chemotherapy as a substitute for surgery in the treatment advanced respectable head and neck cancer. A report from the Northern California Group. *Cancer.* 1987;60:1178-83.

Kamboj M, Mahajan S. Micronucleus—an upcoming marker of genotoxic damage. *Clin Oral Invest*, 2007; 11:121–126.

Kim J; Yook JL; Lee EH, Ryu MH, Yoon JH, Hong JC, Kim DJ, Kim HS. Evaluation of premalignant potential in oral lichen planus using interphase cytogenetics. *J Oral Pathol Med*, 2001;30:65-72.

Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Acute cytogenetic effects of antineoplastic drugs on peripheral blood lymphocytes in cancer patients chromosome aberrations and micronuclei. *Tumori.* 2002; 88:300-12.

Kozamara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Cranio Maxillo Surg.* 2005;33:342-8.

Kurokawa H, Yamashida Y, Takeda S, Tomoyose T, Funaki K, Takano H, et al. Relationship between epithelial dysplasia and the development of squamous cell carcinoma in oral leukoplakia. *Asian J Oral Maxillofac Surg.* 2002;14:197-201.

Lazarus P, Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 36 (5):421-31, 2000.

Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin SM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1702-10.

Lindeberg H, Wang X, Järventaus H, Falck G, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res*. 2007; 617:33–45.

Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med*. 2001;344:1323-6.

Lowry RJ, Craven MA. Smokers and drinkers awareness of oral cancer: a qualitative study using focus group. *Br Dental J*. 1997;187(12):668- 70.

Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk L, Bardin-Mikollajczak A, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12:25-33.

Maier H, Born IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. Effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986; 10:425-429.

Maluf, SW, Erdtmann, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 2000;471: 21-27.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:774-81.

Mell HK. Management of oral and genital herpes in the emergency department. *Emerg Med Clin N AM*. 2008;26:457–473

Mahimkar MB, Samant TA, Kannan S, Patil T. Influence of genetic polymorphisms on frequency of micronucleated buccal epithelial cells in leukoplakia patients. *Oral Oncol*. 2010;46(10):761-6.

Mignogna MD, Lo Muzio L, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Bucci E. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. *Oral Oncol*. 2001;37:262-7.

Mignogna MD, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Califano L, Lo Muzio L. Clinical behavior of malignant transforming oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol*. 2002;28:838-43.

Minicucci EM, Camargo B, Costa MC, Ribeiro DA, Ribeiro LR, Salvadori DMF. DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumor undergoing chemotherapy. *Clin Exp Med*. 2008. (in press)

Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MAC, Pereira A, Ribeiro LR, de Camargo JLV, Salvadori DMF. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Radiat Res*, 2005;46:135-42.

Minicucci EM, Ribeiro DA, da Silva GN, Pardini MI, Montovani JC, Salvadori DM. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Toxicol Pathol*, 2010, in press

Mork J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. *Anticancer Res*. 1998;18:3705-08.

Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R. Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci* 2001; 109: 361

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutics agents. *Nature* 407:810-6, 2000.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. 2nd ed. London: Springer Verlag; 1997.

Queiroz AB, Focchi G, Dobo C, Gomes TS, Ribeiro DA, Oshima CT. Expression of p27, p21(WAF/Cip1), and p16(INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2010 Jul;30(7):2799-803.

Ranganath RM, Nagasheere NR. Role of programmed cell death in development. *International Review Cytology* 202:159-242, 2001.

Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res*. 2002;1:246–260.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:47-62.

Reis SRA, Santo ARE, Andrade MGS, Sadigursky M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz Oral Res* 2006;20(2):97-102

Ribeiro DA, Fracalossi AC, Uatari SA, Oshima CT, Salvadori DM. Imbalance of tumor suppression genes expression following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *In Vivo*. 2009 Nov-Dec;23(6):937-42.

Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt E-B, Bladström A, Hansson BG, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125:1327-36.

Rosin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res*, 1992;267:265-276.

Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notanik K, Totsuka Y, Shinodoh M, et al. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30:49-53.

Sankaranarayanan R, Mathew B, Varghese C, Sudhakaran PR, Menon V, Jayadeep A, et al. Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment. *Oral Oncol*. 1997;33:231-6.

Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with precancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncology*, 2008; 44, 354– 360.

Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal. *Mutagenesis*, 1987;2:11-7.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975;31:9-15.

Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:246-56.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Part 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*. 2000a; 36:256-63.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Part 2. Chromosomal aberrations. *Oral Oncol*. 2000b; 36: 311-27

Scully C, Porter S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Brit J Oral Maxillo Surg*. 2008;46:198–206.

Scully C, Laskaris G. Mucocutaneous disorders. *Periodontol 2000*. 1998 ; Review. 18:81-94.

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. & Wahl, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol*.1998; 140, 1307–1320.

Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leucoplakia and malignant transformation: a follow up study. *Cancer*. 1984;33:363-8.

Spitz MR, Wei Q, Li G, Wu X. Genetic susceptibility to tobacco carcinogenesis. *Cancer Invest* 1999;17:645-59.

Squier, C.A. & Kremer, M.J. Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl. Câncer. Inst. Monogr* 2001; 7–15p.

Stich HF, Hornby AP, Dunn BP. A pilot beta-carotene intervention trial with inuits using smokeless tobacco. *Int. J. Cancer*, 1985; 36:321-7.

Stich HF, Rosin MP. Quantification the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int. J. Cancer*, 1983;31:304-8.

Suarez P, Batsakis JG, el-Naggar AK. Leucoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? – A review. *Adv Anat Pathol*. 1998;5:137-55.

Subdo J, Lippman S, Lee JJ, Mão BL, Kildal W, Subdo A, et al. The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leucoplakia. *N Engl J Med*. 2004;350:1405-13.

Subdo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer*. 2005;115:339-45.

Sudbo J, Bryne M, Johannessen AC, Kildal W, Danielsen HE, Reith A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J Pathol*. 2001;194:303-10

- Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Aust Dent J.* 2002;47:290-7.
- Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral câncer. *Arch Iran Med.* 2007;10:227-32.
- Ten Cate, AR, Ten Cate, R and Copelad E. *Oral Histology: Development, Structure and Function.* Mosby-Year Book, 1998, 439p.
- Thierens H, Vral a, Barbé M, Aousalah B, De Ridder L. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat Res.* 1999; 445(1):105-11.
- Thomas P, Umegaki K, Fenech M, Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* .2003; 18:187– 194.
- Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis.* 2007;22:371-9.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res.* 2008;638:37-47.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmuller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37. Epub 2009 May 7.
- Thuler LCS, Rebelo MS. Epidemiologia do câncer. In: Kowalsky LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. *Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal.* São Paulo: Ed. Frôntis; 1999. p.1-9.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am j Epidemiol.* 1991; 134(8):840-50.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other anomalies in buccal smears methods development. *Mutat Res,* 1992;271:69-77.
- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007;43:523-34
- Utani K, Kawamoto J, Shimizu N. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype. *Mol. Cancer Res.*2007; (n.5)695 – 704.
- Valente G, Pagano M, Carrozzo M, et al. Sequential immunohistochemical p53 expression in biopsies of oral lichen planus undergoing malignant evolution. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:135-40.
- Van der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of managementl. *Oral Oncol.;* 2009 45:317– 323
- Van Houten V, Leemans CR, Kummer JA, Dijkstra J, Kuik DJ, van den Brekel MW, et al. Molecular diagnosis of surgical margins and local recurrence in head and neck cancer patients: a prospective study. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3614-20.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-41.

Vokes EE. Interactions of chemotherapy and radiation. *Emin Oncol.* 1993;20(1):70-9.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Wall I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:575–580.

Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol.* 2001;194:294-7.

Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral cancer. *J Pathol.* 2000;190:407-9.

Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ.* 2001; 65(4):306-12.

Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats: III carcinogenicity study. *Toxicology.* 1986; 41:213-231.

Yakushiji T, Uzawa K, Shibahara T, Noma H, Tanzawa H. Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oncol.* 2003;22:1201-7.

Zhang L, Michelsen C, Cheng X, Zeng T, Priddy R, Rosin MP. Molecular analysis of oral lichen planus. A premalignant lesion? *Am J Pathol.* 1997;151:323-7.

Zhang L, Cheng X, Li Y, et al. High frequency of allelic loss in dysplastic lichenoid lesions. *Lab Invest.* 2000;80:233-7.

Zhang L, Rosin MP. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? *Pathol Med.* 2001;30:513-20.

Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007;634:126-34.

ANEXOS

Anexo 1: Questionário

Registro do paciente no estudo
 Data / /

I - Identificação

1- Nome.....
 2- Endereço.....
 3- CEP _____ - _____
 4- Cidade _____
 5- Telefone (_____) _____
 6 - RGH|_|_|_|_|_|_|_|_| - |_|_|
 7 - Sexo [M] masculino [F] feminino|_|
 8 - Raça [B] branco [A] amarelo [M] mulato [N] negro [O] outros|_|
 9 - Data nascimento / /
 10 - Idade|_|
 11- pacientes [1] Cancer CP inicial [2] Cancer CP em tratamento [3] Câncer CP 3anos proserv
 [5] leucoplasia [6] líquen [7] HFI [8] candidose [9] queilite angular [10] Queilite Actínica
 [11] sjogren [12] herpes [13] pênfigo [14] lupus [15] penfigoide [16] CEC lábio
 [17] UAR [18] outros [19] **CONTROLE**|_|

II - Antecedentes pessoais

12- Fuma [S] sim [N] não|_|
 13 - Há quanto tempo (meses)|_|
 14 - Quantos cigarros/dia.....|_|
 15 - Tipo [1] cachimbo [2] charuto [3] palha [4] papel c/ filtro [5] outros|_|
 16 - Já fumou? [S] sim [N] não|_|
 17 - Há quanto tempo deixou de fumar (meses).....|_|
 18 - Quantos cigarros/dia|_|
 19 - Durante quanto tempo fumou (meses)|_|
 20 - Tipo [1] [2] [3] [4] [5]|_|
 21 - Bebe [S] Sim [N] Não|_|
 22 - Há quanto tempo (meses).....|_|
 23 - Tipo [1] cachaça [2] cerveja [3] whisky [4] vodka [5] vinho [6] outras|_|
 24 - Quantidade/dia - nº copos / dia|_|
 25 - Já bebeu? [S] Sim [N] Não|_|
 26 - Tipo [1] cachaça [2] cerveja [3] whisky [4] vodka [5] vinho [6] outras|_|
 27 - Quantidade - nº copos / dia|_|
 28 - Há quanto tempo deixou (meses)|_|
 29 A - Por quanto tempo bebeu (meses).....|_|
 30 - Contato com substâncias tóxicas [S] sim [N] não|_|
 31 - Quais _____
 32 - Por quanto tempo (meses)|_|
 33- Período sem contato com a(s) substância(s) (meses)|_|
 34 - História de exposição à radiação [S] sim [N] não|_|
 35- Há casos de câncer na família [S] sim [N] não|_|

- 36- Grau parentesco [1] pai [2] mãe [3] irmão [4] irmã [5] avô paterno [6] avó paterna [7] avô materno [8] avó materna [9] _____|_|
 37- localização [1] Cabeça e Pescoço [2] boca [3] lábio [4] pele [5] estomago [6] mama [7] próstata [8] útero [9] pulmão [10] intestino [11] _____|_|

III - História Médica

- 38- Portador de doença crônica [1] sim [2] não|_|
 39- Qual _____|_|
 40 - Usa habitualmente algum tipo de medicamento [S] sim [N] não|_|
 41 - Quais [1] antibiótico [2] vitamina [3] antiinflamatório [4] antidepressivo [5] anti hipertensivo [6] colesterol [7] outros _____|_|
 42 - Frequência/dia|_|
 43 - Já usou algum tipo de medicamento [S] sim [N] não|_|
 44- Quais [1] antibiótico [2] vitamina [3] antiinflamatório [4] antidepressivo [5] anti hipertensivo [6] colesterol [7] outros _____|_|
 45 - Frequência/dia|_|
 46 - Há quanto tempo deixou (meses)|_|

IV Hábitos Alimentares

- 47- Faz uso habitualmente
 [1] frutas [2] verduras [3] legumes [4] carne branca [5] carne vermelha [6] fibras ...|_|
 48- Bebidas
 [1] chá [2] café [3] coca cola [4] refrigerantes [5] _____|_|

V - Dados Clínicos

- 49 – localização da lesão
 [1] lábio [2] mucosa labial [3] muc jugal [4] palato [5] língua [6] assoalho [7] rebordo alveolar [8] sem lesão [9] outra _____|_|
 50 - Tipo de tumor (AP) _____|_|
 51 - Localização (CID) _____|_|
 52 - Estadiamento _____|_|
 53 - Sequência de Tratamento Cirurgia [1] Qt [2] Rxt [3]|_|

VI – Resultados

Data	Localização	Frequência micronúcleo
	Lesão	
	Contra lateral	
	Área próxima	
	Controle	

Anexo 2: características individuais da população

Indivíduo	Grupos	Local lesão	Sexo	Idade	Cor da pele	Doenças crônicas	Etilismo	Ex-etilista	Tabagismo	Ex-tabagista	Ca na família
C1	controle	Pool	F	56	B	Hipertensão, hiperlipdemia	N	N	N	S	S
320	controle	Pool	F	56	NB	hipertensão, diabetes tipo 2	N	N	N	N	S
C3	controle	Pool	F	72	B	hipertensão	N	N	N	N	S
C5M	controle	Pool	F	47	B	-	N	N	N	N	S
324	controle	Pool	F	56	B	diabetes tipo 2, hipertensão	N	N	N	N	N
CD6	controle	Pool	F	51	B	deslipdemia	N	N	N	N	N
323	controle	Pool	F	69	NB	hipertensão	N	N	N	N	N
C11	controle	Pool	F	59	B	hipertensão	N	N	N	N	S
C10	controle	Pool	F	59	B	hipertensão	N	N	N	N	S
317-2	controle	Pool	F	80	B	-	N	N	N	N	N
311	controle	Pool	F	51	B	-	N	N	N	N	N
308	controle	Pool	F	44	B	-	N	N	N	N	S
C7	controle	Pool	F	58	B	hipertensão	N	N	N	N	S
307	controle	Pool	F	59	B	-	N	N	N	N	S
C20	controle	Pool	M	53	B	-	S	N	S	N	S
C21	controle	Pool	M	62	B	hipertensão	S	N	S	N	S
C22	controle	Pool	M	70	B	hipertensão	S	N	S	N	N
322	controle	Pool	M	28	B	-	N	N	N	N	S
C16	controle	Pool	M	24	B	-	N	N	N	N	S
325-2	controle	Pool	M	51	B	Diabetes tipo 2	N	N	N	N	S
305	controle	Pool	M	45	B	-	N	N	N	N	S
316	controle	Pool	M	24	B	hipertensão	S	N	N	N	S

318	controle	Pool	M	62	NB	S	hipertensão	N	S	N	N	N
C2	controle	Pool	M	60	B	S	Hiperplasia prostática	S	N	N	N	S
302	controle	Pool	M	26	B	N	-	N	N	N	N	S
319-2	controle	Pool	M	32	B	N	-	N	N	N	S	N
C8	controle	Pool	M	64	B	S	diabetes tipo 2	N	N	N	N	S
							diabetes tipo 2, hipertensão, depressão	N	N	N	N	S
116	leucoplasia	Língua	F	70	B	S	depressão	N	N	N	N	N
109	leucoplasia	assoalho	F	55	B	S	depressão	N	S	N	S	N
105	leucoplasia	Língua	F	64	B	N	-	N	N	N	N	S
145	leucoplasia	mucosa jugal	F	61	B	S	diabetes tipo 2	N	N	S	N	S
103	leucoplasia	mucosa jugal	M	47	B	N	-	N	N	N	S	S
110	leucoplasia	rebordo alv.	M	49	NB	N	-	N	N	S	N	N
108	leucoplasia	muc labial	M	47	B	S	hipertensão	S	N	N	N	S
212	leucoplasia	Língua	F	54	B	S	hipotireoidismo	N	N	N	S	N
100	leucoplasia	Língua	M	49	B	S	polineuropatia	N	S	N	N	S
106	leucoplasia	Língua	M	25	B	N	-	S	N	N	N	N
101	líquen plano	mucosa jugal	F	62	NB	S	-	N	N	S	N	S
200	líquen plano	rebordo alveolar	F	79	B	N	-	N	N	N	N	N
210	líquen plano	mucosa jugal	F	55	NB	S	depressão	N	N	N	S	N
216	líquen plano	assoalho	F	67	B	S	hipotireoidismo	N	N	N	S	S
202	líquen plano	mucosa jugal	F	67	B	S	-	N	N	N	N	N
205	líquen plano	mucosa jugal	F	82	B	N	-	N	N	N	N	S
248	líquen plano	mucosa jugal	F	56	B	S	hipotieoidismo, hipertensão, artrite	N	N	N	N	N
249	líquen plano	mucosa labial	F	44	B	N	-	N	N	N	N	S
247	líquen plano	mucosa jugal, assoalho	F	58	B	S	hipertensão, epilepsia, reumatismo	N	N	N	N	N
204	líquen plano	muc jugal	F	50	B	S	hipertensão	N	N	N	S	S
208	líquen plano	Língua	F	48	B	S	epilepsia	N	N	N	S	S
203	líquen plano	mucosa jugal	M	74	B	S	hipertensão	N	S	N	S	S
213	líquen plano	Palato	M	31	B	N	-	N	N	N	N	S
209	líquen plano	mucosa jugal	M	25	B	N	-	N	N	N	N	N
201	líquen plano	Língua	M	45	B	S	-	N	S	N	S	N
207	líquen plano	mucosa jugal	M	47	B	N	-	N	N	S	N	N

402	câncer	assoalho	M	71	B	S	hipertensão	N	N	S	N	N
403	câncer	assoalho	M	67	B	S	hipertensão	S	N	S	N	N
405	câncer	Língua	M	64	B	S	Insuficiência renal	N	N	S	N	N
410	câncer	Palato	M	66	B	S	hipertensão	N	N	N	N	N
408	câncer	palato,língua	M	62	B	S	hipertensão	N	S	N	S	N
404	câncer	assoalho	M	52	B	N	-	N	N	S	N	S
406	câncer	Língua	M	64	B	N	-	S	N	S	N	N
411	câncer	rebordo alveolar	M	36	B	S	-	N	N	S	N	N
412	câncer	Língua	M	71	B	N	-	N	N	S	N	N
418	câncer	Língua	M	62	B	N	-	S	N	S	N	S
413	câncer	rebordo alveolar	F	54	B	S	Dor crónica	N	N	S	N	N
409	câncer	Língua	M	62	B	N	-	S	N	S	N	S
407	câncer	Língua	M	61	B	S	hipertensão	S	N	S	N	S
417	câncer	rebordo alveolar	M	68	B	N	-	N	S	S	N	S
414	câncer	assoalho	M	67	B	N	-	S	N	S	N	N

S- sim; N- não; B- branco; NB- não branco; F- feminino; M- masculino

Tabagista: aquele que fuma pelo menos um cigarro por dia; Ex-Tabagista: 1 ano sem fumar;

Etilista: aquele que consome pelo menos um copo de bebida (fermentada ou destilada por dia; Ex-etilista: que parou de beber, pelo menos, há um ano.

Anexo 3 : Dados individuais brutos da análise

Indivíduos	Grupo	Local	Broto	MN	Total	Basal	Dif.	BN	Pic	CC	CRX	CRL	Total
C1	Controle	Pool	0	0	2000	32	968	4	48	44	6	16	1000
320	Controle	Pool	0	0	2000	61	939	1	19	19	0	74	1000
C3	Controle	Pool	2	1	2000	33	967	1	33	12	2	21	1000
C5M	Controle	Pool	2	0	2000	26	974	1	37	21	1	45	1000
324	Controle	Pool	0	0	2000	75	925	0	18	6	0	39	1000
CD6	Controle	Pool	0	0	2000	32	968	0	61	15	0	56	1000
323	Controle	Pool	0	0	2000	40	960	0	12	21	5	4	1000
C11	Controle	Pool	0	0	2000	44	956	0	65	15	0	59	1000
C10	Controle	Pool	0	0	2000	96	904	5	73	10	3	13	1000
317-2	Controle	Pool	0	0	2000	110	890	0	47	12	11	43	1000
311	Controle	Pool	0	1	2000	35	965	1	70	7	2	12	1000
308	Controle	Pool	0	0	2000	82	918	1	50	2	0	3	1000
C7	Controle	Pool	0	1	2000	25	975	5	12	0	0	15	1000
307	Controle	Pool	0	0	2000	107	893	0	58	4	1	33	1000
C20	Controle	Pool	0	1	2000	28	972	9	16	1	0	75	1000
C21	Controle	Pool	0	0	2000	19	981	1	24	4	3	9	1000
C22	Controle	Pool	0	0	2000	24	976	6	9	3	0	60	1000
322	Controle	Pool	0	0	2000	64	936	0	71	15	1	98	1000
C16	Controle	Pool	0	0	2000	15	985	0	67	2	1	220	1000
325-2	Controle	Pool	0	0	2000	58	942	0	48	1	0	43	1000
305	Controle	Pool	5	0	2000	31	969	2	75	3	0	96	1000
316	Controle	Pool	0	2	2000	96	904	1	51	6	1	32	1000
318	Controle	Pool	0	0	2000	88	912	3	14	19	2	17	1000
C2	Controle	Pool	0	0	2000	13	987	3	72	25	2	69	1000
302	Controle	Pool	0	0	2000	113	887	2	89	17	2	31	1000
319-2	Controle	Pool	0	0	2000	52	948	1	66	4	0	19	1000
C8	Controle	Pool	1	0	2000	81	919	4	78	10	14	113	1000
116	Leucoplasia	A	0	0	2000	87	913	0	54	4	0	2	1000
109	Leucoplasia	A	11	1	2000	33	967	0	58	73	14	70	1000
105	Leucoplasia	A	0	1	2000	5	995	9	24	1	1	13	1000
145	Leucoplasia	A	5	2	2000	2	998	0	127	73	7	126	1000
103	Leucoplasia	A	1	1	2000	117	883	1	123	49	1	37	1000
110	Leucoplasia	A	0	3	2000	49	951	5	43	16	19	164	1000
108	Leucoplasia	A	0	0	2000	76	924	0	82	32	10	158	1000
212	Leucoplasia	A	0	0	2000	79	921	1	69	11	1	110	1000
100	Leucoplasia	A	1	1	2000	9	991	1	5	7	1	13	1000
106	Leucoplasia	A	1	5	2000	8	992	8	33	28	11	10	1000
116	Leucoplasia	B	0	0	1622	78	922	1	85	4	0	14	1000
109	Leucoplasia	B	8	0	2000	47	953	5	155	58	2	22	1000
105	Leucoplasia	B	0	0	2000	64	936	1	52	2	0	10	1000
145	Leucoplasia	B	4	0	2000	105	895	1	37	20	4	105	1000
103	Leucoplasia	B	0	1	2000	71	929	4	53	15	2	16	1000
110	Leucoplasia	B	0	0	2000	54	946	13	23	9	8	93	1000
108	Leucoplasia	B	0	0	2000	76	924	4	32	28	4	240	1000
212	Leucoplasia	B	0	0	2000	116	884	0	29	4	3	57	1000
100	Leucoplasia	B	0	2	2000	96	904	1	69	4	2	10	1000
106	Leucoplasia	B	15	0	2000	2	998	6	77	119	18	18	1000
116	Leucoplasia	C	0	0	461	39	461	0	17	2	1	17	500
109	Leucoplasia	C	30	5	2000	12	988	5	107	101	3	3	1000
105	Leucoplasia	C	0	0	2000	64	936	2	38	8	0	55	1000

145	Leucoplasia	C	0	3	2000	46	954	1	104	44	3	102	1000
103	Leucoplasia	C	0	0	2000	36	964	6	48	12	1	61	1000
110	Leucoplasia	C	6	4	2000	58	942	18	89	9	13	89	1000
108	Leucoplasia	C	0	0	2000	33	967	0	99	32	9	166	1000
212	Leucoplasia	C	0	1	2000	96	904	2	28	4	1	75	1000
100	Leucoplasia	C	0	2	2000	39	961	0	36	6	0	8	1000
101	Líquén Plano	A	0	0	2000	83	917	0	44	32	3	115	1000
200	Líquén Plano	A	15	4	2000	8	992	1	27	15	3	46	1000
210	Líquén Plano	A	1	0	2000	90	910	2	49	27	4	18	1000
216	Líquén Plano	A	0	0	2000	29	971	0	32	4	1	35	1000
202	Líquén Plano	A	2	2	2000	46	954	3	46	39	9	2	1000
205	Líquén Plano	A	2	2	2000	2	998	6	13	7	8	52	1000
248	Líquén Plano	A	1	2	2000	12	988	10	47	38	0	16	1000
249	Líquén Plano	A	13	1	2000	23	977	0	113	16	10	56	1000
247	Líquén Plano	A	0	0	2000	56	944	0	77	36	8	40	1000
204	Líquén Plano	A	0	0	2000	41	959	5	36	2	0	111	1000
208	Líquén Plano	A	0	1	2000	110	890	5	27	13	8	31	1000
203	Líquén Plano	A	1	0	2000	47	953	1	72	7	9	85	1000
213	Líquén Plano	A	0	0	971	29	971	1	36	13	0	98	1000
209	Líquén Plano	A	0	0	2000	68	932	0	28	15	6	60	1000
201	Líquén Plano	A	6	1	2000	16	984	3	136	101	22	47	1000
207	Líquén Plano	A	0	1	2000	15	985	3	7	18	0	28	1000
101	Líquén Plano	B	0	0	2000	26	974	3	31	29	6	42	1000
200	Líquén Plano	B	1	1	2000	51	949	0	41	17	1	65	1000
210	Líquén Plano	B	0	0	2000	57	943	7	38	5	5	26	1000
216	Líquén Plano	B	0	0	2000	89	911	5	29	27	0	34	1000
202	Líquén Plano	B	0	0	2000	72	928	0	26	5	23	0	1000
205	Líquén Plano	B	2	0	2000	10	990	0	46	14	5	54	1000
248	Líquén Plano	B	5	0	2000	10	990	1	67	17	1	35	1000
249	Líquén Plano	B	5	0	2000	25	975	5	109	7	0	24	1000
247	Líquén Plano	B	3	0	2000	20	980	0	69	17	2	9	1000
204	Líquén Plano	B	0	0	2000	120	880	0	6	28	4	136	1000
208	Líquén Plano	B	0	0	2000	82	918	2	24	2	2	38	1000
203	Líquén Plano	B	0	0	2000	3	997	3	71	0	0	138	1000
213	Líquén Plano	B	0	0	508	58	508	0	29	2	0	65	566
209	Líquén Plano	B	1	0	2000	160	840	5	37	9	0	84	1000
201	Líquén Plano	B	6	1	2000	19	981	7	85	70	28	30	1000
207	Líquén Plano	B	0	0	2000	43	957	7	22	17	1	9	1000
101	Líquén Plano	C	0	0	2000	64	936	3	26	17	2	88	1000
200	Líquén Plano	C	1	1	2000	18	982	1	2	2	0	4	1000
210	Líquén Plano	C	0	0	2000	27	973	0	32	3	0	6	1000
216	Líquén Plano	C	0	2	2000	43	957	5	16	9	0	18	1000
202	Líquén Plano	C	0	0	2000	71	929	2	47	37	1	8	1000
205	Líquén Plano	C	1	0	2000	57	943	0	20	11	0	16	1000
248	Líquén Plano	C	0	0	2000	46	954	1	24	8	3	109	1000
249	Líquén Plano	C	1	0	2000	37	963	0	116	39	3	21	1000
247	Líquén Plano	C	0	0	2000	38	962	1	99	35	4	8	1000
204	Líquén Plano	C	0	0	2000	80	920	4	42	2	2	14	1000
208	Líquén Plano	C	0	1	2000	54	946	3	38	27	5	27	1000
203	Líquén Plano	C	1	0	2000	4	996	3	46	9	0	78	1000
213	Líquén Plano	C	1	0	569	13	569	1	33	15	6	156	582
209	Líquén Plano	C	0	0	2000	40	960	3	53	0	3	38	1000

201	Líquên Plano	C	7	2	2000	53	947	1	23	17	2	8	1000
207	Líquên Plano	C	0	0	2000	66	934	6	20	13	0	16	1000
402	Carcinoma	A	2	2	2000	3	997	1	90	36	4	47	1000
403	Carcinoma	A	3	3	2000	96	904	1	85	18	4	116	1000
405	Carcinoma	A	0	0	2000	96	904	1	77	42	20	82	1000
410	Carcinoma	A	0	0	2000	30	970	0	19	41	91	99	1000
408	Carcinoma	A	1	1	2000	150	850	0	28	22	1	18	1000
404	Carcinoma	A	1	1	2000	74	926	0	45	22	2	60	1000
406	Carcinoma	A	0	0	2000	60	940	5	87	38	5	68	1000
411	Carcinoma	A	0	1	2000	270	730	2	80	6	1	69	1000
412	Carcinoma	A	0	0	2000	307	693	0	29	87	3	57	1000
418	Carcinoma	A	0	0	2000	89	911	0	24	21	2	57	1000
413	Carcinoma	A	1	0	2000	58	942	8	23	10	3	79	1000
409	Carcinoma	A	0	0	2000	128	872	2	12	16	1	206	1000
407	Carcinoma	A	0	0	2000	91	909	2	85	7	5	75	1000
417	Carcinoma	A	0	2	2000	85	915	4	20	24	41	229	1000
414	Carcinoma	A	0	0	2000	60	940	6	22	4	9	109	1000
403	Carcinoma	B	2	0	2000	22	978	1	66	26	4	53	1000
405	Carcinoma	B	0	1	2000	80	920	0	36	18	1	116	1000
410	Carcinoma	B	0	4	2000	37	963	1	12	14	39	102	1000
408	Carcinoma	B	0	0	2000	182	818	3	16	22	1	12	1000
404	Carcinoma	B	0	0	2000	115	885	0	59	11	0	29	1000
406	Carcinoma	B	0	0	2000	8	992	3	82	31	0	60	1000
411	Carcinoma	B	0	0	2000	130	870	0	48	11	5	99	1000
412	Carcinoma	B	0	0	2000	60	940	2	30	28	1	90	1000
418	Carcinoma	B	0	1	2000	91	909	3	18	15	3	31	1000
413	Carcinoma	B	0	1	2000	36	964	9	25	11	2	148	1000
409	Carcinoma	B	0	0	2000	107	893	3	11	15	1	276	1000
407	Carcinoma	B	0	0	2000	38	962	0	19	54	0	86	1000
417	Carcinoma	B	0	0	2000	125	875	8	50	48	5	108	1000
414	Carcinoma	B	0	0	2000	46	954	1	27	8	2	15	1000
403	Carcinoma	C	2	0	2000	14	986	2	118	36	7	27	1000
405	Carcinoma	C	0	1	2000	95	905	6	44	48	5	17	1000
410	Carcinoma	C	0	0	2000	42	958	0	8	46	13	8	1000
408	Carcinoma	C	0	1	2000	249	751	0	37	32	4	15	1000
404	Carcinoma	C	7	10	2000	62	938	3	27	13	1	5	1000
406	Carcinoma	C	0	0	2000	12	988	5	36	4	0	56	1000
411	Carcinoma	C	0	1	2000	149	851	3	43	65	5	83	1000
412	Carcinoma	C	0	0	2000	92	908	0	29	21	0	31	1000
418	Carcinoma	C	0	0	2000	26	974	2	19	8	1	20	1000
413	Carcinoma	C	0	0	2000	80	920	1	26	1	0	163	1000
409	Carcinoma	C	0	0	2000	40	960	4	10	8	2	230	1000
407	Carcinoma	C	0	0	2000	46	954	1	27	12	0	300	1000
417	Carcinoma	C	1	0	2000	11	989	1	18	1	0	35	1000
414	Carcinoma	C	0	0	2000	53	947	3	23	6	1	33	1000

Pool – amostra das mucosas jugais direita e esquerda; Grupo – controle ou alguma das doenças do estudo; Local- área de coleta da amostra; Broto – broto nuclear; MN- células micronucleadas; Basal - células basais; Dif. células diferenciadas; BN- células binucleadas; Pic- picnose; CC- cromatina condensada; CRX – cariorréxe; CRL- cariólise