

LEONORA MACIEL DE SOUZA VIANNA

**APLICABILIDADE DO SISTEMA DE BETHESDA NO DIAGNÓSTICO DAS
LESÕES ESCAMOSAS ORAIS E IMPORTÂNCIA DO PAPILOMAVÍRUS NA
GÊNESE DESSAS LESÕES**

BRASÍLIA

2008

LEONORA MACIEL DE SOUZA VIANNA

**APLICABILIDADE DE SISTEMA DE BETHESDA NO DIAGNÓSTICO DAS
LESÕES ESCAMOSAS ORAIS E IMPORTÂNCIA DO PAPILOMAVÍRUS NA
GÊNESE DESSAS LESÕES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador : Prof. Dr. Mário Augusto Pinto de Moraes
Co-orientadora: Prof. Dra. Nilce Santos de Melo

BRASÍLIA

2008

Dedicatória

Para meu pai, *in memoriam*, José Maciel por ter acreditado sempre em mim.

Para minha mãe, Ana por sua dedicação.

Para João Nildo e nossos filhos Nahima, Leonardo e Gabriel pela compreensão e carinho.

Agradecimentos

Ao Prof. Mario Augusto Pinto de Moraes por ter aceito orientar esse trabalho e pelos ensinamentos éticos e profissionais que nos tem passado nesses anos de trabalho.

À Profa. Nilce Santos de Melo pela co-orientação, dedicação, competência, disponibilidade e palavras de incentivo demonstrados em todos os momentos.

Aos colegas do centro de Anatomia Patológica pelo carinho e compreensão, em particular à Dra Fabiana Pirani Cardoso e ao Dr Alexandre Cavalca Tavares, sempre solícitos no momento de discutir as conclusões diagnósticas mais complicadas.

Aos técnicos do Centro de Anatomia Patológica, em particular à técnica de citologia Tércia Maria Mendes L. de Castro que executou a maioria das colorações das lâminas desse trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Ambulatório de Estomatologia, em particular a professora Eliete Neves da Silva, por todo o auxílio que nos deram durante a realização desse trabalho.

Aos pacientes que permitiram a realização desse trabalho, pela com paciência, e confiança em nós depositada.

Ao Hospital Universitário de Brasília, em particular ao Centro de Anatomia Patológica e a Divisão de Odontologia, locais onde foi realizado esse trabalho

Ao Laboratório TECNOGENE, diagnósticos moleculares Ltda, em particular ao Dr. Nivaldo Pereira Alves que executou a análise molecular desse trabalho.

A Fundação de Auxílio a Pesquisa do Distrito Federal pelo apoio financeiro à essa pesquisa.

***“Sou escravo de quem não imaginar, a cada estágio, que
sua viagem terminou.
O viajante precisa deixar muitos caravancharás para trás, até
chegar a seu destino”.***
(Masnaví, Jalaluddin Rumi)

Resumo

A citologia esfoliativa é uma ferramenta diagnóstica importante, que pode ser de grande auxílio no diagnóstico das lesões neoplásicas, infecciosas e bolhosas que acometem a cavidade bucal. O sistema de Bethesda é um sistema de classificação que permite uma excelente interação entre o clínico e o patologista na análise dos esfregaços citopatológicos cérvicovaginais, decorrentes de lesões neoplásicas e virais causadas pelo papilomavírus. O objetivo desse trabalho foi o de utilizar o sistema de Bethesda na caracterização morfológica dos esfregaços citológicos de lesões escamosas que ocorrem na cavidade bucal avaliando a possibilidade de participação do papilomavírus na etiologia das mesmas. A amostra foi proveniente de 41 pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do HUB, que foram selecionados por apresentarem lesões clinicamente suspeitas de malignidade, lesões benignas de provável etiologia viral e por estarem em acompanhamento após tratamento de câncer oral. A biópsia cirúrgica com finalidade diagnóstica comparativa foi realizada em 28 pacientes. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisar papilomavírus (HPV) foi feita em 26 pacientes. A análise comparativa entre o diagnóstico citológico utilizando os critérios de Bethesda e o histológico mostrou que houve concordância entre os mesmos. Quando foi feita a comparação entre os achados morfológicos resultantes do efeito citopático decorrente da ação viral nas células e o resultado da reação em cadeia da polimerase, não houve correlação entre os mesmos. A citologia esfoliativa foi considerada uma ferramenta útil no diagnóstico das lesões escamosas orais, porém a biópsia será sempre necessária para confirmar o diagnóstico em casos suspeitos de malignidade. As alterações citoarquiteturais causadas pelo papilomavírus nas células escamosas da cavidade bucal não são exuberantes o suficiente para permitir o diagnóstico etiológico, sendo necessária a reação em cadeia da polimerase para detectar a presença do vírus nas células.

Abstract

The exfoliative cytology is an important diagnostic tool, that can give a great aid in the diagnosis of neoplasms, infectious and blistered lesions that attack the buccal cavity. The system of Bethesda is a classification's system that allows an excellent interaction between the doctor and the pathologist in the analysis of cytopathologic cervicovaginal smears, resulting from neoplasms and viral lesions, caused by the papillomavirus. The objective of this work was to verify the applicability of the Bethesda's System in the morphologic characterization of the cytological smears of squamous lesions that can happen in the oral cavity, evaluating the possibility of participation of the papillomavirus in the aetiology in the same ones. The sample was originated from 41 patients assisted in the stomatologic's service of HUB that were selected for present the lesions clinically malignancy suspicious, benign lesions of probable viral's aetiology or because they were in attendance after treatment of oral cancer. The chain reaction of the polimerase (PCR) to research papillomavirus (HPV) was made in 26 patient. The comparative analysis among the cytological diagnosis using the Bethesda's criterions and the histological showed that there was agreement among the same ones. When it was made the comparison among the morphologic discoveries resultants of the citopatic effect due the viral action in the cells and the result of the chain reaction of the polimerase, there was not correlation among the same ones. The exfoliative cytology was considered an usual tool in the diagnosis of the oral squamous lesions, however, the biopsy was utility always necessary to confirm the diagnosis in malignancy suspicious cases. The alterations cytoarchitecturals caused by the papillomavirus in the squamous cells of the oral cavity are not exuberant enough to allow the etiologic diagnosis, being necessary the chain reaction of the polimerase to detect the presence of the virus in the cells.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estimativa para 2008 dos tipos de câncer com maior incidência na população brasileira de acordo com o gênero.....	18
Figura 2 - Coleta do material para exame citológico.....	66
Figura 3 – Distribuição das lesões em relação ao gênero.....	67
Figura 4 - Células com alterações de malignidade.....	82
Figura 5 - Paraceratose atípica.....	83
Figura 6 - Carcinoma de células escamosas ceratinizante.....	83
Figura 7 - Carcinoma de células escamosas não ceratinizante.....	84
Figura 8 - Células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau.....	84
Figura 9 - Células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau.....	85
Figura 10 - Lesão intra-epitelial de alto grau.....	85
Figura 11 - Alterações reativas associadas a radiação.....	86
Figura 12– Coilócito.....	86
Figura 13 - Esboço de coilocitose.....	87
Figura 14 - Esboço de coilocitose.....	87
Figura 15 - Perfil eletroforético do DNA de HPV 18, amplificado com os iniciadores MY09/MY11.....	88
Figura 16- Falso negativo.....	108
Figura 17 - Falso positivo.....	108
Figura 18 - Falso positivo.....	109

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Primeiras classificações citológicas propostas para as lesões escamosas orais.....	37
Tabela 2 – Sistema de Bethesda.....	41
Tabela 3 – Tabela de contingência correlacionando os diagnóstico citológicos e histológicos.....	64
Tabela 4 - Tabela de contingência correlacionando os achados morfológicos causados pelo HPV com a PCR.....	65
Tabela 5 – Distribuição das lesões em relação a freqüência do intervalo de idades.....	68
Tabela 6 – Distribuição das lesões em relação a localização na cavidade bucal.....	68
Tabela 7 – Todos os dados coletados durante a pesquisa.....	69
Tabela 8 – Correlação entre o tabagismo, etilismo e gênero.....	70
Tabela 9 – Diagnósticos citológicos das lesões, realizados em todos os pacientes.....	72
Tabela 10 – Diagnósticos histológicos das lesões, realizados em todos os pacientes.....	74
Tabela 11 – Diagnósticos citológicos das lesões primárias.....	75
Tabela 12 – Diagnósticos histológicos das lesões primárias.....	75
Tabela 13 – Correlação entre os diagnósticos histológicos (BIÓPSIAS) e citológicos.....	77
Tabela 14 – Diagnósticos citológicos das lesões secundárias.....	78
Tabela 15 - Análise da acuidade entre o diagnóstico citológico (CITOLOGIA) e histológico (BIÓPSIA).....	91
Tabela 16 – Correlação entre o diagnóstico citológico e reação em cadeia da polimerase.....	92
Tabela 17 – Relação de casos da literatura em que o diagnóstico de câncer foi feito pelo exame citológico.....	104
Tabela 18 – Associação entre líquen plano oral e carcinoma escamoso oral.....	115

Lista de abreviaturas e siglas

NIML - Negativa para lesões epiteliais e malignidade

SIL - Lesão intra-epitelial escamosa

LSIL - Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

HSIL - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

CEC - Carcinoma de células escamosas

ASC - Células escamosas atípicas

ASCUS - Células escamosas atípicas de significado indeterminado

ASC-H - Células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau

ASC-US - Células escamosas atípicas de significado indeterminado

HPV - Papilomavírus

PCR - Reação em cadeia da polimerase

NIO I - Neoplasia intra-epitelial oral de grau I

NIO III - Neoplasia intra-epitelial oral de grau III

DNA - Ácido desoxirribonucléico

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Incidência do câncer bucal.....	16
2.2. Etiologia.....	18
2.3. Métodos de exploração diagnóstica.....	26
2.3.1. Exame Clínico.....	26
2.3.2. Localização da Lesão.....	27
2.3.3. Modos de Coleta.....	29
2.4. Aspectos anatomopatológicos das lesões escamosas orais.....	30
2.4.1. Lesões Benignas.....	30
2.4.2. Lesões Malignas.....	32
2.4.3. Citologia Esfoliativa.....	33
2.4.3.1. As classificações citológicas	36
2.4.4. Técnicas de Exploração Diagnóstica.....	42
2.5. Dificuldades na análise do esfregaço em pacientes em acompanhamento pós-cirúrgico.....	46
3. PROPOSIÇÃO.....	48
3.1. Objetivo geral.....	48
3.2. Objetivos específicos.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. Pacientes.....	50
4.2. Critérios de inclusão.....	50
4.3. Critérios de exclusão.....	51
4.4. Citologia esfoliativa.....	51
4.5. Análise citológica.....	52
4.5.1. Lesões de Caráter Reativo.....	53
4.5.2. Lesões de Caráter Neoplásico.....	55
4.5.3. Atipias de Células Escamosas.....	57
4.6. Análise histológica.....	57
4.7. Análise molecular.....	58
4.7.1. Amostras clínicas.....	58
4.7.2. Extração do DNA.....	58
4.7.3. Amplificação do DNA através da técnica de PCR.....	59
4.7.4. Considerações Finais.....	60
4.8. Testes aplicados para avaliar o diagnóstico.....	61
5. RESULTADOS.....	67
5.1. Caracterização da amostra.....	67
5.2. Análise dos resultados.....	70
5.2.1. Diagnósticos Citológicos e Histológicos.....	70
5.2.1.1. Diagnósticos citológicos.....	70
5.2.1.2. Diagnósticos histológicos.....	73
5.2.2. Lesões Primárias.....	74
5.2.2.1. Análise dos resultados.....	74

5.2.2.2. Correlação entre a citologia e a biópsia.....	76
5.2.3. Lesões Secundárias.....	78
5.2.3.1. Análise dos resultados.....	78
5.3. Achados morfológicos.....	79
5.4. Correlação entre as alterações morfológicas e a presença de HPV.....	81
5.5. Estimativa de validade.....	89
5.5.1. Correlação entre os diagnósticos histológicos e citológicos.....	89
5.5.2. Correlação entre os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os achados de alterações citopáticas causadas pelo HPV no exame citológico.....	91
6. DISCUSSÃO.....	94
6.1. Considerações gerais.....	94
6.2. O diagnóstico citológico oral – critérios de Bethesda.....	96
6.3. O HPV e o câncer oral.....	100
6.4. Acuidade do estudo citológico na avaliação das lesões escamosas orais.....	103
6.5. Relação HPV/câncer.....	110
6.6. Líquen plano e o câncer oral.....	113
7. CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	119

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é sede freqüente de lesões infecciosas, inflamatórias, tumorais ou pseudotumorais originárias da mucosa de revestimento, das partes moles, das glândulas salivares ou do tecido ósseo, as quais necessitam de uma exploração especial por parte do estomatologista. O método diagnóstico convencional dessas lesões é o exame clínico, e quando necessário, complementado pelo estudo histopatológico do material obtido por biópsia cirúrgica. As desvantagens da biópsia cirúrgica são que a coleta do fragmento implica em atuação cruenta, na qual se necessita anestésiar o paciente para retirada do tecido, associados ao fato de que a coleta é feita em uma determinada área da lesão, o que limita a amostra, podendo o fragmento não ser representativo. Portanto, a biópsia cirúrgica é um exame agressivo, oneroso e que ocasionalmente pode não ser preciso. Outro método que pode permitir o diagnóstico das lesões bucais é a citologia esfoliativa, na qual vão ser examinadas as células esfoliadas da lesão. A vantagem do exame citológico é ser ele menos agressivo, menos oneroso e permitir uma amostragem mais ampla da lesão. A citologia esfoliativa não substitui a biópsia, porém pode auxiliar no diagnóstico de lesões orais superficiais, sejam elas decorrentes de neoplasias, doenças virais, doenças vesículo-bolhosas, infecções fúngicas ou alérgicas (Rickles, 1972).

As lesões malignas bucais representam um desafio para os profissionais de saúde por não apresentarem um aumento das taxas de sobrevida, apesar dos avanços tecnológicos. Esse aumento da sobrevida está diretamente ligado ao diagnóstico precoce, que nem sempre é feito. O diagnóstico continua a ser

tardio, o tratamento mutilador, há alta recorrência loco-regional e, em alguns casos, uma tendência maior ao aparecimento de um segundo tumor primário. Adicionalmente, um outro desafio que se apresenta é o de compreender porque há o aparecimento de tumores de boca em pacientes não expostos aos fatores de risco tradicionalmente reconhecidos. Nesses casos pode-se caracterizar um subgrupo para o qual há sugestiva evidência de que a carcinogênese é possivelmente diferente e que outro fator tumorigênico pode ser relevante, como o papilomavírus (HPV). Nesse grupo o tumor parece ter um comportamento agressivo, mais metastisante que os tumores ligados etiologicamente ao uso do tabaco e do álcool. Além disso, parece ser um grupo diferente, composto por indivíduos mais velhos, do gênero feminino e que apresentam um maior índice de recidiva (Farshadpour, 2007).

Embora diferentes no comportamento, clinicamente são lesões semelhantes, motivo pelo qual o diagnóstico da presença ou não do HPV nessas lesões de boca se faz necessário, da mesma forma como é feito no exame preventivo de câncer de colo de útero.

Uma forma simples de detectar não somente a lesão neoplásica como também de pesquisar uma possível causa ligada ao HPV é utilizar a citologia esfoliativa como meio de prevenção. Da mesma forma como é utilizado na área ginecológica, o exame citológico das lesões bucais poderá detectar as alterações do revestimento epitelial escamoso visando (Umiker, 1960):

- Diagnosticar precocemente lesões pré-malignas ou malignas
- Diagnosticar de rotina as lesões suspeitas
- Manter em acompanhamento paciente com lesões suspeitas
- Avaliar a radiosensibilidade de lesões em tratamento
- Diagnosticar tumores residuais ou recidivantes

- Levantar a hipótese de uma etiologia viral, ligada ao HPV.

Ainda estabelecendo um parâmetro comparativo com os exames citológicos cérvicovaginas, os esfregaços citológicos da cavidade oral poderão ser analisados utilizando-se o sistema de Bethesda para classificá-los. Considerando-se que os critérios para caracterizar as lesões escamosas permitem maior interação entre o clínico e o patologista, a utilização dos mesmos na análise das lesões escamosas da cavidade oral permitirá um tratamento e acompanhamento adequado dessas lesões.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Incidência do câncer bucal

Anualmente são diagnosticados cerca de 6,4 milhões de tumores malignos no mundo. O câncer bucal é responsável por 10% desses casos (www.inca.gov.br). As taxas de incidência do carcinoma escamoso oral variam de um país para outro, podendo ocorrer variações nas diferentes regiões de um mesmo país. As variações se devem não somente às diferenças existentes nos hábitos populacionais como também às ações de prevenção e controle do câncer, às formas de tratamento e à assistência terapêutica. O carcinoma escamoso oral representa mais de 90% das lesões neoplásicas da cavidade oral, sendo o tipo histológico de câncer mais comum de cabeça e pescoço no mundo, a sexta causa de malignidade geral e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, com cerca de 300000 novos casos aparecendo a cada ano (Epstein, Zhang, Rosin, 2002; Diniz, 2004).

Os países de alto risco para essas neoplasias são a França, na região do baixo Reno, a Hungria, a Índia, o Brasil e a China, principalmente em Hong Kong (Syrjänen, 2005; www.dep.iarc.fr). Na Tailândia, aproximadamente 30% dos casos aparecem na orofaringe. A Índia tem quase 56.000 novos casos por ano, sendo provavelmente uma das incidências mais altas do mundo (Castro, 2006). Estudos têm mostrado que na Inglaterra e no País de Gales houve um aumento da incidência em pacientes jovens nas últimas três décadas do século passado (Hindle, Dower, Speight, 1996). Em São Paulo parece haver um aumento da proporção de casos de câncer em mulheres idosas, quando comparadas àquelas na primeira e segunda idades (Perussi, 2002).

No Brasil, as neoplasias são consideradas a segunda causa de morte por doença, sobrepujadas somente pelas doenças cardiovasculares, que correspondem a 32,6% (www.inca.gov.br). Dentre as neoplasias, segundo estimativas de incidência feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2008, o câncer oral é considerado o sétimo mais freqüente (Figura 1). Para os próximos anos de 2008/2009 são esperados 466.730 novos casos de câncer em nosso país, dos quais **14.160** acometerão a cavidade oral, 10.380 atingindo o gênero masculino e 3.780 o feminino (www.inca.gov.br). Ainda considerando as estimativas do INCA para Unidades da Federação, o Rio de Janeiro é o estado com a maior incidência, com 19,72 novos casos em homens e 6,26 em mulheres por 100.000 habitantes. Em ordem decrescente as maiores taxas entre os homens estão no sul do Brasil:

- São Paulo: 16,4/100.000
- Paraná: 15,41/100.000
- Rio Grande do Sul: 14,97/100.000

Em ordem decrescente as maiores taxas entre as mulheres estão na região Nordeste:

- Rio Grande do Norte: 5,44/100.000
- Ceará: 4,88/100.000

A taxa de incidência de novos casos prevista para o Distrito Federal para 2008/2009 é:

- Em homens: 9,07/100.000 habitantes
- Em mulheres: 2,76/100.000 habitantes.

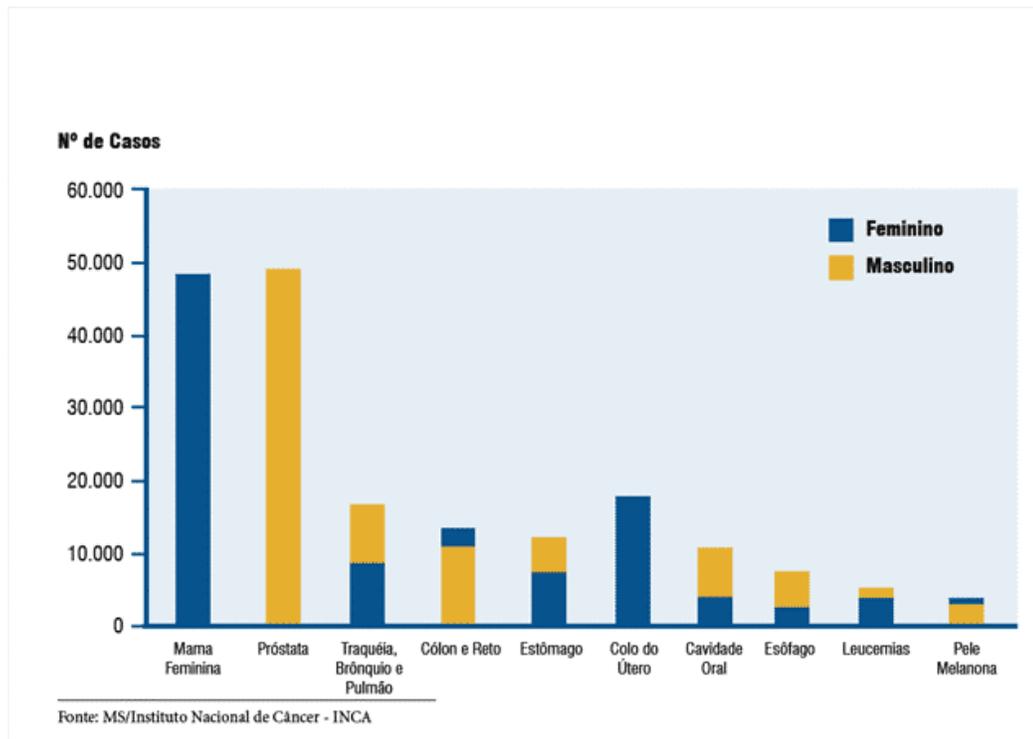


Figura 1 - Estimativa para 2008 dos tipos de câncer com maior incidência na população brasileira de acordo com o gênero.

2.2. Etiologia

A etiologia do câncer oral está fortemente ligada ao consumo do álcool, do tabaco e do bétel, planta originária da Índia, usada para mascar, que entra na mistura do tabaco (Nair, Pillai, 2005). O tabaco é atualmente considerado o mais importante fator de risco para o câncer oral, principalmente o câncer da orofaringe, havendo uma clara relação entre o aumento do risco de câncer, o número de cigarros fumados por dia e o tempo de exposição (Syrjänen, 2005).

O álcool é considerado o segundo fator de risco, sendo de aproximadamente 90% a contribuição sinérgica entre o tabaco e o álcool na etiopatogenia do câncer (Herrero, 2003). Também com relação ao uso do álcool, o aumento do risco de câncer está fortemente relacionado com o aumento do número

de doses e da frequência (Herrero, 2003; Syrjänen, 2005). Há três alvos moleculares que podem sofrer com o efeito do álcool: as proteínas, os lipídeos e o DNA. As substâncias resultantes da ação do álcool sobre as proteínas e os lipídeos vão lesar o DNA das células. O DNA também pode ser danificado pelo efeito direto do álcool sobre o mesmo, resultando em mutações que podem levar à proliferação desordenada das células (Brooks, 1997). Na célula o álcool parece induzir alterações inflamatórias e bioquímicas que atuam de forma sinérgica para lesá-la (Molina, 2002).

Os raios solares têm uma correlação significativa com as lesões malignas do vermelhão dos lábios, as quais apresentam comportamento clínico semelhante aos carcinomas de pele e por isso tem um menor índice de metástase (Brener, 2007).

O líquen plano oral também pode ser considerado como fator de risco para o câncer. O líquen plano bucal é uma lesão mucocutânea de etiologia desconhecida, para a qual são atribuídos múltiplos fatores na patogênese, tais como mecanismos imunológicos, uso de drogas, características genéticas e infecção por microrganismos como o vírus da hepatite C (Tizeira, Águas, Sano, 2003; Mattsson, Jontell, Holmstrup, 2002; Mignogna, 2001).

A evolução clínica do líquen plano pode ser na forma subaguda ou crônica, acometendo pele, mucosas, folículos pilosos e unhas. Na pele caracteriza-se clinicamente pela presença de pápulas poligonais, púrpuras, pruriginosas, em cuja superfície observam-se linhas brancas finas, semelhantes a um rendilhado, as estrias de Wickham. Na boca o líquen plano pode acometer qualquer local da mucosa oral, porém as lesões mais frequentes são na mucosa jugal, bilateralmente, nas gengivas e na língua. O assoalho da boca é a área menos afetada (Epstein,

2003). O comprometimento da mucosa oral é muito comum, podendo acompanhar ou preceder a lesão cutânea, ou ser a única manifestação da doença, o que acontece habitualmente. A manifestação oral se apresenta em pelo menos seis formas: reticular, papular, em placa, atrófica, erosiva e bolhosa, ocorrendo freqüentemente a forma mista, que resulta da combinação de duas das formas acima (Mignogna, 2001). Tizeira, Águas, Sano, 2003, classificam as lesões da mucosa oral em forma típica, na qual estaria incluído o líquen reticular, que adota a forma dendrítica, papular ou anular e a forma atípica que compreenderia o líquen ampolar, erosivo, atrófico ou ulcerado. As formas típicas acometeriam preferencialmente a região posterior da mucosa jugal, enquanto que as atípicas, principalmente o líquen atrófico, se localizariam na língua. A forma reticular geralmente é assintomática, e se caracteriza clinicamente pela presença de linhas brancas, as estrias de Wickham, que se entrelaçam, ou pápulas que comprometem a região posterior da mucosa da bochecha, bilateralmente, afetando também as bordas laterais e o dorso da língua, gengiva, palato e vermelhão do lábio. A forma erosiva é sintomática, aparecendo como áreas eritematosas, atróficas, com graus variáveis de ulceração.

O líquen plano bucal pode sofrer transformação maligna, em uma média de 2% dos casos, enquanto que nas formas atípicas essa transformação é de 6,51%, sendo as formas ceratóticas, atróficas e erosivas as que mais se malignizam (Epstein, 2003, Tizeira, Águas, Sano, 2003; Mattsson, Jontell, Holmstrup, 2002). A língua e a mucosa jugal são os locais onde a malignização é mais freqüente (Tizeira, Águas, Sano, 2003). O líquen é potencialmente maligno, seja em sua forma pura ou associado ao HPV (Campisi, 2004).

Hoje em dia considera-se haver uma forte associação entre o papilomavirus (HPV) e as lesões escamosas orais malignas ou não, principalmente aquelas que acometem a orofaringe, particularmente as tonsilas palatinas e base da língua e as que aparecem em pacientes que não fumam e não bebem (Miller, White, 1996; Herrero, 2003; Gillison, Shah, 2003). Esses tumores relacionados ao HPV apresentam freqüentemente uma morfologia basalóide, sendo a mutação do p53 menos freqüente entre eles (Gillison, Shah, 2003).

Dentre os primeiros trabalhos relacionando o HPV com o câncer oral há o de Syrjänen, que em 1983, analisando pelo método de imunistoquímica 40 biópsias de pacientes com carcinoma escamoso oral, detectou a presença do antígeno viral em 40% delas. A partir daí, vários outros trabalhos têm sido publicados, mostrando uma íntima associação entre o HPV e o câncer oral e da orofaringe (Terai, 1999; Herrero, 2003; Syrjänen, 2005). Tumores com estágio clínico III e IV têm maior carga viral do que aqueles nos estádios entre zero e um (Herrero, 2003). Admite-se que a transmissão do vírus para a cavidade oral pode ocorrer das seguintes formas: contacto sexual, a partir de verrugas de pele em uma mesma pessoa ou por via materno-fetal. A via materno-fetal pode ser através da placenta, por contaminação do líquido amniótico ou pelas secreções vaginais no canal do parto (Okada, Gonçalves, Giraldo, 2000; Tenti, 1999; Puranem, 1996; Smith, 1991; Sedlacek, 1989).

O vírus pode penetrar na mucosa do hospedeiro através de microlesões, sendo o período de incubação variável (Rosenblatt, 2006; Okada, Gonçalves, Giraldo, 2000; Jacintho, Almeida, Maldonado, 1994). A expressão ativa do mesmo depende de três fatores: a permeabilidade celular, o tipo de vírus e o estado de imunidade do hospedeiro (Okada, Gonçalves, Giraldo, 2000).

Utilizando técnicas de imunoistoquímica, hibridização e reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido demonstrada uma alta prevalência do HPV não somente na mucosa oral normal como também em lesões benignas relacionadas ao vírus, como o papiloma escamoso, o condiloma, a verruga comum, a hiperplasia epitelial e o carcinoma oral (Terai, 1999; Castro, Filho, 2006). Com relação ao câncer oral, a prevalência do DNA do HPV na cavidade oral pode variar de 0 a 100%; admite-se que essa variação se deve à grande diversidade da população estudada, associada a uma variação na topografia, ao tipo do espécime e ao método utilizado para detectar o HPV (Herrero, 2003).

Na cavidade bucal, as tonsilas palatinas são consideradas o principal local para a infecção pelo HPV, onde o íntimo contato do epitélio das criptas com o tecido linfóide na profundidade das mesmas facilita a penetração do vírus (Herrero, 2003; Sirjänen, 2005).

O papel do HPV no câncer de boca é controverso, porém uma vez que ele é visto como o principal agente etiológico do câncer do colo uterino e considerando-se que o revestimento das vias digestivas superiores é semelhante àquele da vagina e do ectocérvice, é perfeitamente explicável que haja uma associação entre o câncer cervical e o oral no que diz respeito à patogênese ligada ao HPV. A fragilidade que ocorre nestas duas mucosas, seja causada pela agressão do álcool, tabaco ou bétel, considerando-se a mucosa oral ou por gestações repetidas ou transformações metaplásicas, como na mucosa vaginal e na da junção escamo-colunar do colo uterino, facilita a penetração do vírus aí existente no estado latente, para atingir as células basais do revestimento e desencadear o processo de proliferação celular (Nair, Pillai, 2005; Molina, 2002; Brooks, 1997). Estudos têm mostrado alta prevalência do HPV 16 tanto no câncer oral quanto no câncer

anogenital (Gillison, Shah, 2003; Smith, 2004; Herrero, 2003). As cepas 16 e 18 do HPV também estão fortemente correlacionadas com o carcinoma epidermóide de colo uterino. Estudo realizado com a técnica de PCR, a partir de material colhido de mucosa oral normal de 37 pacientes com e sem verruga de pele revela a presença de infecção latente por HPV em 81,1% dos espécimes, sendo o HPV 18 encontrado em 86,7% dos casos, o HPV 61 em 60%, o HPV 59 em 23,3%, o HPV 16 em 6,7% e o HPV 6 em 3,3%. Esse estudo mostra que a infecção latente pelo HPV na mucosa oral é freqüente (Terai, 1999).

Os papilomavírus humanos pertencem à família dos papovavírus, têm de 52 a 55nm de diâmetro, são epiteliotrópicos, infectando pele e mucosa, sendo seu genoma feito de 7.200-8.000 pares de bases, com peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Dalton. São vírus pequenos, icosaédricos, constituídos por uma única molécula de DNA de dupla hélice de aproximadamente 8kb, contida numa proteína esférica, o capsídeo, que é composto por 72 capsômeros. O capsídeo é formado por duas proteínas estruturais, L1 e L2, sendo a L2 responsável pela encapsidação do DNA do vírus em capsídeos virais, provocando o aumento da infectividade dos viriões do papilomavírus (Rosenblatt, 2006).

Existem identificadas mais de 120 cepas de HPV, e esse número vem aumentando com o passar do tempo. De acordo com a probabilidade de desenvolver lesões malignas, essas cepas podem ser divididas de acordo com o risco em (Scully, 2005):

- De alto risco: 16 e 18
- De baixo risco: 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66
- De risco intermediário: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

Dentre essas cepas, pelo menos 25 tipos são relacionados com as lesões orais, são as cepas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72, 73b (Syrjänen, 2003).

Os HPVs 16 e 18 são considerados os que mais afetam as mucosas, sendo os tipos com maior prevalência no carcinoma oral (Miller, White, 1996; Gillison, Shah, 2003). As tonsilas palatinas são os órgãos da cabeça e pescoço com maior carga viral (Syrjänen, 2005). O DNA do HPV16 tem maior prevalência nos tumores de tonsila palatina, estando em segundo lugar os carcinomas de orofaringe, variando a incidência de 20 a 90% entre os trabalhos publicados (Syrjänen, 2005). O HPV 18 é o tipo dominante nas infecções latentes ou subclínicas, freqüentes na mucosa oral (Terai, 1999). Essa grande variação pode ser atribuída às técnicas utilizadas para exploração da amostra. (Herrero, 2003; Syrjänen, 2005).

O ciclo de vida produtivo do HPV está diretamente relacionado à diferenciação celular epitelial. Inicialmente o vírus penetra nas células da camada basal do epitélio escamoso, porém essas não permitem a replicação do mesmo, sendo consideradas como não permissivas. Nessas células o genoma do HPV se estabelece como epissomo, aproximadamente 50 cópias por célula, que por sua vez também se replica com o DNA da célula hospedeira. Ao atingirem a camada suprabasal, as células começam a se diferenciar e quando entram na fase S do ciclo celular, ou seja, quando ainda estão logo acima da camada basal, são infectadas pelo vírus. Nesta fase S os vírus amplificam seus genomas em mil cópias por células, permitindo uma reserva de células infectadas, histologicamente indistinguíveis das não infectadas. À medida que se processa a maturação do epitélio, essas células migram para as camadas mais superficiais e vão se tornando permissivas, possibilitando a replicação independente do DNA viral. O efeito

morfológico resultante da atuação do vírus nas células da camada superficial do epitélio é a **coilocitose**, lesão na qual as células passam a apresentar um halo claro perinuclear bem delimitado por um citoplasma denso, oranginofílico e núcleos densos, com a cromatina grosseira (Rosenblatt, 2006; Alvarenga, 2000).

O mecanismo de ação através do qual o HPV contribui para a progressão do tumor se dá principalmente através da ação do E6 e E7, oncoproteínas virais dos HPVs de alto risco, que interagem e inibem a atividade dos componentes críticos do sistema regulador do ciclo celular, promovendo a inativação do gene supressor e a instabilidade genômica. O E7 interage com o pRb e inativa sua proteína celular; em consequência, o fator de transcrição E2F é liberado do complexo pRB-E2F, levando a ativação de vários genes envolvidos na proliferação celular (Rosenblatt, 2006; Dyson, 1989). A proteína E6 vai se ligar ao p53 levando a degradação do mesmo. Assim sendo, o produto dos genes E6 e E7 são essenciais para a imortalização da célula epitelial, sendo a inativação do pRB e do p53, conseqüente a expressão dos oncogenes E6 e E7, o parâmetro molecular crítico que explica a ação do HPV na progressão das lesões intra-epiteliais escamosas e no desenvolvimento do câncer invasivo (Rosenblatt, 2006; Bouda, 2000; Munger, 1989). A presença de anticorpos contra E6 e E7 no soro de pacientes com carcinoma oral de células escamosas é considerado por alguns como indicativo de que houve exposição das células tumorais ao leito vascular gerado pelo tumor ou que houve necrose tumoral, indicando que já se trata de um tumor invasivo (Herrero, 2003; Scully, 2005).

2.3. Metodos de exploração diagnóstica de lesões escamosas suspeitas

2.3.1. Exame Clínico

O exame clínico e os exames complementares são usados com a finalidade de diagnosticar as diversas doenças que afetam a boca, desde aquelas que são próprias dos tecidos bucais e odontogênicos até as manifestações bucais de doenças sistêmicas.

O exame clínico, classicamente dividido em anamnese e exame físico, se bem conduzido, favorecerá sobremaneira o estabelecimento do diagnóstico. Durante a anamnese o cirurgião-dentista é o responsável pela avaliação dos sintomas do paciente, a partir da sua queixa principal. Todas as informações relativas ao aparecimento e a evolução da doença deverão ser correlacionados com os demais sistemas, para avaliar o paciente holisticamente. Assim, a queixa principal, a história da doença atual e a história familiar são informações essenciais, obtidas nessa etapa inicial do exame clínico.

O exame físico identifica os sinais apresentados pelo paciente. A oroscopia avalia as características da boca por meio do exame físico local, comparando o que é normal com as possíveis alterações encontradas e associadas à queixa do paciente. Deve-se realizar a palpação das estruturas físicas anatômicas ou patológicas, auscultar os sons emitidos ou percebidos e os odores exalados. O conjunto dessas informações, aliadas ao raciocínio lógico, conduzirá a uma hipótese diagnóstica e permitirá a solicitação dos exames complementares, se necessários.

2.3.2. Localização da lesão

Enquanto na cérvix uterina a detecção das lesões suspeitas é mais fácil, uma vez elas localizam-se frequentemente na junção escamo-colunar, na cavidade oral a situação é paradoxalmente bem mais complexa. Se levarmos em consideração que o carcinoma epidermóide pode se originar em qualquer local do epitélio escamoso que reveste a cavidade oral, a área passível de desenvolver a neoplasia é bem maior, tornando-se mais difícil a detecção da mesma (Sandler, 1962). Outro fato que deve ser levado em consideração é que as lesões malignas iniciais podem se assemelhar a lesões traumáticas ou outras anormalidades benignas, passando assim despercebidas.

Devido à extensa distribuição do epitélio escamoso na cavidade oral, as técnicas de exploração para detectar a lesão serão diferentes daquelas utilizadas no colo uterino. Deve-se iniciar pelo exame ectoscópico detalhado, o qual pode revelar a presença de áreas leucoplásicas, eritroplásicas ou leucoeritroplásicas, lesões nodulares ou ulceradas. Como a visualização dessas lesões nem sempre é evidente, pode-se recorrer a técnicas que permitam detectá-las de forma mais precisa. Isso pode ser feito, seja através da colheita oral total, seja pela exploração com o azul de toluidina, da mesma forma como ele é empregado para o colo uterino.

A colheita oral total é um método de exploração mais amplo, porém menos preciso, no qual inicialmente faz-se uma lavagem da cavidade com água pura, visando a limpeza; posteriormente executa-se uma segunda lavagem em que o paciente faz 15 a 20 segundos de gargarejo com 20ml de solução salina a 20%, executando vigorosos bochechos (5 a 6 para cada lado), movendo a língua, os lábios e a bochecha contra a superfície interna da cavidade oral e contra os dentes.

Recolhe-se a solução e encaminha-se ao laboratório onde vai ser centrifugada ou passada em microfiltros, e com o sedimento são preparadas as lâminas para exame citológico.

Caso não existam células malignas o exame deve ser repetido com a mesma técnica dentro de cinco dias. Caso sejam observadas células malignas, deve-se sempre executar rigorosa inspeção com lupa da cavidade bucal, fazendo colheita direta de todas as áreas suspeitas. Há ligeiras divergências quanto à técnica de lavagem. Enquanto Scheman, 1963, preconiza o uso de 50ml de solução salina a 0.85%, sendo a lavagem feita em duas etapas com 25ml cada, sem a limpeza inicial, Helsper, Sharp, 1964, propõe a lavagem da boca durante 60 segundos com uma onça (28,35g) de solução balanceada de Gey, a qual preserva melhor as células, dando menor distorção do que a solução salina.

O azul de toluidina é um corante vital básico metacromático que tem afinidade pelo DNA da célula, tendo sido usado desde 1960 para detectar lesões malignas orais (Epstein, 1997). Quando em contato com o epitélio oral, o azul de toluidina colore as células normais do epitélio de revestimento e o ácido acético a 1% retira esse corante. Nas células malignas, que tem maior concentração de DNA, não ocorre descoloração adequada pelo ácido acético, indicando que a área corada é suspeita. Esta técnica tem sido usada não só para selecionar o sítio de biópsia como também para delinear as margens da lesão, para que o cirurgião possa fazer a ressecção adequada de toda ela. Epstein, Zhang, Rosin, 2002 e Silverman, 1987, descrevem uma acuracidade maior do que 95% com o uso dessa técnica, enquanto Epstein, 1997, revela ser uma técnica com alta sensibilidade, nenhum resultado falso negativo e bom valor preditivo positivo.

Para as lesões leucoplásicas, onde a camada de ceratina é muito espessa, não permitindo o acesso às células mais profundas, aconselha-se embeber a mesma com uma gaze molhada em soro fisiológico durante 15 minutos, antes de realizar a colheita (Sandler, 1964). Tal procedimento visa amolecer a camada de ceratina, facilitando a remoção da mesma e permitindo a coleta das células neoplásicas. Hammond, Sequeira, 1971, preconizam a remoção dessa camada córnea com uma lâmina, cureta ou com uma pedra de diamante, antes da colheita citológica. Wescott, Bruckner, 1965, acha que esse procedimento provoca distorções nas células da camada profunda, prejudicando a análise citológica, daí porque preconiza que lesões ceratóticas devem ser logo biopsiadas.

2.3.3. Modos de Coleta

Uma vez localizada a lesão, deverá ser coletada uma amostra da mesma visando o exame citológico ou histológico. A exploração citológica poderá ser efetuada por meio das seguintes técnicas (Grimaldi, 2002):

- ***Imprint***, na qual se faz uma compressão com a lâmina sobre a lesão;
- ***Rasprint***, na qual se efetua um raspado sobre a lesão;
- ***Punção com agulha fina (PAAF)***, utilizada mais freqüentemente para lesões nodulares superficiais ou profundas; aqui se introduz na lesão uma agulha com bitola de 23 a 25mm ligada a uma seringa de 20ml, fazendo-se movimentos leves e com ligeira sucção.

O estudo histológico será feito de acordo com os seguintes métodos:

- *core biopsy*
- biópsia incisional - retirada de um fragmento da lesão para exame histológico
- biópsia excisional – retirada da lesão como um todo

2.4. Aspectos anatomopatológicos das lesões escamosas orais

2.4.1. Lesões Benignas

As lesões benignas causadas pelo HPV na cavidade oral são o papiloma de células escamosas, o condiloma acuminado, a verruga comum e a hiperplasia epitelial focal (Herrero, 2003).

O **papiloma de células escamosas**, associado aos HPV's 6 e 11, acomete principalmente indivíduos entre 30 e 50 anos, embora possa ocorrer abaixo dos 10 anos, representando 7,5% dos tumores em crianças (Herrero, 2003; Syrjänen, 2003). Frequentemente envolve palato mole, freio da língua e lábio inferior. Na maioria dos casos é único, pequeno, menor que 1cm. Cresce como uma lesão exofítica, séssil ou pediculada, de superfície verrucosa, cuja cor varia do branco ao róseo, dependendo dos níveis de vascularização e ceratinização (Syrjänen, 2003).

O **condiloma acuminado** é considerado como doença sexualmente transmissível, porém admite-se que seja também adquirida por transmissão materna (Syrjänen, 2003). A similaridade entre o condiloma acuminado, o papiloma de células escamosas e a verruga oral é grande, tanto do ponto de vista clínico, como

anatomopatológico. Na boca o condiloma acuminado se apresenta como um pequeno nódulo róseo ou esbranquiçado, sésil ou pediculado, único ou múltiplo, com a superfície papilomatosa, freqüentemente localizado na língua, lábio, palato ou assoalho da boca. As técnicas de imunistoquímica e hibridização revelam a presença de HPVs 6 e 11 em aproximadamente 75% dos casos (Syrjänen, 2003).

A **verruga comum** aparece como lesão papilomatosa, sésil, de superfície brancacenta ou avermelhada, localizada no lábio, palato duro e gengiva, que são áreas da mucosa onde o epitélio se assemelha ao da pele. O HPV foi detectado em 43 a 100% das verrugas orais, sendo a prevalência de HPVs 2 e 57 (Syrjänen, 2003).

A **hiperplasia epitelial oral focal**, também chamada de doença de Heck, é uma lesão benigna, associada aos HPVs 13 e 32 que acomete os esquimós do Alaska, os índios da América do Norte e do Sul, tendo sido também observada em Israel, na África do Sul e na Suécia (Herrero, 2003; Syrjänen, 2003). Caracteriza-se pela presença de múltiplas pápulas moles, pouco dolorosas, com a cor variando do róseo a cor da mucosa normal, localizada freqüentemente na língua e lábios, principalmente no lábio inferior. Apesar de uma forte história familiar ter sido proposta por muitos autores, a etiologia viral tem sido mostrada pela imunistoquímica e pela hibridização, que revelam a presença dos HPVs 13 e 32 em 75 a 100% dos casos (Syrjänen, 2003). Os HPVs 13 e 32 são considerados específicos da hiperplasia epitelial oral focal, embora o HPV 32 tenha sido encontrado em outras lesões orais, porém nunca fora da cavidade oral (Castro, Filho, 2006).

2.4.2. Lesões Malignas

As lesões malignas do epitélio escamoso oral podem ser precedidas de alterações intramucosas, as neoplasias intra-epiteliais, ou podem ser decorrentes de alterações no complexo genético da célula, ocorrendo “de novo”, sem qualquer alteração intramucosa pré-existente e clinicamente detectável (Syrjänen, 2005). As lesões intra-epiteliais, sejam elas causadas pelo HPV ou por um dos outros fatores, são de difícil detecção ao exame ectoscópico da cavidade oral enquanto que as lesões avançadas são facilmente visíveis. Quando as lesões malignas do epitélio escamoso oral estão associadas ao HPV, geralmente se trata de HPVs 16 e 18 (Herrero, 2003).

Em lesões ligeiramente elevadas, ulceradas, fissuradas, granulares, rugosas ou lisas, de coloração branca (leucoplásica) ou vermelha (eritroplásica), cinza ou rósea, deve-se pensar em **lesões intra-epiteliais**, sempre que a consistência for endurecida à palpação (Gardner, 1964).

O **carcinoma verrucoso**, também chamado tumor de Ackerman, é uma variedade do carcinoma de células escamosas de baixo grau de malignidade, localmente invasivo e não metastatisante, que pode ocorrer na cavidade oral, lábio e laringe, assim como no trato genital. Predomina em pacientes acima de 60 anos, sendo mais freqüente em homens do que em mulheres e tem uma aparência macroscópica característica, apresentando-se como um nódulo exofítico, de superfície verrucosa (Neville, 2004). Ao contrário do que se observa na maioria dos carcinomas de células escamosas da cavidade oral, em que há prevalência dos HPVs 16 e 18, no carcinoma verrucoso, estudos revelam que os HPVs 6 e 11 tem

maior prevalência (47%), estando os HPV 16 e 18 em segundo lugar (35,3%) e o HPV 2 em terceiro (17,7%) (Syrjänen, 2005).

O **carcinoma de células escamosas** de cavidade oral pode se apresentar de forma exofítica, sob a forma de massa fungiforme, verrucosa ou papilar, ou de forma endofítica, como uma lesão invasiva, crateriforme ou ulcerada (Neville, 2004).

A localização mais comum do carcinoma escamoso intra-oral é na língua, geralmente nas superfícies ventral e lateral superior, vindo posteriormente o assoalho da boca (Gardner 1965, Dizner, Carraro, Alonson, 1967, Perussi, 2002, Neville, 2004, Brener, 2007). Os outros locais são, em ordem decrescente de frequência, palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (Neville, 2004).

2.4.3. Citologia Esfoliativa

O exame citológico é uma prática utilizada na Clínica Ginecológica desde o início do século XX, quando Schauenstein (1908) e Rubin (1910) relataram as lesões pré-cancerosas do colo uterino; em 1928 Papanicolaou e Babés descreveram as células cancerosas no esfregaço de colo uterino e admitiram a possibilidade do método citológico vir a ser diagnóstico no câncer do colo uterino (*apud Gompel*, 1997). Em 1940, já com a técnica perfeitamente desenvolvida, o exame do esfregaço citológico ginecológico, corado pelo método de Papanicolaou foi posto em prática no New York Hospital (Papanicolaou, 1941). A partir daí, com a aceitação crescente do método, começaram os questionamentos se ele não poderia

ser útil para o estudo de líquidos cavitários ou de células descamadas em outras localizações.

Os primeiros estudos das células epiteliais da cavidade oral datam de 1890, quando Miller analisou as células esfoliadas na saliva. Porém, somente duas décadas depois foi que Weinmann, usando a técnica de Ernst-Gram e Wright, e outros investigadores, usando o método de Papanicolaou para corar as lâminas, detectaram que a cornificação das células epiteliais normais varia de acordo com a localização anatômica na cavidade oral (Montgomery, Von Haan, 1951). Montgomery e Von Haan, em 1951, a partir do estudo detalhado de esfregaços citológicos de 15 pacientes com câncer bucal e de 10 pacientes com leucoplasias, fizeram a primeira descrição das características morfológicas das células malignas e das células ceratinizadas na cavidade oral. Os critérios por ele definidos levam em consideração as alterações nucleares e citoplasmáticas, onde os núcleos mostram “alteração da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia, espessamento da membrana, nucléolos grandes, por vezes múltiplos, inclusões nucleares acidofílicas ou basofílicas e ausência de figuras de mitoses; a alteração da relação núcleo/citoplasma foi considerada a característica de malignidade mais encontrada”. As alterações citoplasmáticas são representadas por “eosinofilia proeminente, vacuolização intracitoplasmática e corpos de inclusão fagocítica”. Em 1956 o *Dental Service at the Veterans Administration Hospital* do Brooklyn fez um estudo piloto e concluiu que a citologia esfoliativa oral tinha algum valor na prática clínica (Sandler, 1963; Sandler, 1964).

A **citologia esfoliativa** é realizada a partir de um simples esfregaço, de material colhida com uma escova ou com uma espátula de madeira ou metálica, que, quando friccionados sobre a superfície da lesão, podem recolher as células. O

objetivo do exame é detectar células alteradas, obtidas a partir de uma área lesada. Essas células podem fornecer informações importantes sobre a natureza da lesão, permitindo não só o diagnóstico, como também o acompanhamento de pacientes previamente tratados, no sentido de afastar possíveis recidivas (Acha, 2005). Se levarmos em consideração que a colheita citológica é de fácil execução, não agressiva, de baixo custo operacional e que seu resultado pode ser liberado rapidamente, permitindo um diagnóstico rápido das lesões bucais, sua prática deveria ser rotineira na Clínica Odontológica, da mesma forma como se dá na Clínica Ginecológica. A citologia esfoliativa, no entanto, é pouco utilizada atualmente na Clínica Odontológica, principalmente pela falta de critérios morfológicos para definição diagnóstica das lesões orais, como também pelos questionamentos que existem quanto à sensibilidade da técnica, somados à falta de interação do clínico com o patologista. Considerando-se a semelhança que existe entre a mucosa oral e a vaginal, os critérios usados para a mucosa vaginal poderiam ser transpostos para a cavidade bucal.

Uma vez que os maiores problemas do carcinoma epidermóide na cavidade oral são ligados ao diagnóstico tardio da lesão e a alta incidência de recorrência, o exame citológico talvez seja a melhor forma de fazer uma abordagem inicial, tendo em vista que, caso seja confirmada a malignidade ou permaneça a dúvida quanto a mesma, a biópsia poderá ser indicada, permitindo então uma conclusão mais precisa. Assim sendo, o exame citológico da cavidade bucal deve sempre ser indicado nas seguintes situações clínicas (Sugerman, Savage, 1996):

- Revisão de pacientes de alto risco;
- Revisão periódica das lesões orais pré-malignas;
- Determinação do melhor local para a biópsia;

- Casos nos quais a biópsia é contra-indicada, sendo a citologia o único meio para diagnosticar a lesão;
- Revisão periódica de pacientes em tratamento ou que já foram portadores de câncer oral;
- Exploração de lesões clinicamente suspeitas;
- Detecção de novos membros afetados em uma família com história de câncer bucal.

2.4.3.1. As Classificações Citológicas

A primeira tentativa de classificar os exames citológicos data de 1943, quando Papanicolaou diferenciou os esfregaços vaginais em cinco classes distintas:

- Classe I (ausência de células atípicas ou anormais);
- Classe II (presença de células atípica sem evidência de malignidade);
- Classe III (sugestivo de malignidade);
- Classe IV (muito suspeito de malignidade);
- Classe V (maligno).

Em 1963, Sandler propôs uma classificação semelhante para as lesões neoplásicas orais, colocando-as também em cinco classes:

- Classe I (esfregaço normal),
- Classe II (esfregaço atípico),
- Classe III (indeterminado),
- Classe IV (sugestivo de câncer),
- Classe V (positivo para câncer).

Posteriormente outros autores (Tabela 1) utilizaram a mesma classificação ou propuseram ligeiras modificações, como Chomette, que em 1980 classificou os esfregaços em quatro itens:

- I (normal);
- II (regenerativo e geralmente inflamatório);
- III (displasia grave);
- IV (maligno).

Tabela 1 - Primeiras classificações citológicas propostas para as lesões escamosas orais

Autor	Ano	Classificação
Sandler	1963	Classe I, II, III, IV e V
Sandler	1964	Classe I, II, III, IV e V
Gardner	1964	Classe I, II, III, IV e V
Bhaskar	1965	Classe I, II, III, IV e V
Dizner	1967	Classe I, II, III, IV e V
Hammond	1971	Classe I, II, III, IV e V
Folsom	1972	Classe 0, I, II, III, IV e V
Chomette	1980	Esfregaço I, II, III, IV

Embora com uma alta acuracidade, esses sistemas não se generalizaram como prática diagnóstica, talvez porque (Gompel, 1997):

- Nem sempre estabeleçam uma boa correlação entre os resultados citológicos e histológicos;
- A classe II englobe todas as alterações inflamatórias, sem distinguir as lesões específicas, principalmente as lesões virais;
- As lesões de classe III e IV precisem ser mais detalhadas, uma vez que elas deixam grandes incertezas quanto a malignidade.

Em 1953, Reagan propôs os termos **displasia e carcinoma *in situ***, para descrever as atipias celulares restritas ao epitélio malpighiano do colo uterino. As displasias foram distinguidas em três graus de intensidade: **leve, moderada e severa** conforme acometessem os terços: inferior, médio e superior do revestimento epitelial. O carcinoma *in situ* seria a lesão maligna que não ultrapassou a membrana basal do revestimento epitelial.

Em 1967, Richart questiona as classificações anteriores justificando que elas não permitem prever a evolução clínica e propõe a denominação de **neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de grau I, II e III**, conforme acometessem os terços inferior, médio e superior do revestimento epitelial, respectivamente.

Posteriormente ainda ocorreram algumas modificações na classificação de Richart e em 1988, um grupo de especialistas reunidos em Bethesda, nos Estados Unidos, assumiu as críticas endereçadas às outras classificações e propõem o Sistema de Bethesda que reflete três princípios fundamentais:

- A terminologia deve comunicar informações clinicamente relevantes a partir do laboratório para o médico responsável pelo atendimento do paciente;
- A terminologia deve ser uniforme e razoavelmente reproduzível entre diferentes patologistas e laboratórios, devendo ser suficientemente flexível para se adaptar a uma grande variedade de situações laboratoriais e localizações geográficas;
- A terminologia deve refletir a compreensão mais atual das lesões.

O objetivo desses princípios sempre foi promover uma correlação eficaz entre os achados relevantes da citologia, os achados clínicos e os laboratoriais, permitindo assim uma simplificação da análise tanto para o clínico

como para o patologista. A última revisão do sistema de Bethesda data de 2001 e foi elaborada pelo Seminário de Trabalho do Sistema de Bethesda de 2001, do qual participaram quarenta e quatro organizações internacionais com interesse na citologia cervical (Solomon, Nayar, 2004).

Considerando-se que as tentativas anteriores de classificar as lesões orais não levaram em consideração as classificações mais atuais e que o sistema de Bethesda (Solomon, Nayar, 2004) estabelece uma boa correlação entre os achados clínicos e citológicos, este trabalho se propõe a utilizar o dito sistema para classificar as lesões neoplásicas bucais, numa tentativa de correlacionar com as lesões ginecológicas.

Entre os achados que o Sistema de Bethesda de 2001 analisa, serão levados em consideração neste trabalho somente àqueles referentes a adequacidade da amostra e as anormalidades nas células epiteliais escamosas, devido a semelhança que existe entre as células escamosas do epitélio de revestimento da mucosa oral e àquelas da mucosa ectocervical. Considerando-se que a cavidade bucal é toda revestida por epitélio escamoso, não tendo células glandulares semelhantes àquelas do epitélio endocervical e que o presente trabalho visa analisar somente as lesões relacionadas a esse epitélio escamoso, não serão consideradas as alterações das células glandulares.

Conforme mostra a tabela 2, as amostras sem alterações neoplásicas serão consideradas, segundo os critérios de Bethesda (2001), como “**Negativas para lesão epitelial e malignidade: NIML**” (Solomon, Nayar, 2004).

Para as lesões neoplásicas foi usada a designação de Bethesda 2001, que considera como **lesão intra-epitelial escamosa (SIL)** as lesões não invasivas, ou seja, aquelas restritas ao epitélio de revestimento, que ainda não ultrapassaram a

membrana basal epitelial e **carcinoma de células escamosas** as lesões invasoras. As **lesões intra-epiteliais escamosas** encontram-se divididas em **lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL)** e de **alto grau (HSIL)**. As **lesões de baixo grau (LSIL)** são as alterações que histologicamente se restringem ao terço inferior do epitélio, e abrangem o efeito citopático do HPV (coilocitose), correspondendo as antigas denominações de displasia leve e neoplasia intra-epitelial de baixo grau (**NIC I**). As **lesões de alto grau (HSIL)** são aquelas que na histologia comprometem os terços médio e superior do epitélio, correspondendo as displasias moderada e avançada, as neoplasias intra-epiteliais de médio e alto grau (**NIC II e III**) e o carcinoma *in situ* (Tabela 2).

Ainda segundo os critérios de Bethesda (2001), a designação de **células escamosas atípicas (ASC)** é utilizada todas as vezes que são encontradas células escamosas com alterações da relação núcleo/citoplasma, sendo os núcleos hipercromáticos, irregulares, podendo apresentar multinucleação. Utilizando-se essa designação subentende-se que o processo é indefinido, podendo estar incluídas alterações não somente relacionadas ao papilomavírus humano (HPV), como também inflamações outras, dessecação, degeneração ou outros artefatos. As **células escamosas atípicas (ASC)** podem ser subdivididas entre aquelas de **significado indeterminado (ASC-US)** e aquelas em que **não é possível excluir uma lesão de alto grau (ASC-H)**. As **células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US)** são aquelas que apresentam aumento da relação núcleo/citoplasma, com um volume nuclear 2 a 3 vezes maior do que o núcleo de uma célula escamosa intermediária normal, núcleos discretamente hipercromáticos, com a cromatina distribuída de forma um pouco irregular e o citoplasma densamente orangeofílico (Solomon, Nayar, 2004). As **células escamosas atípicas em que não**

é possível excluir lesão de alto grau (ASC-H) são alterações nas quais as células alteradas têm o tamanho das células metaplásicas, aparecendo de forma isolada ou em pequenos fragmentos com menos de dez células. Essas células apresentam núcleos hipercromáticos, irregulares, com alteração da forma, 1 a 2 vezes maiores do que o núcleo de uma célula normal (Solomon, Nayar, 2004). (Tabela 2)

Tabela 2 - Sistema de Bethesda

Sigla	Sistema de Bethesda 2001	Achados patológicos
NIML	Negativas para lesão epitelial e malignidade	Sem alterações neoplásicas
SIL	Lesão intra-epitelial escamosa	Lesões não invasivas
LSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau	Lesões no terço inferior do epitélio de revestimento Efeito citopático por HPV
HSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau	Lesões no terço médio e superior do epitélio de revestimento
CEC	Carcinoma de células escamosas	Lesões invasivas
ASC	Células escamosas atípicas	Presença de células com alteração da relação núcleo/citoplasma
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado	Volume nuclear 2 a 3 vezes maior do que o núcleo das células intermediárias, núcleo com a cromatina densa, irregular e citoplasma eosinofílico
ASC-H	Células escamosas atípicas em que não é possível excluir lesão de alto grau	Volume nuclear 1 a 2 vezes maior que o núcleo de uma célula normal, núcleos hipercromáticos, irregulares e com alteração de forma

Os **carcinomas de células escamosas** são tumores malignos invasivos, mostrando diferenciação para células escamosas.

Os critérios mínimos de celularidade escamosa definidos para que uma amostra de um esfregaço convencional seja considerado adequado são a presença de 8000 a 12000 células epiteliais escamosas bem preservadas e bem visualizadas. Se o esfregaço for em meio líquido, ele deve conter no mínimo 5000 células escamosas bem individualizadas e bem preservadas (Studeman, 2003).

2.4.4. Técnicas de exploração diagnóstica

Uma vez obtido o esfregaço, o próximo passo será a interpretação do material colhido. O exame das células esfoliadas da mucosa oral poderá não somente detectar a presença de alterações morfológicas que permitam definir malignidade como também, através das técnicas de biologia molecular e de imunoistoquímica, predizer a possibilidade de malignização ou de progressão de lesão maligna. Usando marcadores moleculares de carcinogênese inicial, será possível detectar outros fatores capazes de contribuir para a transformação maligna da lesão, tais como: presença do HPV, alterações no padrão do gene supressor, transformações no perfil de expressão do gene, marcadores microssatélites que permitem predizer o câncer em estágio inicial (Smith, 2004).

A primeira análise do esfregaço citológico é feita com a coloração de Papanicolaou, a qual vai permitir não somente a análise morfológica do material como também, caso seja necessário, orientar para uma exploração detalhada no

sentido de chegar-se a uma conclusão diagnóstica mais precisa, utilizando-se as diferentes técnicas disponíveis.

As técnicas **histoquímicas** são específicas para uma determinada substância ou grupo químico e visam detectar os principais componentes das células (íons, lipídios, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) ou parasitas, permitindo assim ajudar no diagnóstico diferencial entre lesões neoplásicas e ou infecciosas, ou mesmo para diferenciar determinados tipos de neoplasias (Brasileiro 2004).

As colorações **imunoistoquímicas** têm como princípio básico desencadear uma reação antígeno-anticorpo, utilizando anticorpos como reagentes específicos para detectar antígenos presentes na célula. A imunoistoquímica é utilizada para detectar não somente antígenos presentes na célula em condições normais ou patológicas, como também para microorganismos de difícil reconhecimento nas colorações de rotina, tais como vírus, fungos, bactérias, etc (Brasileiro, 2004).

A **citometria** é uma técnica que visa detectar a quantidade de componentes celulares. Existem dois princípios básicos: a citofotometria e a citometria de fluxo. A **citofotometria** permite detectar a quantidade dos constituintes celulares em células normais e alteradas em esfregaços ou cortes histológicos, por meio da coloração histoquímica desse componente. A **citometria de fluxo** utiliza células em suspensão, as quais são tratadas pelo fluorocromio, que posteriormente é detectado por um sensor; é muito usada para analisar o crescimento tumoral, através da determinação do conteúdo de DNA existente na célula (Brasileiro, 2004).

Finalmente temos as técnicas de biologia molecular tais como a **hibridação molecular**, a **reação em cadeia da polimerase (PCR)** e as **técnicas para análise do genoma**, o biochip ou *microarray*.

A **hibridização molecular** tem como princípio básico a utilização de uma sonda, a qual é constituída por uma seqüência conhecida de DNA ou RNA, obtidos por clonagem ou síntese química e que contém uma marca que permite a visualização seletiva; a sonda vai se ligar a seqüência de interesse (seqüência alvo), sendo a visualização feita a partir da marca. Esta é uma técnica utilizada para detectar genoma viral (Brasileiro, 2004).

A técnica da **reação em cadeia da polimerase (PCR)** baseia-se em uma reação de amplificação de seqüências específicas de DNA, que ocorre em um termociclador, com controle automático de variação de temperatura em função do tempo. Ao final uma única molécula de DNA dá origem a 10 bilhões de cópias, permitindo a visualização e manipulação das mesmas. Para analisar a seqüência de RNA, este deve sempre ser convertido em DNA complementar. A PCR é utilizada para detectar genomas de vírus, bactérias ou outros parasitas; pode-se também detectar alterações genéticas, doenças geneticamente transmissíveis através da presença do RNA mensageiro (Brasileiro, 2004). A PCR é a técnica mais precisa para detectar genomas virais, embora haja a possibilidade de dar resultados falsos positivos, decorrentes da contaminação no momento da amplificação (Castro, 2006)

A técnica de **microarrays ou biochip** associa as técnicas para análise do genoma com as de informática, revelando semelhanças e diferenças através de uma comparação qualitativa e quantitativa da expressão genética dos tecidos, baseada na intensidade da reação para cada fragmento examinado. Ela utiliza um DNA com uma seqüência de oligonucleotídeos conhecida, denominado de cDNA,

um RNA isolado do tecido da amostra teste (ex:tumor) e um RNA da amostra referência (tecido normal). Os RNA das amostras teste e referência são transcritos separadamente para o cDNA, marcados respectivamente com fluoresceína de cores diferentes (uma cor para cada conjunto RNA/cDNA) e posteriormente hibridizados para que se ordenem. A fluorescência resultante revela respectivamente os níveis relativos de cada RNA transcrito, permitindo uma comparação qualitativa e quantitativa entre a amostra teste e a amostra referência. Desta forma ela permite determinar a instabilidade ou perda da heterozigose (LOH) na seqüência genética de um cromossoma específico (Sunil, Ashworth, 2001).

Com a técnica de *microarray* alterações cromossômicas tais como deleções ou ampliações podem ser investigadas, possibilitando estudar as alterações genéticas responsáveis pela maior incidência de um determinado tipo de câncer em uma família. Ela também pode permitir progressos no diagnóstico precoce e no prognóstico do câncer, na identificação de doenças genéticas antes e depois do nascimento e pode ajudar no diagnóstico de doenças infecciosas (Brasileiro, 2004).

Estudando o perfil genético de lesões do epitélio escamoso oral com as técnicas de *microarray*, tem sido possível avaliar o risco de transformação maligna. Esses estudos avaliam a curta seqüência repetida de DNA no genoma para detectar a instabilidade ou perda da heterozigose (LOH) na seqüência genética do cromossoma específico no tecido. Trabalhos usando marcadores microssatélites em sete regiões cromossomiais (3p,4q,8p,9r,11q,13q e 17p) analisando a progressão de lesões intra-epiteliais de alto e baixo grau e de lesões hiperplásicas, mostraram que pacientes com LOH em 3p e 9p tem ligeiro aumento da progressão. Quando as

alterações em 3p e 9p vem associadas à perda em 4p, 8p, 11q e 17p a progressão é mais rápida (Rosin, 2007).

2.5. Dificuldades na análise do esfregaço em pacientes em acompanhamento pós-cirúrgico

A citologia esfoliativa tem um papel importante no acompanhamento dos pacientes uma vez que ela pode detectar possíveis recidivas precocemente. O grande problema é que esses pacientes são de difícil manejo, uma vez que tanto a cirurgia como a irradiação, utilizados no tratamento dessas neoplasias, podem levar a intensas alterações nos tecidos circunvizinhos. Tais alterações, representadas por fibrose, ceratose ou mesmo supuração pós-cirúrgica, podem inicialmente levar a suspeita da presença de tumor residual (Hammond, Sequeira, 1971). Além do mais, a fibrose e ceratose do revestimento epitelial, decorrentes da cirurgia, podem dificultar o acesso à coleta, levando a resultados falsos negativos, enquanto que a irradiação provoca alterações na estrutura das células, podendo levar a falsos positivos (Hammond, Sequeira, 1971). Sabe-se que após a primeira semana de tratamento radioterápico (raios-X ou cobalto), as células começam a apresentar alterações pós-irradiação, representadas por aumento do volume das mesmas, com a presença grânulos citoplasmáticos, halo claro peri-nuclear, binucleação, alargamento nuclear e nucleolar e multinucleação (Umiker, 1961, Silverman, 1969). Tais alterações nem sempre são evidentes, sendo freqüentemente muito difícil estabelecer uma diferença precisa entre a célula maligna e a célula irradiada (Umiker, 1961, Silverman, 1969). É importante notar que algumas células não revelam qualquer transformação morfológica (Umiker, 1961).

A presença de células malignas em um esfregaço logo após o tratamento não significa falência do mesmo, devendo o paciente continuar com a irradiação, uma vez que algumas lesões podem se converter para o estado negativo; por outro lado, a ausência de células malignas nesta fase não exclui a presença de tumor residual (Umiker, 1960).

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Objetivo geral

Este trabalho se propõe a utilizar a classificação de Bethesda para avaliar as características morfológicas celulares em esfregaços obtidos da cavidade oral de pacientes portadores de lesões clinicamente suspeitas de malignidade, lesões benignas de provável etiologia viral ou de pacientes submetidos a acompanhamento após tratamento de câncer oral, analisando as possíveis influências da conclusão citológica na futura conduta clínica. Visa também estabelecer os critérios morfológicos necessários para definir a presença do HPV nessas lesões, fazendo uma comparação com àqueles utilizados para os exames cervicais, além de confirmar a presença do vírus pela análise molecular, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2. Objetivos específicos

- Realizar citologia esfoliativa em pacientes portadores de lesões bucais atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Universitário de Brasília, apresentando uma das seguintes situações: lesões clinicamente suspeitas de malignidade, lesões benignas de provável etiologia viral ou mucosa oral, alterada ou não, de pacientes em acompanhamento após tratamento de câncer bucal;

- Caracterizar morfológicamente os achados citológicos de acordo com os critérios de Bethesda;
- Identificar morfológicamente alterações citopáticas causadas pelo HPV nos esfregaços citológicos corados pelo Papanicolaou;
- Identificar a presença de HPV por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Estabelecer uma análise comparativa entre:
 - Os diagnósticos citológicos (citologia esfoliativa) e histológicos (biópsia);
 - As alterações citopáticas características de HPV no exame citológico e a presença do vírus na reação em cadeia pela polimerase (PCR)
- Avaliar a importância da citologia esfoliativa como ferramenta diagnóstica nas lesões escamosas orais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Dentre os mais de dois mil pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Universitário de Brasília no período de dois anos (2006 e 2007), quarenta e um foram selecionados por apresentarem lesões clinicamente suspeitas de malignidade, lesões benignas de provável etiologia viral ou por estarem em acompanhamento após tratamento de câncer oral. Todos os pacientes aceitaram participar da presente pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O projeto de pesquisa com o número de 137/2006 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS conforme documento anexo (Anexo 1).

4.2. Critérios de inclusão

Pacientes portadores de lesões consideradas suspeitas, com as seguintes características:

- Nódulos tumorais endurecidos, fixos, ulcerados;
- Lesões leucoplásicas ou eritroplásicas de longa evolução com aumento de volume;
- Lesões eritroplásicas ou leucoplásicas na mucosa bucal, observadas no período pós-operatório do tratamento do câncer oral;
- Pacientes portadores de lesões papilomatosas de provável origem viral;

- Concordância do paciente com o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.3 Critérios de exclusão

Pacientes portadores de lesões que não sejam clinicamente suspeitas de:

- malignidade;
- etiologia viral;
- que não estejam em acompanhamento após tratamento de câncer bucal.

4.4. Citologia esfoliativa

Para o exame citológico foi realizada uma coleta tríplice, raspando-se vigorosamente a superfície da lesão com uma escova do tipo endocervical de marca Kolplast Comercial Industrial do Brasil Ltda, uma espátula de metal de número sete e uma espátula de madeira. O material recolhido foi espalhado sobre lâminas de vidro limpas e secas, identificadas com as iniciais do nome do paciente e especificadas quanto ao tipo de esfregaço realizado, sendo chamada de escovado a coleta realizada com a escova, de raspado a coleta realizada com a espátula de metal e espátula a feita com a espátula de madeira (Fig 2A). Os esfregaços foram feitos no sentido longitudinal da lâmina (Fig 2B). Realizados os esfregaços, as três lâminas obtidas foram imediatamente fixadas com o polietilenoglicol (Fig 2C). Foram preparadas lâminas de reserva, colhidas com a escova, para realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR), no sentido de pesquisar o papilomavírus.

Após a coleta as lâminas foram acondicionadas em frascos porta-lâminas e enviadas ao Centro de Anatomia Patológica, juntamente com a ficha de solicitação de exame citológico, informando a história clínica sucinta do paciente (Fig 2D). No Centro de Anatomia Patológica foram coradas pelo método de Papanicolaou e examinadas no microscópio de luz. Todos os casos sem diagnóstico histológico foram biopsiados, sendo a biópsia considerada o padrão ouro. Os fragmentos retirados da lesão foram fixados em solução de formol a 10% e posteriormente processados para inclusão em blocos de parafina. O exame histológico foi realizado em cortes com 4µm de espessura e corados pela hematoxilina-eosina.

Uma das lâminas colhidas com a escova do tipo endocervical de marca Kolplast Comercial Industrial do Brasil Ltda e fixada pelo polietilenoglicol foi enviada para estudo molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de pesquisar o HPV18.

4.5. Análise citológica

Todas as alterações citológicas observadas nos esfregaços foram analisadas de acordo com os critérios de Bethesda (2001), tendo sido consideradas as seguintes situações:

- Alterações reativas;
- Alterações reativas associadas à inflamação;
- Alterações reativas associadas à radiação.
- Lesões de caráter neoplásico;
- Lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e de baixo grau (LSIL);
- Carcinoma escamoso;
- Atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US);

- Atipias de células escamosas onde não é possível excluir lesão de alto grau (ASC-H).

4.5.1. Lesões de caráter reativo

As lesões leucoplásicas, eritroplásicas ou papilomatosas, com alterações reativas relacionadas a um processo inflamatório, foram consideradas como alterações celulares reativas relacionadas à inflamação, levando-se em consideração os seguintes achados:

- Aumento de volume nuclear (núcleo 1 a 2 vezes maior do que o núcleo de uma célula escamosa intermediária normal);
- Binucleação ou multinucleação;
- Núcleo com hipercromasia moderada, porém com distribuição da cromatina regular e com granulações finas;
- Nucléolos únicos ou múltiplos;
- Citoplasma com policromasia, vacuolização ou halos perinucleares, porém sem espessamento periférico.

Nos pacientes pós-cirúrgicos, em acompanhamento para afastar possível recidiva, que apresentavam alterações inflamatórias decorrentes de tratamento radioterápico, foram considerados como critérios morfológicos das alterações reativas associadas à radiação:

- Células com o volume acentuadamente aumentado sem alteração da relação núcleo/citoplasma, às vezes com formato bizarro;
- Núcleos aumentados, porém com alterações degenerativas: palidez, condensação da cromatina e vacuolização;
- Hipercromasia nuclear moderada;

- Variação no tamanho do núcleo, observando-se núcleos de tamanho normal ao lado de outros aumentados de volume;
- Binucleação ou multinucleação;
- Hiperchromasia nuclear moderada;
- Nucléolos únicos ou múltiplos caso haja reação reparadora simultânea;
- Vacuolização ou policromazia citoplasmática.

Nas lesões leucoplásicas ou papilomatosas, as alterações ceratóticas foram divididas em paraceratose típica e hiperkeratose. Foi considerado como paraceratose típica a presença de células escamosas superficiais arredondadas, ovais, poligonais ou fusiformes, com citoplasma denso, alaranjado ou eosinofílico e núcleos pequenos e densos (picnóticos). Tais células poderiam se apresentar de forma isolada, em camadas ou em circunvoluções. Quando os núcleos se apresentaram aumentados de volume, hiperchromáticos ou de contornos irregulares, ou quando as células se arranjaram em agrupamentos tridimensionais, usou-se a designação de paraceratose atípica.

Como hiperkeratose foram consideradas as lesões constituídas por células escamosas poligonais, maduras, anucleadas, apresentando freqüentemente grânulos de cerato-hialina.

4.5.2. Lesões de caráter neoplásico

As lesões intra-epiteliais foram consideradas de alto e baixo grau e as invasivas como carcinoma de células escamosas. Os critérios utilizados para considerar uma lesão intra-epitelial de baixo grau foram:

- Alterações citológicas restritas às células com citoplasma “maduro” ou superficiais;

- Alteração da relação núcleo/citoplasma (núcleos aumentados de volume correspondendo a três vezes o volume do núcleo de uma célula intermediária normal), com graus variáveis de hiperchromasia, sendo a cromatina de distribuição regular, porém grosseiramente granular e com o contorno ligeiramente irregular;
- Nucléolos ausentes ou diminutos;
- Presença de coilocitose (cavitação citoplasmática perinuclear nitidamente delineada por borda citoplasmática densa e alterações displásicas nucleares sendo o citoplasma denso, orangeofílico). Essa alteração foi interpretada como decorrente das alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus humano.

As lesões intra-epiteliais de alto grau foram caracterizadas utilizando-se os seguintes critérios:

- Alterações restritas às células imaturas (basais e parabasais);
- Células se arranjando de forma isolada ou em grupamentos;
- Núcleos aumentados de volume, com variação de forma (anisocariose);
- Núcleos hiperchromáticos (cromatina podendo ser fina ou grosseiramente granular, ou com distribuição regular) e de bordas irregulares;
- Nucléolos ocasionais;
- Área citoplasmática reduzida, o que leva a um aumento da relação núcleo/citoplasma, podendo o citoplasma ser ceratinizado (orangeofílico).

Os carcinomas de células escamosas foram divididos em ceratinizantes e não ceratinizantes. Os carcinomas de células escamosas ceratinizantes foram caracterizados de acordo com os seguintes critérios:

- Intensa variação no tamanho e forma celular;

- Citoplasma denso, freqüentemente orangeofílico;
- Células arranjadas em agregados ou de forma isolada;
- Núcleos com intensa variação de forma e tamanho, de bordas irregulares, com a cromatina grosseiramente granular e de distribuição irregular;
- Macronúcleolos podem estar presentes.

Os carcinomas de células escamosas não ceratinizantes seguiram os seguintes critérios:

- Células isoladas ou em agregados sinciciais com limites mal definidos;
- Núcleos de forma irregular e com a cromatina grosseiramente agrupada;
- Macronúcleolos proeminentes;
- Citoplasma basofílico.

4.5.3. Atipias de células escamosas

Como atipias de células escamosas foram consideradas as alterações em que não foi possível definir com segurança, nem a presença de papilomavírus, nem de neoplasia intra-epitelial, sendo os carcinomas raramente aqui considerados. Os critérios observados para designar as células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) foram aqueles em que as células apresentavam ligeira alteração da relação núcleo/citoplasma, com o volume nuclear 2 a 3 vezes maior do que o núcleo de uma célula escamosa intermediária normal, sendo os núcleos discretamente hiper cromáticos, com a cromatina distribuída de forma um pouco irregular e o citoplasma quase sempre densamente orangeofílico.

Para a designação de células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau (ASC-H) utilizou-se como critério a presença de células parabasais com núcleos hiper cromáticos, irregulares, aumentados de volume (1 a 2

vezes o tamanho do núcleo de uma célula normal), dispostas de forma isolada ou em grupos com menos de dez células.

4.6. Análise histológica

As lesões de caráter inflamatório foram designadas como processo inflamatório agudo ou crônico inespecífico e especificadas as alterações inflamatórias observadas. As lesões papilomatosas recobertas por um epitélio escamoso estratificado acantótico ou hiperplásico foram designadas como papiloma escamoso oral. As lesões neoplásicas, quando intra-epiteliais, foram classificadas como neoplasia intra-epitelial oral (NIO) de grau I, II ou III conforme acometessem um terço, dois terços ou todo o epitélio de revestimento, respectivamente.

As lesões neoplásicas invasivas foram classificadas como carcinomas bem, moderadamente e pouco diferenciadas, sendo considerados bem diferenciados aqueles em que a neoplasia era constituída por células escamosas maduras, com produção de ceratina. Os tumores moderadamente diferenciados seriam aqueles com maior grau de anaplasia, nos quais quase não se observa produção de ceratina; os pouco diferenciados seriam os francamente anaplásicos (Neville, 2004).

4.7. Análise molecular

4.7.1. Amostras clínicas

Foram enviadas para pesquisa de HPV18 pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) 26 amostras obtidas a partir de esfregaços citológicos colhidos com a escova do tipo endocervical de marca Kolplast e fixados pelo

polietilenoglicol. O material clínico coletado foi acondicionado em lâminas previamente identificadas e mantido em geladeira.

4.7.2. Extração de DNA

O método utilizado foi o de digestão enzimática com proteinase K, conforme descrito por Mahony *et al.* (1993). O material coletado foi inicialmente centrifugado a 10000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 500 µL de T.E. gelado. Para a extração do DNA das células escamosas orais, foram adicionados 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de tween 80 (10%) ao sedimento e incubados durante três horas a 37 °C. Em seguida, a proteinase K foi inativada no banho-maria a 100°C durante 10 minutos, sendo a solução obtida, que contém o DNA extraído, estocada a 20°C, até ser utilizada na reação de amplificação.

4.7.3. Amplificação do DNA através da técnica de PCR

Neste trabalho, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com os iniciadores MY09 / MY11. Os iniciadores de consenso, o MY09: 5'CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' e o MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3', descritos por Manos 1989, amplificam especificamente uma parte do gene L1, que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV, codificando uma proteína do capsídeo viral. Esses iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) do gene L1, tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV (Gross, 1999; Lancellotti,2000). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25

μL, sendo o tampão utilizado constituído por 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8,4), 15 mM de MgCl₂, 1% Triton X-100 (10 X concentrado), 200μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 12,5 pmoles de cada iniciador e 3 U de Taq DNA polimerase (*Taq pht*). Para cada reação de amplificação, foram utilizados 5 μL da solução, contendo o DNA extraído anteriormente. Em cada bateria de amplificação pela PCR sempre foi utilizado um controle negativo, constituído pelas mesmas concentrações e pelos mesmos reagentes da reação de amplificação, exceto o DNA. O sistema de amplificação do DNA foi realizado em tubos de 500 μL, que foram transferidos para o termociclador (MJ Research - PTC 100). O programa de PCR consistiu das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (95 °C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto) e 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Bauer (1993).

4.74. Considerações Finais

A técnica de PCR foi aplicada duas vezes em cada amostra, para avaliar a reprodutibilidade dos resultados. Além desse procedimento, também foi avaliado o controle negativo que não apresentou nenhum tipo de fragmento de DNA ou *primer-dimer*, demonstrando, assim, que não havia a presença de contaminações ou excesso de iniciadores (Kwok, 1989). Para avaliar a reprodutibilidade do método, as reações de amplificação foram repetidas duas vezes. Nos casos em que não houve reprodutibilidade do resultado, o ensaio foi repetido várias vezes, até a obtenção de um resultado reprodutível.

4.8. Testes aplicados para avaliar o diagnóstico

A análise da amostra foi realizada com o auxílio do programa SPSS para Windows 15.0 (Statsoft Inc, Tulsa-Ok) e com o cálculo dos testes de validade diagnóstica.

A análise descritiva foi feita através dos cálculos da média e da mediana.

Utilizou-se o teste de Fisher para analisar as correlações entre os diagnósticos citológicos e os histológicos.

As associações entre os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os achados morfológicos de alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus nos esfregaços citológicos foram analisadas pelo qui-quadrado de Pearson.

A validade diagnóstica foi estabelecida inicialmente correlacionando-se os diagnósticos citológicos com os histológicos, onde o diagnóstico histológico foi considerado como padrão ouro; posteriormente foram correlacionados o resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a presença de alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus nos esfregaços citológicos, onde a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi considerado o padrão-ouro. A análise da validade mostrou se o resultado final pode ser aceito como verdade ou o quanto ele se afasta da verdade.

Considerando-se o padrão-ouro como válido, foram encontradas quatro situações possíveis para a interpretação dos resultados do teste:

- Duas em que o ele foi considerado correto (verdadeiro-positivo e verdadeiro-negativo)
- Duas em ele foi considerado incorreto (falso-positivo e falso-negativo).

O teste foi correto quando positivo na presença da doença (verdadeiro-positivo) e negativo na ausência da doença (verdadeiro-negativo). O teste foi incorreto quando positivo na ausência da doença (falso-positivo) ou negativo na presença da doença (falso-negativo) (Pereira, 2001; Rouquayrol, 2003).

Esse conceito de correção/incorreção pode ser expresso por duas propriedades diagnósticas básicas, indicativas da validade do teste: a **sensibilidade** e a **especificidade**. Essas propriedades serão utilizadas nesse trabalho para avaliar:

- A validade do exame citológico no diagnóstico das lesões escamosas da cavidade bucal, onde a análise citológica é considerada o teste a ser julgado e a biópsia o padrão-ouro;
- A validade da presença de alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus nas células escamosas para o diagnóstico de HPV nos esfregaços citológicos, onde as alterações citopáticas são consideradas como o teste a ser julgado e a reação em cadeia da polimerase (PCR) o padrão-ouro.

A **Sensibilidade (S)** foi definida como sendo a capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}(a)}{\text{verdadeiros positivos}(a)+\text{falso-negativos}(c)} \times 100$$

No presente trabalho seriam os casos em que:

- O exame citológico e a biópsia diagnosticaram o carcinoma de células escamosas da cavidade bucal (Tabela 3);
- O exame citológico mostrou alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus e a reação em cadeia da polimerase (PCR) confirmou a presença do vírus (Tabela 3).

A **Especificidade (E)** foi definida como capacidade que o teste tem de detectar os verdadeiros negativos.

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}(d)}{\text{falso positivos}(b)+\text{verdadeiros negativos}(d)} \times 100$$

No presente trabalho seriam os casos em que:

- O exame citológico e a biópsia se apresentaram negativos (Tabela 3);
- Não foram encontradas alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus no exame citológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) não detectou HPV (Tabela 3).

A avaliação da probabilidade de que o teste venha a ser correto ou incorreto pode ser feita através do **valor preditivo**, ou seja, a probabilidade de que o teste venha a ser correto ou incorreto, dados os resultados do padrão-ouro.

O **Valor Preditivo Positivo** é a proporção de doentes considerados positivos no teste. Ou seja, seria o número de casos em que a citologia e a biópsia diagnosticaram carcinoma de células escamosas em relação ao total de citologias positivas e o número de casos em que a citologia e a reação em cadeia da polimerase diagnosticaram HPV em relação ao total de citologias positivas (Tabela 3).

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = \frac{\text{verdadeiros positivos}(a)}{\text{verdadeiros positivos}(a) + \text{falso positivos}(b)} \times 100$$

O **Valor Preditivo Negativo** é a proporção de doentes considerados sadios no teste. Seria o número de casos em que a citologia e a biópsia foram negativas em relação ao total de citologias negativas e número de casos em que a

citologia e a reação em cadeia da polimerase foram negativas para HPV em relação ao total de citologias negativas.

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = \frac{\text{verdadeiros negativos}(d)}{\text{falso negativos}(c) + \text{verdadeiros negativos}(d)} \times 100$$

Os laudos gerados a partir dos diagnósticos citológicos e histológicos serão comparados e os resultados apresentados sob a forma de gráficos e de tabela (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela de contingência correlacionando os diagnósticos citológicos e histológicos

		Resultado da Biópsia (padrão-ouro)	
		Presente	Ausente
Resultado da Citologia (teste)	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

As alterações citopáticas causadas pelo HPV nas células, presentes nos esfregaços citológicos, serão correlacionadas com os resultados da reação em cadeia da polimerase e apresentados na forma de tabela (Tabela 4).

Tabela 4 - Tabela de contingência correlacionando os achados morfológicos causados pelo HPV com a PCR.

		Resultado da PCR (padrão-ouro)	
		Presente	Ausente
Alterações Citopáticas de HPV na Citologia (teste)	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

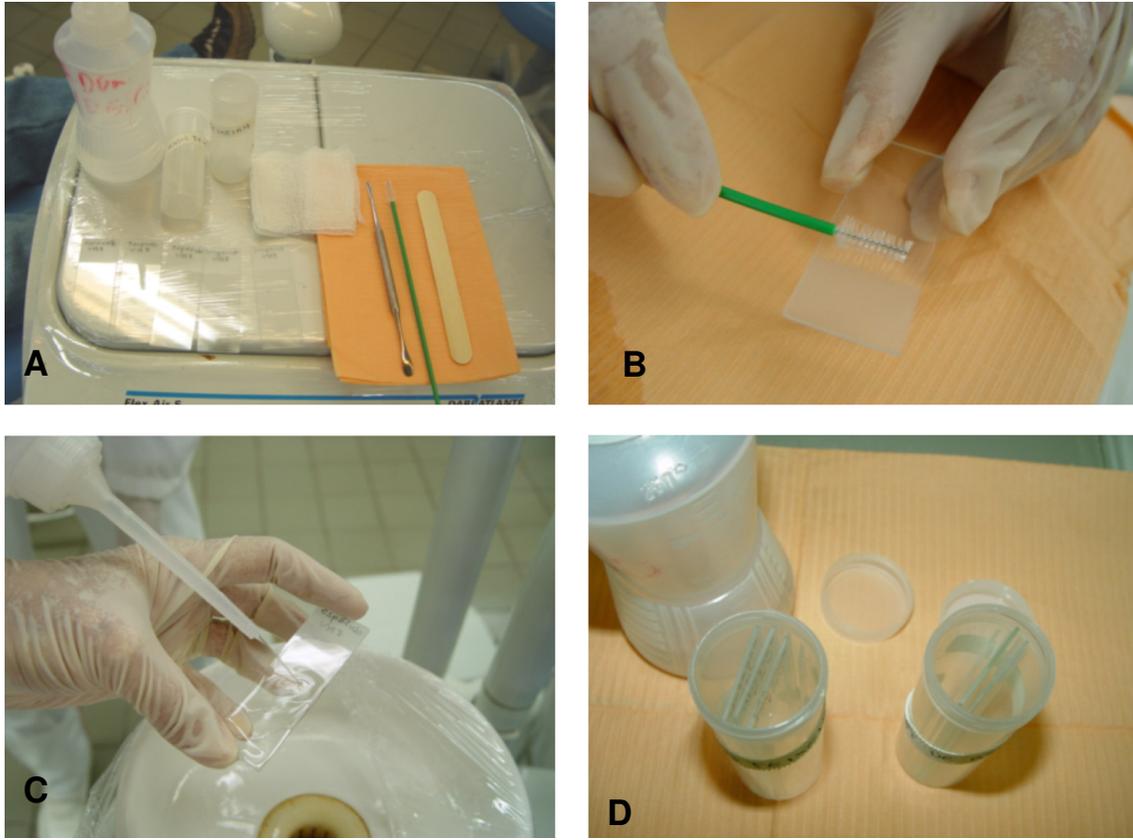


Figura 2 – **Coleta do material para exame citológico.** **A** - Material necessário para realizar a coleta citológica: escova e espátulas de metal e madeira, cinco lâminas (três para as colorações de rotina e duas para o PCR), fixador e frasco para acondicionar. **B** - Esfregaço sendo realizado no sentido longitudinal da lâmina. **C** - Fixação imediata com polietilenoglicol. **D** - Material acondicionado em 2 frascos sendo um para a rotina e outro para fazer o PCR.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra

No total foram avaliados 41 pacientes com lesões neoplásicas ou suspeitas de neoplasia bucal ou de alterações associadas ao HPV ou por estarem em acompanhamento após tratamento de câncer oral.

A maior incidência foi no gênero masculino sendo 33 (80,5%) homens acometidos e 8 (19,5%) mulheres (Figura 3)

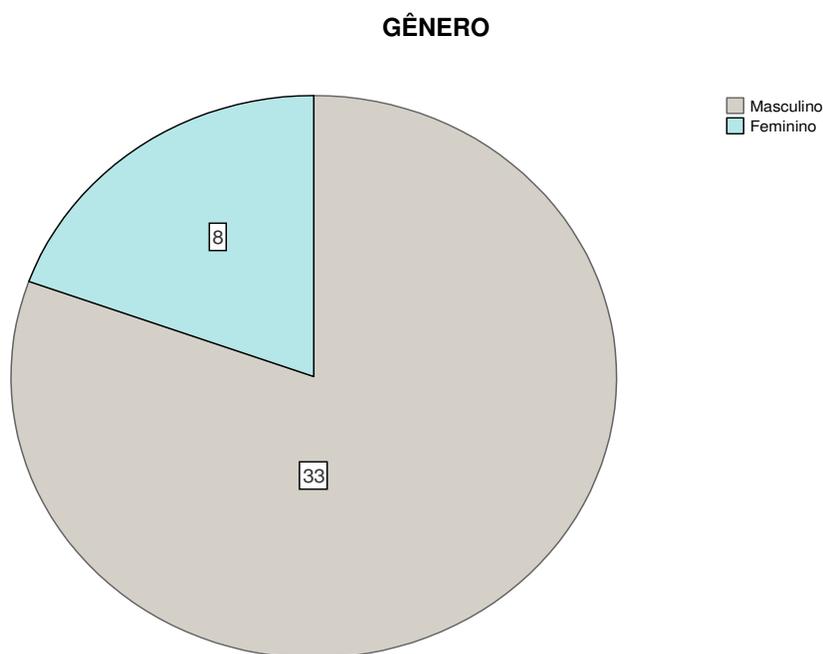


Figura 3 – Distribuição das lesões em relação ao gênero

A média de idade dos pacientes estudados foi de 54,41 anos e a mediana de 54 anos, sendo o paciente mais novo da amostra com 26 anos (gênero feminino) e o mais velho com 94 anos (gênero masculino) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das lesões em relação a freqüência do intervalo de idades

Intervalo de Idade	Freqüência	%
20a29	3	7,3
30a39	2	4,9
40a49	8	19,5
50a59	16	39,0
60a69	6	14,6
70a79	5	12,2
90a99	1	2,4
Total	41	100

Na análise da incidência quanto à localização das lesões, vê-se que elas foram mais freqüentes na língua e no assoalho da boca (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição das lesões em relação a localização na cavidade bucal

Localização	Freqüência	%
Mucosa jugal	1	2,4
Assoalho boca	10	24,4
Palato	8	19,5
Gengiva	6	14,6
Língua	15	36,6
Orofaringe	1	2,4
Total	41	100,0

A tabela 7 mostra todos os dados coletados dos pacientes (genêro, idade, diagnósticos citológicos e histológicos, local da lesão, etilismo, tabagismo, citologia e biópsia de controle e reação em cadeia da polimerase). Os dados designados como citologia e biópsia controle correspondem as diagnósticos dos pacientes em acompanhamento ou em tratamento.

Tabela 7 Todos os dados coletados durante a pesquisa

N	G	ID	DIAGNÓSTICO BIÓPSIA	DIAGNÓSTICO CITOLOGIA	LOCAL	ETI	TAB	CITOLOGIA CONTROLE	BIÓPSIA CONTROLE	PCR
1	M	45	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Mucosa jugal	SIM	SIM			
2	M	46	CEC bem diferenciado	CEC não ceratinizante	Assoalho da boca	SIM	SIM			
3	M	58	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Palato		SIM			
4	F	26	Carcinoma mucoepidermóide	Carcinoma mucoepidermóide	Palato	NÃO	NÃO			
5	M	68	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Gengiva	SIM	SIM			
6	M	66	Inconclusivo	ASC-H	Assoalho da boca	SIM	SIM			
7	M	61	CEC moder diferenciado	Cito controle	Palato	SIM	SIM	CEC ceratinizante	Ausência neoplasia	
8	M	36	Papiloma escamoso oral+ HPV	Inflamação	Palato					Negativo
9	M	45	Neoplasia maligna epitelial	CEC não ceratinizante	Assoalho da boca	SIM	SIM			Positivo
10	M	62	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Língua	SIM	SIM			Positivo
11	M	69	NIO III	Positivo para malignidade	Assoalho da boca	SIM	SIM	Alterações reativas associadas a radiação		Positivo
12	M	48	CEC pouco diferenciado	CEC não ceratinizante	Palato	SIM	SIM			Positivo
13	M	51	CEC moder diferenciado	ASC-H	Assoalho da boca	SIM	SIM			
14	M	50	NIO de grau I	Inflamação+hiperceratose	Gengiva	NÃO	SIM	Infl+hiper e paraceratose+ ativação nuclear		Positivo
15	M	57	CEC bem diferenciado	ASC-H	Língua	SIM	SIM			Negativo
16	F	50	CEC moder diferenciado	LIAG	Gengiva	NÃO	NÃO	ASC-H		Positivo
17	F	48	NIO de grau III	ASC-H	Assoalho da boca	SIM	SIM			Positivo
18	M	42	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Orofaringe		SIM			
19	F	50	CEC bem diferenciado	Inflamatório	Língua	NÃO	NÃO			Positivo
20	M	59	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Língua	SIM	SIM			
21	F	25	Papiloma escamoso oral	Inflamatório+ reação nuclear	Gengiva	NÃO	NÃO			Positivo
22	M	59	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Língua		NÃO			Positivo
23	M	50	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Língua					Positivo
24	M	36	Papiloma escamoso oral	Inflamatório+paraceratose	Gengiva	SIM	SIM			Positivo
25	F	45	NIO de grau I+HPV	ASC-H	Palato	SIM	SIM			Positivo
26	M	71	CEC bem diferenciado	CEC ceratinizante	Língua	NÃO	SIM			Positivo
27	M	75	Alterações reativas epiteliais	Inflamatório	Língua	NÃO	SIM			Positivo
28	M	55	CEC micro invasor	CEC ceratinizante	Língua	SIM	SIM			Positivo
29	M	51	CEC moder diferenciado	CEC não ceratinizante+HPV	Palato	SIM	SIM			Positivo
30	F	24	CEC bem diferenciado	Cito controle	Língua	NÃO	NÃO	Ausência malignidade		Positivo
31	F	73	CEC moder diferenciado	Cito controle	Língua	NÃO	NÃO	ASCUS		Positivo
32	M	65	CEC	Cito controle	Palato	SIM	SIM	Ausência de malignidade		Positivo
33	M	54	CEC moder diferenciado	Cito controle	Gengiva	SIM	SIM	Ausência de malignidade		
34	M	94	CEC pouco diferenciado	Cito controle	Língua	SIM	SIM	Ausência de		Positivo

35	M	44	diferenciado CEC moder	Cito controle	Assoalho da boca	SIM	SIM	malignidade Ausência de malignidade	
36	M	73	diferenciado CEC pouco	Cito controle	Língua	SIM	SIM	Ausência de malignidade	Positivo
37	M	59	diferenciado CEC pouco	Cito controle	Assoalho da boca	SIM	SIM	Ausência de malignidade	
38	M	75	diferenciado CEC bem	Cito controle	Assoalho da boca			Ausência de malignidade	
39-	M	54	diferenciado CEC bem	Cito controle	Assoalho da boca	NÃO	SIM	Inflamatório leve+hiperceratose	Positivo
40								Inflamatório acentuado+Reação nuclear	Positivo
41	M	53	diferenciado CEC bem	Cito controle	Língua	SIM	SIM	CEC ceratinizante	
			N – nº amostra	G – gênero	ID – idade	ETI – etiologia	TAB – tabagismo		
			PCR – reação em cadeia da polimerase						

Na tabela 8, que mostra a relação entre o tabagismo, o etilismo e o gênero dos pacientes, observa-se um menor número de pacientes porque não foi obtida a informação referente ao consumo de álcool em seis pacientes. A maioria (24 pacientes) fez uso do álcool e do tabaco concomitantemente, sendo que a incidência predomina no gênero masculino (22 pacientes do gênero masculino e dois do gênero feminino).

Tabela 8 - Correlação entre o tabagismo, etilismo e gênero.

ETILISMO	GÊNERO	FUMO		Total
		SIM	NÃO	SIM
SIM	Masculino	22		22
	Feminino	2		2
	Total	24		24
NÃO	Masculino	5	0	5
	Feminino	0	6	6
	Total	5	6	11
TOTAL		29	6	35

5.2. Análise dos resultados

Para realizar o estudo anatomopatológico dos 41 pacientes, a amostra foi dividida em dois grupos:

- Grupo das lesões **primárias**;
- Grupo das lesões **secundárias**.

Como **primárias** foram consideradas as lesões neoplásicas ou suspeitas de neoplasia, sem estabelecimento do diagnóstico anatomopatológico.

Como **secundárias** as lesões leucoplásicas, eritroplásicas ou tumorais, que surgiram na área de cicatrização cirúrgica de pacientes em acompanhamento pós-tratamento operatório e radioterápico por neoplasia bucal. Foram analisadas 28 lesões primárias e 13 secundárias.

A citologia esfoliativa foi realizada em todos os pacientes, conforme a técnica descrita anteriormente. Nos 28 pacientes com lesões primárias, nos quais o objetivo era o diagnóstico anatomopatológico para iniciar o tratamento, foi feita uma abordagem mono-cega, onde o patologista não tinha conhecimento do resultado da biópsia ao realizar o exame citológico. A biópsia foi considerada como padrão ouro. Nos pacientes com lesões secundárias, a citologia esfoliativa tinha como intuito detectar uma possível recidiva.

5.2.1. Diagnósticos citológicos e histológicos

5.2.1.1. Diagnósticos citológicos

Os **diagnósticos citológicos** realizados em todas as 41 lesões, estabelecidos de acordo com os critérios de Bethesda, são apresentados na tabela 9.

A incidência de carcinoma escamoso ceratinizante foi maior em relação às outras neoplasias. Atipias em células escamosas foram identificadas em seis casos, sendo um de significado indeterminado (**ASC-US**) e cinco possíveis lesões intra-epiteliais de alto grau (**ASC-H**). Retornando-se a Tabela 7, onde são apresentados todos os dados colhidos durante o trabalho, verifica-se que na realidade o diagnóstico de **ASC-H** foi feito seis vezes, sendo que em um deles o paciente tinha lesão intra-epitelial de alto grau, foi tratado e apresentou **ASC-H** posteriormente, na citologia de controle. O caso diagnosticado como **ASC-US** não foi biopsiado, por tratar-se de paciente em acompanhamento pós-tratamento operatório e radioterápico por neoplasia bucal (lesão secundária), tendo sido encaminhado para estudo molecular onde foi detectado HPV18, continuando em acompanhamento. Oito lesões foram classificadas como inflamatórias no esfregaço citológico. Os casos diagnosticados como ausência de malignidade corresponderam a esfregaços de pacientes em acompanhamento pós-tratamento operatório e radioterápico por neoplasia bucal (lesão secundária) que não apresentavam sinais de recidiva, embora tivessem freqüentemente alguns sinais de inflamação. O caso em que não foi possível definir a histogênese das células malignas examinadas foi diagnosticado como positivo para malignidade.

Tabela 9 - Diagnósticos citológicos das lesões, realizados em todos os pacientes

Diagnósticos	Frequência	%
CEC ceratinizante	12	29,3
CEC não ceratinizante	3	7,3
CEC não ceratinizante + HPV	1	2,4
Ca mucoepidermóide	1	2,4
ASC-H	5	12,2
ASC-US	1	2,4
HSIL	1	2,4
Positivo malignidade	1	2,4
Inflamação	3	7,3
Inflamação + hiperkeratose	2	4,9
Inflamação + reação nuclear	2	4,9
Inflamação + parakeratose	1	2,4
Ausência de malignidade	8	19,5
Total	41	100,0

5.2.1.2. Diagnósticos histológico

Os **diagnósticos histológicos** realizados em todo o material, apresentados na tabela 10, mostram que o carcinoma de células escamosas, diagnosticado em 29 casos, foi a lesão preponderante dentre as 41 amostras examinadas, sendo que os bem diferenciados, diagnosticados em 17 casos, foram mais freqüentes do que os pouco diferenciados, diagnosticados em quatro casos. Em um caso não foi estabelecido o grau de diferenciação da neoplasia, devido à exigüidade do material. Só foi observado um caso de alterações reativas epiteliais, provavelmente de origem inflamatória. As alterações citoarquiteturais por papilomavírus foram observadas ao exame histológico em somente um caso de papiloma escamoso oral e um de neoplasia intra-epitelial de grau I. Os outros dois

casos de papilomas escamosos orais não apresentaram alterações morfológicas características da presença do HPV.

As lesões intra-epiteliais foram em número de quatro, sendo duas representadas por **NIO I**, nas quais as alterações se restringiam ao terço inferior do epitélio escamoso oral e duas já sendo lesão de grau III, comprometendo todo o epitélio. Todos os diagnósticos foram realizados em fragmentos de biópsia incisional.

Tabela 10 - Diagnósticos histológicos das lesões, realizados em todos os pacientes

Diagnósticos	Frequência	%
CEC bem diferenciado	17	41,5
CEC moderadamente diferenciado	7	17,1
CEC pouco diferenciado	4	9,8
Carcinoma mucoepidermóide	1	2,4
Neoplasia maligna epitelial	1	2,4
NIO I	1	2,4
NIO I + HPV	1	2,4
NIO III	2	4,9
Carcinoma microinvasor	1	2,4
Papiloma escamoso oral	2	4,9
Papiloma escamoso oral+HPV	1	2,4
Alterações reativas epiteliais	1	2,4
CEC	1	2,4
Inconclusivo	1	2,4
Total	41	100,0

5.2.2. Lesões primárias

5.2.2.1. Análise dos resultados

Analisando separadamente os **diagnósticos citológicos** das lesões primárias vê-se que os resultados se assemelham aos da amostra como um todo,

sempre com predominância das lesões bem diferenciadas, o carcinoma de células escamosas ceratinizante (Tabela 11).

Tabela 11 - Diagnósticos citológicos das lesões primárias

Diagnósticos	Frequência	%
CEC ceratinizante	10	35,7
CEC não ceratinizante	3	10,7
Carcinoma mucoepidermóide	1	3,6
ASC-H	5	17,9
Positivo malignidade	1	3,6
HSIL	1	3,6
CEC ceratinizante+HPV	1	3,6
Inflamatório	3	10,7
Inflamatório+hiperceratose	1	3,6
Inflamatório+reação nuclear	1	3,6
Inflamatório+paraceratose	1	3,6
Total	28	100,0

Os resultados **histológicos** das lesões primárias se assemelham aos da amostra como um todo, com predomínio de lesões bem diferenciadas (Tabela 12).

Tabela 12 - Diagnósticos histológicos das lesões primárias

Diagnósticos	Frequência	%
CEC bem diferenciado	12	42,9
CEC moderadamente diferenciado	3	10,7
CEC pouco diferenciado	1	3,6
Carcinoma mucoepidermóide	1	3,6
Inconclusivo	1	3,6
Papiloma escamosos oral+HPV	1	3,6
Papiloma escamoso oral	2	7,1
NIO III	2	7,1
NIO I	1	3,6
NIO I+HPV	1	3,6
Neoplasia maligna epitelial	1	3,6
Alterações reativas epiteliais	1	3,6
Carcinoma microinvasor	1	3,6
Total	28	100,0

5.2.2.2. Correlação entre a citologia e a biópsia

A análise comparativa entre os diagnósticos observados nos exames citológicos e nos cortes histológicos foi feita somente para os 28 pacientes com lesões primárias, onde o estudo foi mono-cego, uma vez que ao realizar o exame citológico o patologista não tinha conhecimento do resultado da biópsia.

Na análise dos dados da tabela 13 observa-se que houve somente um caso de falso negativo, em que o diagnóstico citológico foi de lesão inflamatória e a biópsia mostrou tratar-se de um carcinoma de células escamosas bem diferenciado

Dentre os cinco casos em que ao exame citológico foram observadas células atípicas com possível lesão de alto grau (**ASC-H**) houve a seguinte correlação:

- Um foi interpretado como inconclusivo ao diagnóstico histológico, por possíveis problemas no processamento;
- Dois foram carcinomas de células escamosas;
- Outro foi uma neoplasia intra-epitelial de grau III;
- Finalmente o quinto foi uma neoplasia intra-epitelial de grau I associada a alterações citoarquiteturais causadas pelo papilomavírus.

Somente um carcinoma de células escamosas bem diferenciado foi diagnosticado como não ceratinizante ao exame citológico. O caso classificado como lesão intra-epitelial de alto grau ao exame citológico mostrou já se tratar de um carcinoma invasor ao exame histológico. Os dois casos de recidiva de carcinoma de células escamosas ocorreram seis meses e dois anos após o diagnóstico na lesão primária, respectivamente. Todos os três casos de papiloma escamoso oral foram diagnosticados como lesões inflamatórias ao exame citológico.

Tabela 13 – Correlação entre os diagnósticos histológicos (BIÓPSIAS) e citológicos

		BIÓPSIA													TOTAL	
		CEC BD	CEC MD	CEC PC	Ca mucoepidermóide	I	PEO + HPV	PEO	NIO III	NIO I	NIO I + HPV	NME	ARE	Ca Micro invasor		
C	CEC ceratinizante	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10
I	CEC não ceratinizante	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
T	Ca mucoepidermóide	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
C	ASC-H	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	5
L	Positivo malignidade	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
C	LIAG	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G	CEC não ceratinizante +HPV	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
I	Inflamatório	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3
A	Inflamatório+hiperceratos e	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Inflamatório+reação nuclear	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	Inflamatório+paraceratose	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL		12	3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	28

I – inconclusivo

NIO I – neoplasia intra-epitelial de grau I

NME – negativo para malignidade

CEC BD – carcinoma epidermóide bem diferenciado

CEC MD – carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado

CEC PD – carcinoma epidermóide pouco diferenciado

ARE – alterações reativas epiteliais

NIOIII – neoplasia intra-epitelial de grau III

PEO – papiloma escamoso oral

5.2.3. Lesões secundárias

5.2.3.1. Análise dos resultados

Os diagnósticos citológicos das lesões secundárias mostram que houve uma elevação no número total de citologias secundárias, passando de 13 para 16. Isto se deve ao acréscimo de mais três pacientes tratados inicialmente das lesões primárias e que já se encontravam em acompanhamento (Tabela 14).

A análise mostra que houve dois casos de recidiva de carcinoma de células escamosas e que apareceram células escamosas atípicas em dois casos, sendo um de significado indeterminado (**ASC-US**) e o outro de possível lesão intra-epitelial de alto grau (**ASC-H**). Um dos pacientes se encontrava em tratamento radioterápico, daí porque o exame citológico mostrou alterações reativas associadas à radiação. Os demais não apresentaram células neoplásicas no exame citológico ou tiveram alterações inflamatórias.

Tabela 14. Diagnósticos citológicos das lesões secundárias.

Diagnósticos	Frequência	%
CEC ceratinizante	2	12,5
Ausência malignidade	8	50,0
Alterações reativas da radiação	1	6,3
ASC-H	1	6,3
ASC-US	1	6,3
Inflamação+hiperkeratose+ativação nuclear	2	12,5
Inflamação+hiperkeratose	1	6,3
Total	16	100,0

5.3. Achados morfológicos

As características morfológicas que permitiram o diagnóstico de malignidade basearam-se principalmente nas alterações celulares, uma vez que a diátese tumoral não foi observada no material examinado.

Foram consideradas como malignas as células com tamanho e forma aumentada, com alteração da relação núcleo citoplasma, sendo os núcleos aumentados de volume, de bordas irregulares, com a cromatina grosseiramente

irregular e com macronúcleolos freqüentes. Essas células se dispunham de forma isolada ou mais freqüentemente em agregados (Fig. 4 A , B, C e D).

As alterações ceratóticas observadas nas neoplasias ceratinizantes, caracterizadas por hiperkeratose e parakeratose atípica (Fig. 5 A e B), só foram consideradas suficientes para a definição de carcinoma quando associadas as alterações nucleares e citoplasmáticas descritas acima.

A orangenofilia citoplasmática, conseqüente a ceratinização celular, foi um achado freqüente nas neoplasias ceratinizantes (Fig. 6 A e B). Nas neoplasias não ceratinizantes as células tinham menor volume, com citoplasma basofílico e menos proeminente, porém com características nucleares semelhantes às anteriormente descritas (Fig. 7 A e B).

Células com diferenciação escamosa, apresentando aumento do volume nuclear em relação ao citoplasmático, com núcleos hipercromáticos, ligeiramente irregulares ou múltiplos, foram consideradas como **células escamosas atípicas** (Fig 8 A).

Nos seis casos de ASC-H (Casos 6, 13, 15, 16, 17, 25,) foram observadas células parabasais com importante alteração da relação/núcleo citoplasma, sendo os núcleos ligeiramente irregulares e com alteração da cromatina (Fig 8 A e B; 9 A e B).

O caso diagnosticado como lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (Caso 16) foi constituído predominantemente por células imaturas, arredondadas, dispostas isoladamente ou em agregados. Apresentavam intensa alteração da relação núcleo/citoplasma, com o citoplasma escasso e o núcleo hipercromático, de bordas irregulares, sendo a cromatina fina ou grosseiramente granular (Fig.10 A e B).

No único caso de alterações reativas associadas à radiação (Caso 11) as células eram aumentadas de volume, algumas com forma bizarra, porém sem grande alteração da relação núcleo/citoplasma. Os núcleos foram ligeiramente aumentados de volume, pálidos, sem nucléolos proeminentes. O citoplasma apresentava certo grau de policromasia e vacuolização (Fig. 11 A e B).

As alterações inflamatórias observadas no exame citológico de lesões primárias corresponderam predominantemente aos casos de lesões clinicamente suspeitas, onde o diagnóstico histológico foi de papiloma escamoso oral (três casos) (Casos 8, 21, 24), neoplasia intra-epitelial de grau I (um caso) (Caso14) e alterações reativas epiteliais (um caso) (Caso 27). Os demais foram observados em áreas eritroplásicas ou leucoplásicas da mucosa oral de pacientes em controle pós-tratamento, os quais não foram biopsiados. Essas alterações foram representadas principalmente por halo claro péri-nuclear, policromasia e vacuolização citoplasmática e ligeira variação no tamanho dos núcleos. Essas alterações podem ou não estar associadas a hiperqueratose e parakeratose típica. Tais lesões foram incluídas na amostra por serem clinicamente suspeitas.

5.4. Correlação entre as alterações morfológicas e a presença de HPV

As alterações celulares associadas ao papilomavírus, halo claro perinuclear bem definido, com o citoplasma condensado na periferia, comportando um ou múltiplos núcleos aumentados de volume, de contornos ligeiramente irregulares, com a cromatina grosseira, borrada ou degenerada, chamadas de **coilocitose**, foram observadas em um caso de carcinoma de células escamosas e

no caso diagnosticado como **ASC-US**, onde a presença do coilócito foi um dado relevante para o diagnóstico (Fig 12 A e B).

Dentre todos os casos examinados, nove apresentaram alterações arquiteturais mal definidas que sugeriam papilomavírus, tais como multinucleação, halo claro citoplasmático mal definido e sem alteração da cromatina nuclear. Como essas células não preenchiem todos os critérios morfológicos para caracterizar o coilócito, não foram contabilizadas (Fig. 13 e 14 A e B).

A análise molecular para pesquisa de papilomavírus foi realizada em 26 das 41 citologias examinadas. Nesses 26 casos estão incluídas lesões primárias e secundárias. Foi utilizado o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa de HPV18, tendo sido encontrados resultados positivos em 92,3%, dos casos, representando 24 das 26 citologias examinadas. Na Fig. 13 pode ser observado o perfil eletroforético do DNA de HPV, amplificado com os iniciadores MY09/MY11. Nos dois casos em que a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi negativa a biópsia revelou tratar-se de um papiloma escamoso oral com HPV e de um carcinoma de células escamosas. Nos outros dois casos em que a citologia e a biópsia revelaram HPV, a reação em cadeia da polimerase (PCR) também foi positiva.

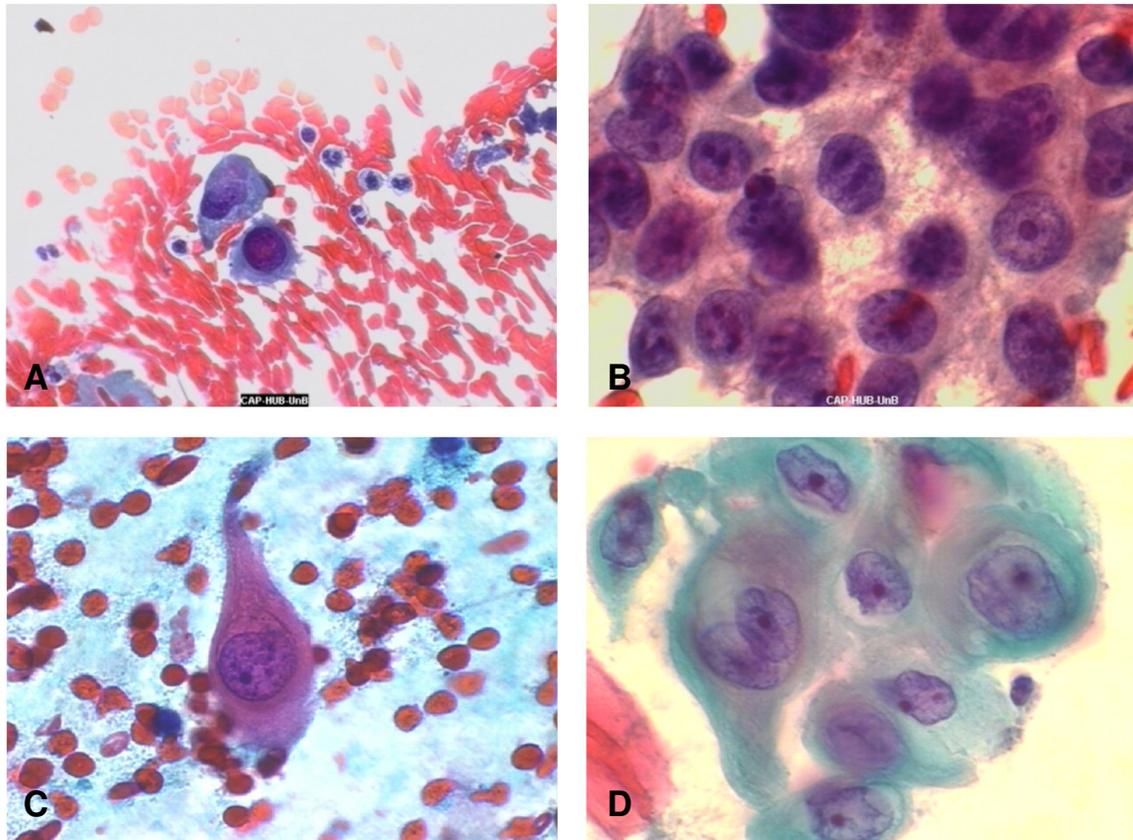


Figura 4 – **Células com alterações de malignidade.** **A** - Células com alteração da relação núcleo/citoplasma e com núcleos hiper cromáticos, de bordos irregulares. Papanicolaou 400x. **B** - Células com alteração da relação núcleo/citoplasma, com citoplasma eosinofílico e nucléolos proeminentes. Papanicolaou 1000x. **C** - Célula com a forma alterada, sendo o núcleo aumentado de volume, com nucléolo proeminente e citoplasma eosinofílico, ceratinizado. Papanicolaou 1000x. **D** - Células com alteração da relação núcleo/citoplasma e com núcleo aumentado de volume, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico. Papanicolaou 1000x.

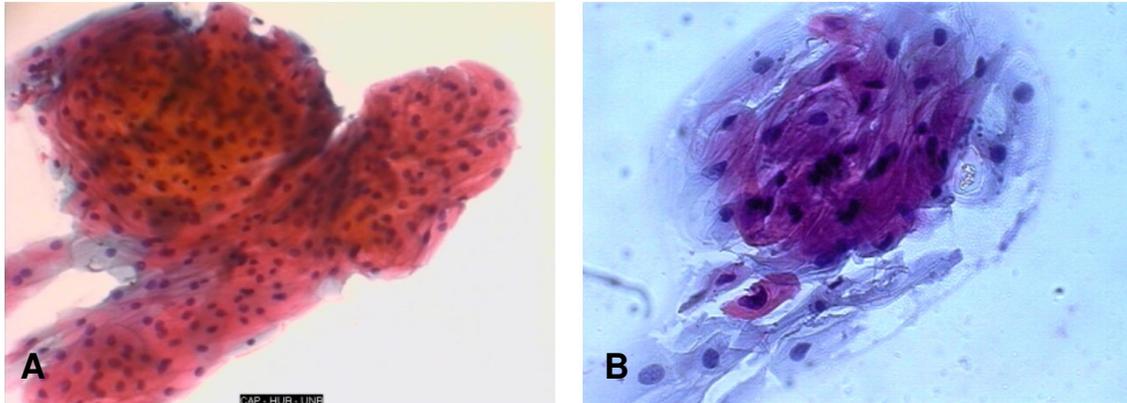


Figura 5 - **Paraceratose atípica.** **A** - Placas de células com citoplasma denso, orangeofílico com núcleos hipercromáticos e irregulares. Papanicolaou 200x. **B** - Placa de células mostrando os detalhes das alterações nucleares: núcleos hipercromáticos, de bordas irregulares e com alterações de forma. Papanicolaou 400x.

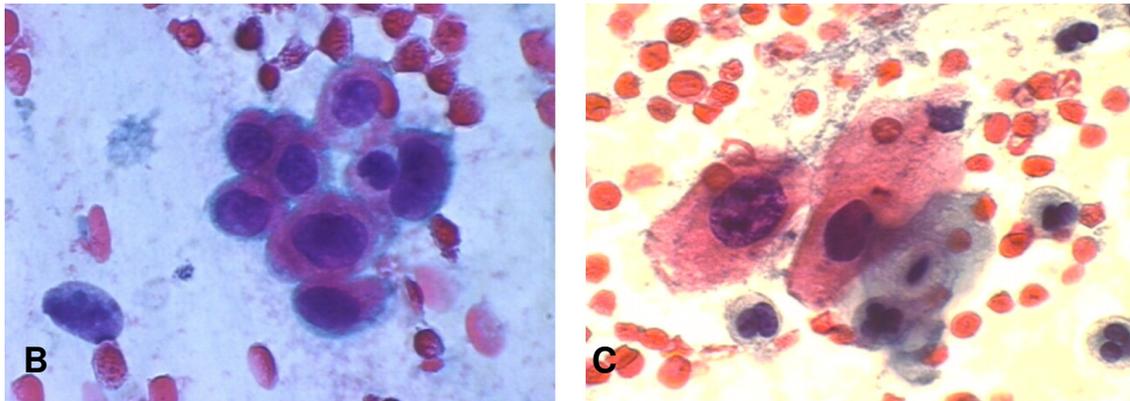


Figura 6 – **Carcinoma de células escamosas ceratinizante.** **A** - Células profundas ceratinizadas, com alteração da relação núcleo/citoplasma, núcleos hipercromáticos e de bordas irregulares e citoplasma densamente eosinofílico. Papanicolaou 1000x. **B** - Células profundas ceratinizadas, com citoplasma orangeofílico, núcleos aumentados de volume e com nucléolos proeminentes. Papanicolaou 1000x.

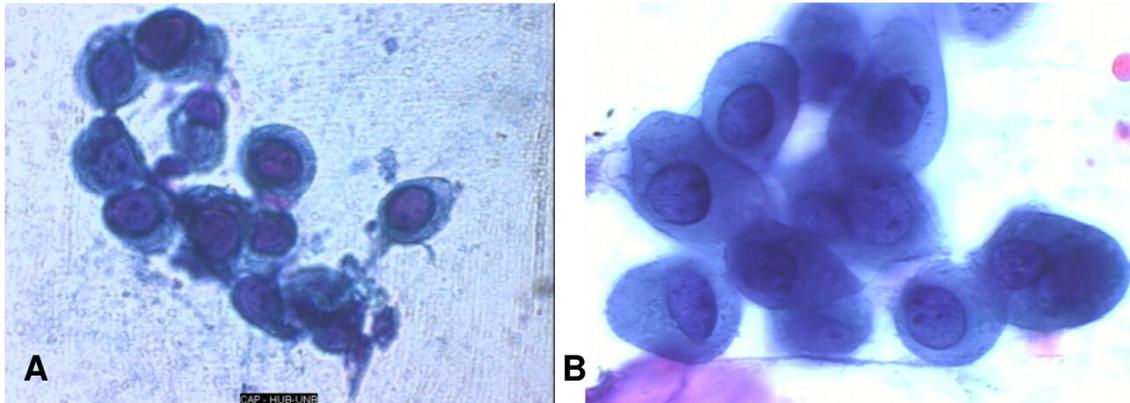


Figura 7 - **Carcinoma de células escamosas não ceratinizante.** **A** - Células com intensa alteração da relação núcleo/citoplasma, sendo o citoplasma escasso e o núcleo muito aumentado de volume, hiper cromático, de bordas irregulares. Papanicolaou 400X . **B** – Células com alteração da relação núcleo/citoplasma, sendo os núcleos hiper cromáticos e nucleolados. Papanicolaou 1000x .

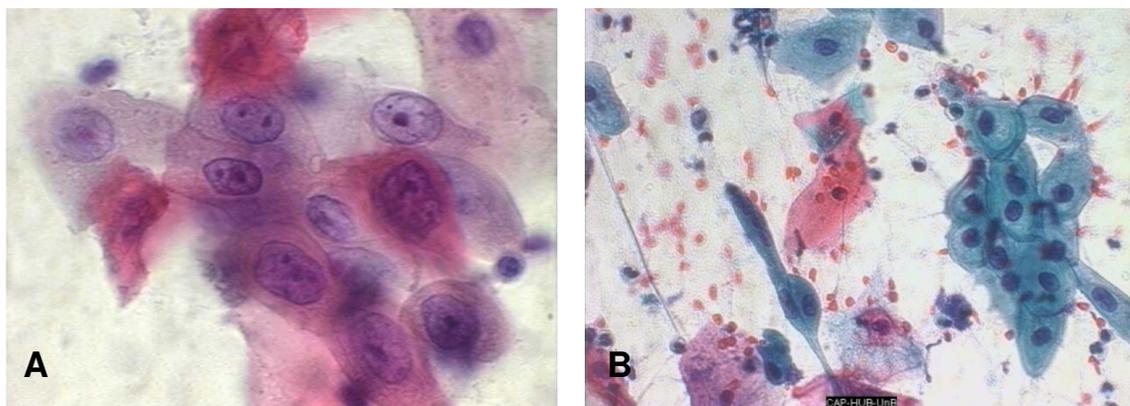


Figura 8 (A e B). **Células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau.** **A** - Células intermediárias com núcleos aumentados de volume, hiper cromáticos, irregulares e com o citoplasma ceratinizado. Papanicolaou 1000x. **B** - Células parabasais com núcleos aumentados de volume, com nucléolos proeminentes. Papanicolaou 1000x.

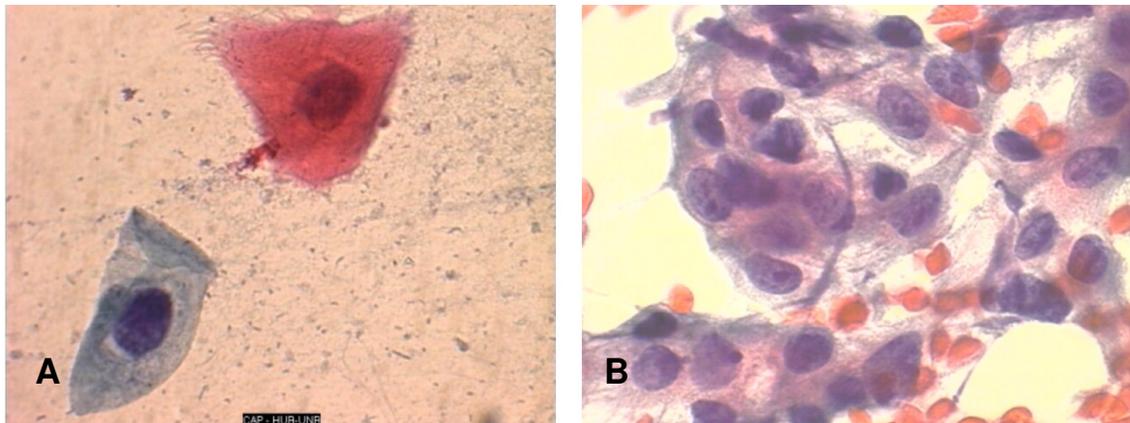


Figura 9 - (A e B). **Células escamosas atípicas onde não é possível excluir lesão de alto grau.**

A - Células escamosas com núcleos aumentados de volume, hiper cromáticos e citoplasma ceratinizado. Papanicolaou 1000x. **B** - Células parabasais com o formato alterado, núcleos aumentados de volume e nucléolos proeminentes. Papanicolaou 1000x.

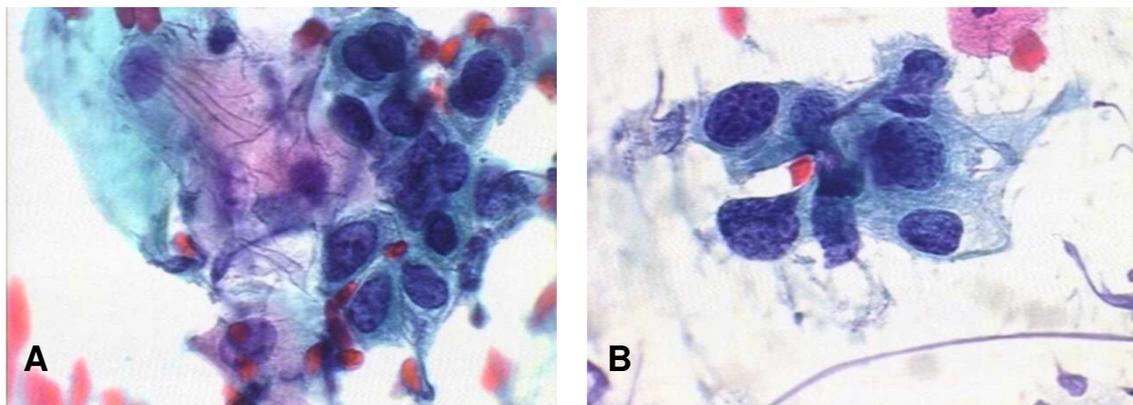


Figura 10 - **Lesão intra-epitelial de alto grau.** **A** - Células imaturas com alterações típicas de malignidade: alteração da relação núceo/citoplasma, com núcleos hiper cromáticos e nucléolos proeminentes. Papanicolaou 1000x. **B** - Células imaturas malignas: núcleos aumentados de volume, de bordas irregulares e cromatina grosseira. Papanicolaou 1000x.

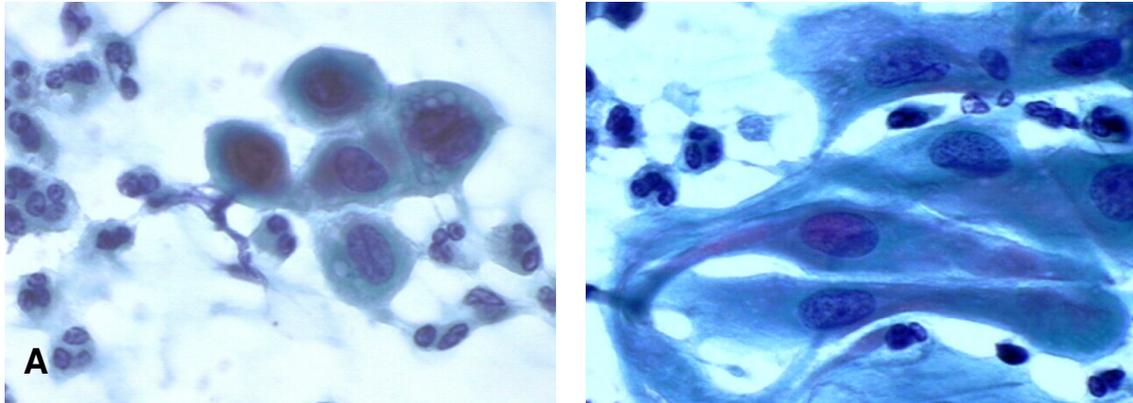


Figura 11 - **Alterações reativas associadas a radiação.** **A** - Células com núcleos ligeiramente aumentados de volume, sem nucléolos proeminentes e citoplasma pálido, vacuolizado. Papanicolaou 1000x. **B** - Células com forma bizarra. Papanicolaou 100x.

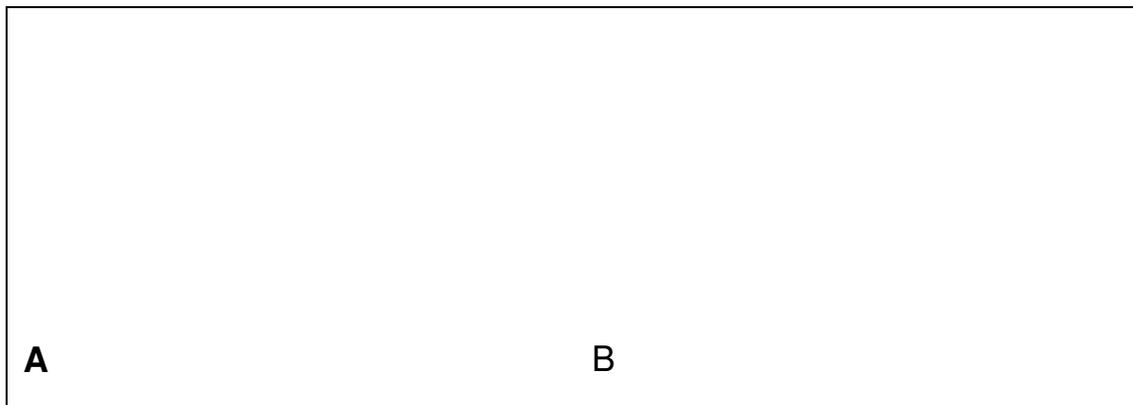


Figura 12 – **Coilócito.** **A** - Halo claro perinuclear bem definido, com bordos densos citoplasmáticos e núcleo aumentado de volume, de contornos irregulares, com a cromatina grosseira. Papanicolaou 1000x. **B** - Halo claro perinuclear bem definido, mais proeminente, com bordas densas citoplasmáticos e núcleo aumentado de volume, de contornos irregulares, com a cromatina grosseira. Papanicolaou 1000x.

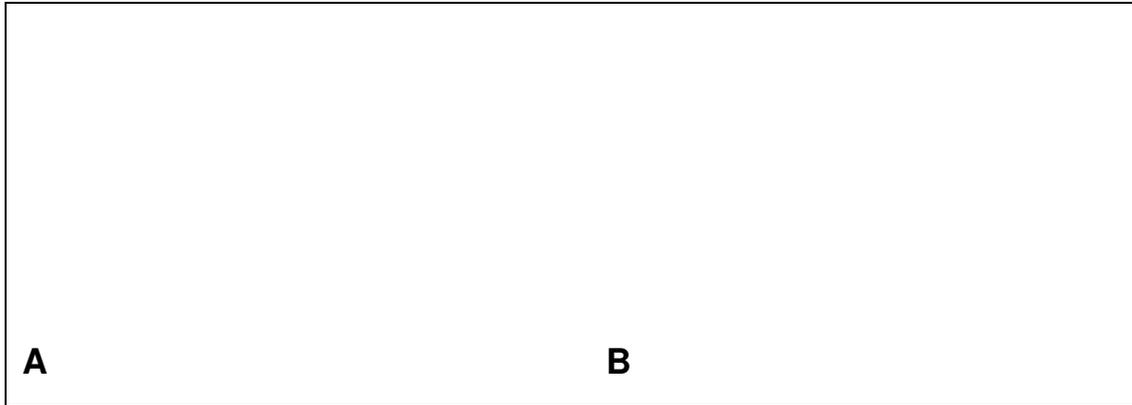
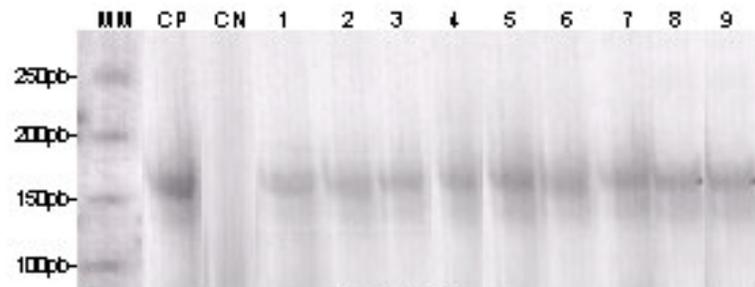


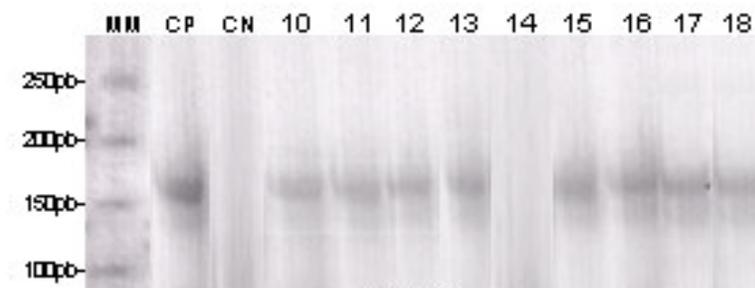
Figura 13 - **Esboço de coilocitose.** **A** - Células multinucleadas, porém com halo claro perinuclear mal definido e sem alterações nucleares bem significativas. Papanicolaou 1000x . **B** - Células multinucleadas, com halo claro perinuclear mal definido. sem alterações nucleares significativas e com o citoplasma ceratinizado. Papanicolaou 1000x.



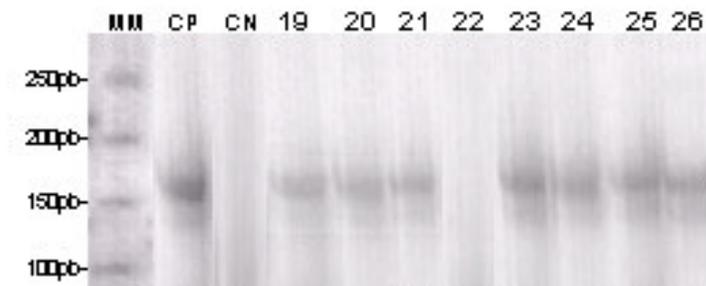
Figura 14 - **Esboço de coilocitose.** **A** - Células multinucleadas, porém com halo claro perinuclear mal definido e sem alterações nucleares bem significativas. Papanicolaou 1000x. **B** - Célula binucleada com halo péri-nuclear claro mal definido e pequeno. Papanicolaou 1000x.

Pacientes:**Caso 1****Caso 2****Caso 3****Caso 4****Caso 5****Caso 6****Caso 7****Caso 8****Caso 9****Caso 10****Caso 11****Caso 12****Caso 13****Caso 14****Caso 15****Caso 16****Caso 17****Caso 18****Caso 19****Caso 20****Caso 21****Caso 22****Caso 23****Caso 24****Caso 25****Caso 26**

HPV 18



HPV 18



HPV 18

Legenda:

MM = Marcador Molecular**CP** = Controle Positivo**CN** = Controle Negativo

Figura 15 - Perfil eletroforético do DNA de HPV 18, amplificado com os iniciadores MY09/MY11.

5.5. Estimativa de validade

Na estimativa da validade foi feita inicialmente a correlação entre os diagnósticos citológicos e histológicos colhidos através da citologia esfoliativa e da biópsia respectivamente. Posteriormente correlacionaram-se o resultado da análise molecular, feito pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com os diagnósticos citológicos.

5.5.1. Correlação entre os diagnósticos histológicos e citológicos

Os testes de validade, com o objetivo de avaliar a acuracidade do exame citológico no diagnóstico das lesões escamosas orais, foram aplicados para os 28 casos considerados como lesões primárias (Tabela 15), onde o diagnóstico anatomopatológico das lesões neoplásicas ou suspeitas de neoplasia foi estabelecido para iniciar o tratamento do paciente. Nesses casos a citologia esfoliativa foi colhida antes de realizar-se a biópsia, sendo portanto uma abordagem mono-cega, em que o diagnóstico citológico fez-se sem o conhecimento prévio do diagnóstico histológico. Os 13 casos de lesões secundárias não foram levados em consideração nessa análise, uma vez que se tratavam de pacientes em acompanhamento, cuja biópsia inicial para diagnóstico da lesão foi feita anteriormente.

Foram considerados como padrão ouro os diagnósticos realizados através dos cortes histológicos obtidos pela biópsia, sendo o resultado do exame citológico o dado a ser testado. Para a análise da validade levou-se em consideração os dados apresentados na tabela 15, que correlaciona o exame citológico com o histológico, onde foram considerados:

- Positivos nos exames citológicos os casos diagnosticados como carcinomas, lesões intra-epiteliais de alto grau (**LIAG**), atipias de células escamosas onde não é possível excluir lesão de alto grau (**ASC-H**) e positivo para malignidade nos exames citológicos;
- Negativos nos exames citológicos os casos diagnosticados como inflamatórios, hiperqueratose, paraceratose e reação nuclear;
- Positivos nos exames histológicos os casos diagnosticados como carcinomas, neoplasia intra-epitelial oral de grau III (**NIO III**) e neoplasia maligna epitelial;
- Negativos nos exames histológicos os casos diagnosticados como inconclusivo, neoplasia intra-epitelial oral de grau I (**NIO I**), papiloma escamoso oral, HPV e alterações reativas epiteliais.

Uma vez definidos esses parâmetros foi possível observar que, dentre os 28 casos de lesões primárias examinados, em **25 houve concordância** entre o exame citológico e o histológico, sendo que em 20 a citologia confirmou o diagnóstico de malignidade e em seis tanto a citologia como a biópsia foram negativos. Houve **um falso negativo** em que à citologia foi diagnosticado como lesão inflamatória e a biópsia mostrou tratar-se de um carcinoma epidermóide bem diferenciado, e **dois falsos positivos**, em que a citologia diagnosticou atipias de células escamosas onde não é possível excluir lesão de alto grau (**ASC-H**) sendo que em um a biópsia mostrou tratar-se de uma neoplasia intra-epitelial de grau I, portanto uma lesão de baixo grau com alterações arquiteturais causadas pelo papilomavírus e o outro foi inconclusivo (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise da acuidade entre o diagnóstico citológico e de biópsia

		BIÓPSIA		TOTAL
		Positivo	Negativo	
CITOLOGIA	Positivo	20	2	22
	Negativo	1	5	6
TOTAL		21	7	28

Efetuada-se os cálculos baseados na tabela 15 vê-se que a **sensibilidade** da amostra representada pelas 28 lesões primárias foi de 95% e a **especificidade** foi de 71% enquanto que o **valor preditivo positivo** foi de 90% e o **valor preditivo negativo** foi de 83%. O cálculo do teste de Fisher foi de 0,0011.

5.5.2. Correlação entre os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os achados de alterações citopáticas causadas pelo HPV no exame citológico

Os testes de validade das lesões escamosas orais, com o objetivo de comparar as alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus com os resultados da análise molecular feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), mostram que não houve correlação entre os exames citológicos corados pelo método de Papanicolaou e os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou HPV18 em 24 das 26 amostras, enquanto que no exame citológico em somente duas amostras foram evidenciadas alterações citopáticas de lesão viral.

A partir desse achado foi feita uma revisão nos esfregaços citológicos dos 26 casos examinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), numa

tentativa de reconsiderar os critérios morfológicos utilizados para diagnosticar HPV. Nessa nova análise foram considerados os seguintes critérios para diagnosticar HPV:

- **Critério maior** - presença do coilócito típico (células com halo claro perinuclear bem delimitado por um citoplasma denso, oranginofílico e núcleos densos, com alterações da cromatina) (Fig. 12 A e B).
- **Critérios menores** - células com binucleação, halo claro perinuclear mal definido e alterações nucleares menos exuberantes (Fig13 e 14 A e B).

Para fazer a correlação o padrão ouro foi o diagnóstico da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os exames citológicos os dados a serem testados. Foram considerados como **positivos** todos os casos que preenchessem os **critérios maiores**, como **inconclusivos**, aqueles apresentando os **critérios menores** e como **negativos**, os sem nenhuma das alterações acima mencionadas (Tabela 16).

Tabela 16 - Correlação entre o diagnóstico citológico de HPV e a reação em cadeia da polimerase

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
HPV	Positivo	2	0	2
	Negativo	13	1	14
	Inconclusivo	9	1	10
Total		24	2	26

Considerando-se todos os casos positivos e inconclusivos no exame citológico como indicativos de HPV poderemos calcular uma sensibilidade de 45%, uma especificidade de 50% e um qui-quadrado de Pearson de 0,884.

6. DISCUSSÃO

6.1. Considerações gerais

O exame citológico da cavidade oral é uma ferramenta diagnóstica importante que, quando bem orientada, permite não somente concluir o diagnóstico preciso das lesões, como também auxiliar no estabelecimento da terapêutica. Em lesões inflamatórias de origem autoimune como o pênfigo vulgar e o pênfigo vegetante, um esfregaço citológico realizado no teto ou na base de uma bolha fresca, recém aberta, revela a presença das células de Tzanck, que são células acantolíticas, com citoplasma denso e núcleos aumentados de volume, redondos, hipercromáticos, com a cromatina condensada na periferia e um volumoso nucléolo, que permitem concluir o diagnóstico por serem patognomônicas do pênfigo (De May, 1996).

Em lesões infecciosas, de origem parasitária ou viral, o exame citológico freqüentemente permite uma conclusão diagnóstica precisa. Um exemplo típico é o caso do herpes simples e do herpes zoster, em que o esfregaço obtido do líquido contido na bolha ou do material colhido com a espátula, no fundo da lesão ulcerada, permite visualizar as inclusões eosinofílicas (corpos de Lipschütz) no núcleo das células (Brian, 1963). Nas lesões parasitárias a visualização do parasita permite o diagnóstico preciso da lesão. Dentre as lesões parasitárias é importante lembrar aquelas que se apresentam clinicamente com um aspecto pseudo tumoral, como acontece freqüentemente com a paracoccidiodomicose, em que o esfregaço citológico permite o diagnóstico, podendo o clínico iniciar o tratamento, sem necessidade da biópsia (Arantes, 2004; Araújo, Souza, Correia, 2003).

Nas lesões neoplásicas, embora o exame citológico possa freqüentemente orientar o diagnóstico, a biópsia é sempre necessária, para confirmação do mesmo e estabelecimento da terapia. No acompanhamento das lesões pré-malignas do epitélio escamoso oral, sejam elas de baixo ou alto grau, a citologia esfoliativa é uma ferramenta importante. Enquanto as lesões de baixo grau nem sempre necessitam de biópsia, as de alto grau devem sempre ser biopsiadas, seja para exploração mais detalhada no sentido de afastar possível invasão ou para definir se o tratamento cirúrgico será mais ou menos agressivo.

No entanto, mesmo diante dessas possibilidades, a citologia esfoliativa não tem, na prática odontológica, o mesmo impacto que na rotina do atendimento ginecológico. Para justificar essa diferença são apresentados alguns motivos, dentre eles a pequena especificidade da mesma para identificar o tipo de lesão presente na boca e a facilidade de acesso para biópsia cirúrgica. Porém diante da análise da literatura, parece mais pertinente inferir que essa diferença se dá por:

- Falta de critérios claros para o diagnóstico citológico, como existe na rotina ginecológica;
- Falta de interação entre o citologista e o clínico cirurgião-dentista.

Por essa razão esse trabalho se propõe a usar os critérios de Bethesda no diagnóstico citológico das lesões bucais, de maneira a minimizar a diferença entre a prática de prevenção ginecológica e do câncer de boca.

6.2. O diagnóstico citológico oral - critérios de Bethesda

Como ocorre com as lesões de colo uterino, o exame citológico das lesões escamosas orais visa, sobretudo, confirmar ou afastar a possibilidade de neoplasia, a fim de que o clínico possa definir uma conduta adequada no tratamento do paciente. A terminologia utilizada na definição dessas lesões deve ser clara e precisa, não permitindo interpretações duvidosas, as quais poderão ser nocivas ao paciente. As classificações das lesões intra-epiteliais em alto, baixo e médio grau, sejam elas cognominadas displasias (displasia de baixo, médio e alto grau) ou neoplasias (neoplasia intra-epitelial de grau I, II e III) podem dar margem a dúvida interpretação, uma vez que o limite morfológico é, por vezes, tênue entre elas (Solomon, Nayar, 2004).

Um problema adicional seria a escolha do tratamento frente a uma lesão de grau intermediário (displasia de médio grau e neoplasia intra-epitelial de grau II), tendo em vista as dificuldades em prever a evolução das mesmas (Solomon, Nayar, 2004).

A classificação das lesões intra-epiteliais em baixo e alto grau pelo sistema de Bethesda veio não somente solucionar o problema do patologista, como deu ao clínico um limite mais preciso para definir sua conduta. O patologista ficou com critérios morfológicos mais definidos, uma vez que as lesões de baixo grau seriam aquelas sem grandes atipias citológicas, que acometem as células mais superficiais do epitélio escamoso, enquanto que as de alto grau comprometeriam as células escamosas mais profundas e teriam atipias mais definidas, como foi visto anteriormente. Os casos apresentando atipias que levassem a dúvidas quanto à interpretação por parte do patologista entrariam no grupo das células atípicas de

significado indeterminado (**ASC-US**) ou onde não é possível excluir lesão de alto grau (**ASC-H**). Essa classificação deu maior tranquilidade ao clínico para traçar sua conduta, uma vez que nas lesões intra-epiteliais de baixo grau o simples acompanhamento seria suficiente enquanto que as de alto grau necessitariam ser biopsiadas. Outra vantagem do sistema de Bethesda é que o patologista tem a possibilidade de dividir com o clínico a responsabilidade dos casos duvidosos, que seriam aqueles com a presença de células escamosas atípicas (Solomon, Nayar, 2004).

Nos esfregaços citológicos da cavidade bucal a diátese tumoral (esfregaço sanguinolento, com material necrótico e detritos granulares proteináceos no fundo) não pode ser tão valorizada quanto nos ginecológicos, onde ela é um indicativo de malignidade. Na cavidade bucal a presença de diátese tumoral não é tão evidente quanto nos esfregaços endocervicais; isso talvez se deva ao fato de que aí a saliva escorre freqüentemente sobre a lesão, limpando o material necrótico e sanguinolento que possa existir.

Outro dado importante a considerar é que na cavidade bucal ocorrem, com certa freqüência, traumas e lesões inflamatórias sem alterações malignas associadas, as quais podem causar sangramento e necrose dos tecidos.

Tanto na cavidade bucal como no colo uterino, as alterações epiteliais de caráter reativo que ocorrem no epitélio de revestimento podem se localizar na camada basal, com espessamento da mesma, como também nas camadas mais superficiais, com hiperqueratose e parakeratose. A valorização das áreas de parakeratose e hiperqueratose num esfregaço citológico da cavidade bucal não pode ser a mesma que àquela dada para as mesmas lesões no colo uterino. Isto se deve ao fato de que na cavidade bucal as lesões inflamatórias causadas por qualquer

fator irritativo tais como as próteses, traumas, mordeduras, doenças hereditárias, etc. freqüentemente causam espessamento do revestimento epitelial ou da camada de ceratina do mesmo, levando ao aparecimento de lesões brancas, que podem ser confundidas com lesões leucoplásicas. É importante observar que essas lesões brancacentas são de caráter inflamatório ou hereditário, não representando, portanto, um risco de neoplasia.

Considerando-se que essas alterações ceratóticas podem impedir a colheita de células mais profundas do epitélio, permitindo que uma lesão maligna passe despercebida, deve-se sempre ter uma atenção muito especial com as discretas alterações nucleares que possam ocorrer nas mesmas. Talvez fosse interessante quantificar essas alterações em **leve**, **moderada** e **intensa**, uma vez que as intensas poderiam ser interpretadas como um epitélio apresentando uma espessa camada de ceratina, a qual dificultaria mais ainda a colheita de células profundas, alertando o clínico para a possibilidade de um resultado falso negativo.

Na cavidade bucal atipias podem ser observadas em células das camadas basais e parabasais, que aparecem freqüentemente nas lesões ulceradas do epitélio escamoso oral. A designação de atipias escamosas em que não é possível excluir uma lesão de alto grau (**ASC-H**) pode ser utilizada nos esfregaços citológicos dessas lesões que apresentem células basais e parabasais com núcleos aumentados de volume, hipercromáticos, de bordas irregulares, com alteração de forma e irregularidades na cromatina. Deve-se, entretanto, ter muito cuidado em utilizar essa designação de atipias escamosas em que não é possível excluir uma lesão de alto grau (ASC-H) nas lesões de cavidade bucal, uma vez que dentre dos critérios de Bethesda essa nomenclatura se aplica principalmente às células

metaplásicas das lesões do colo uterino e na cavidade bucal elas são aplicadas às células basais e parabasais.

As atípicas de significado indeterminado (ASC-US) observadas nas células escamosas da cavidade bucal também necessitam de muito cuidado na interpretação. Isto talvez se deva ao fato de que na cavidade oral:

- As lesões nem sempre estão associadas ao HPV, sendo o álcool e o tabaco considerados os principais agentes etiológicos;
- As alterações citopáticas causadas pelo HPV nem sempre são exuberantes.

Como não se tem ainda bem definida a incidência da participação do HPV nas lesões escamosas malignas orais e como as alterações citopáticas causadas pelo HPV nessa localização nem sempre são exuberantes, foi aqui considerado que as alterações abaixo relacionadas têm um papel muito importante para definir as lesões intra-epiteliais de baixo grau na cavidade oral:

- Aumento da relação núcleo/citoplasma
- Graus variáveis de hiper cromasia nuclear, sendo a cromatina de distribuição regular embora grosseiramente granular
- Membrana nuclear de contorno ligeiramente irregular
- Binucleação e multinucleação
- Nucléolos ausentes ou diminutos
- Bordas citoplasmáticas distintas

Aplicando os critérios de Bethesda 2001 aos laudos dos exames citológicos orais, esses deveriam ter acrescentadas informações referentes a **adequacidade da amostra** e quanto a **interpretação do esfregaço examinado**. No item referente a **adequacidade da amostra** seriam levados em consideração os

critérios mínimos de celularidade escamosa anteriormente citados. Já na **interpretação de esfregaço**, o primeiro item a ser considerado seria a presença ou não de malignidade, informando-se posteriormente as alterações reativas observadas. O laudo proposto teria mais ou menos a seguinte conformação: *Esfregaço satisfatório ou insatisfatório para avaliação, negativo ou positivo para malignidade, com ou sem alterações reativas associadas à inflamação, especificando finalmente a presença ou não de alterações ceratóticas. As alterações inflamatórias poderiam ser graduadas em leves, moderadas e intensas.*

6.3. O HPV e o câncer oral

Ao analisar os resultados da pesquisa do HPV pelo método do PCR, vemos que os dados se assemelham aos estudos de Terai (1999), que encontrou HPV18 em 86,7% de amostras colhidas da mucosa normal de pacientes com e sem verruga de pele. No presente trabalho o HPV18 foi encontrado em 92,3%, ou seja, em 24 dos 26 casos examinados. Os índices talvez sejam um pouco mais altos na presente amostra devido ao fato de que se trata de pacientes com lesões evidentes na mucosa oral e não com infecção latente.

No presente estudo, nos dois casos em que o PCR não revelou a presença de HPV, um tratava-se de um papiloma escamoso oral (Caso 8), lesão benigna, provavelmente de etiologia viral, porém causada por outra cepa viral que não o HPV18. O outro (Caso15) não apresentou alterações morfológicas características de HPV, uma vez que nem o exame citológico nem o histológico revelaram a presença de alterações citopáticas de lesão viral.

Ao se tentar estabelecer uma correlação entre as alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus nas células dos esfregaços citológicos

corados pelo método de Papanicolaou e os resultados da análise molecular pelo PCR, vemos que as características morfológicas levadas em consideração para diagnosticar HPV no esfregaço citológico não foram satisfatórias, pois o HPV foi detectado em somente um esfregaço citológico (Caso 29) enquanto em 24 casos o resultado foi falso negativo, uma vez que o PCR mostrou a presença do vírus nos mesmos.

Considerando-se o exposto acima, foi feita uma reavaliação morfológica das 26 amostras, numa tentativa de definir as alterações citopáticas que o papilomavírus causava nas células escamosas descamadas da cavidade oral. O objetivo desse estudo foi aproximar o máximo possível os parâmetros morfológicos com a análise molecular. Inicialmente constatou-se que a presença de células anucleadas, ceratinizadas e disceratóticas, que no colo uterino podem alertar para a presença do HPV (Gompel, Koss, 1997), aqui elas não devem ser levadas em grande consideração, uma vez que, como vimos anteriormente, elas podem ser freqüentemente observadas em lesões decorrentes de outras causas. Outro dado a considerar foi que o coilócito típico (Fig. 12 A e B) foi o único dado morfológico que deu maior segurança ao patologista para pensar em alteração citopática causada pelo HPV, uma vez que as outras alterações, tais como presença de células com binucleação, halo claro perinuclear mal definido e alterações nucleares menos exuberantes (Fig 13 e 14 A e B) também podem ser observadas em outros processos inflamatórios (Gompel, Koss, 1997). Pelo exposto resolveu-se considerar, da mesma forma que Castro, Filho, 2006, como **critério maior** para indicação de HPV a presença do coilócito típico (Fig 12 A e B) e como **critério menor**, ou seja, sugestivos da presença de papilomavírus, porém não conclusivos, a presença de

células com binucleação, halo claro perinuclear mal definido e alterações nucleares menos exuberantes (Fig13 e 14 A e B).

Ainda para tentar estabelecer uma correlação mais próxima entre os dados morfológicos e a análise molecular, considerou-se como **positivos** todos os casos que preenchessem os **critérios maiores**, como **inconclusivos** aqueles apresentando os **critérios menores** e como **negativos** os sem nenhuma das alterações acima mencionadas (Tabela 16). O estudo molecular realizado pela PCR foi considerado o padrão-ouro. Mesmo utilizando-se esses artifícios vemos que a correlação entre os dados morfológicos e o resultado do PCR não é satisfatória uma vez que:

- Em somente dois casos, dados como positivos, foi observada a presença do coilócito típico;
- Mesmo se considerarmos todos os casos positivos e inconclusivos como indicativos de HPV vemos que a sensibilidade de 45% e a especificidade de 50% são baixas.
- Ainda considerando todos os casos positivos e inconclusivos como indicativos de HPV, o qui-quadrado de Pearson com um valor de 0,884 mostra que não há correlação entre os dois resultados.

Nos casos em que além das alterações citopáticas observadas pelo HPV observam-se as atipias nas células epiteliais escamosas a designação de lesão intraepitelial de baixo grau é mais aconselhável.

Pelo exposto acima vemos que os critérios de Bethesda podem perfeitamente ser aplicados aos esfregaços citológicos colhidos das lesões escamosas orais, desde que sejam observados os seguintes critérios:

- A presença de diátese tumoral não pode ser considerada um dado relevante como acontece nos esfregaços endocervicais;
- A valorização das áreas de paraceratose e hiperkeratose num esfregaço citológico da cavidade bucal não pode ser a mesma que àquela dada para as mesmas lesões no colo uterino;
- A designação de atipias escamosas em que não é possível excluir uma lesão de alto grau (ASC-H) deve se basear principalmente em alterações das células das camadas basal e parabasal, uma vez que as células metaplásicas não são freqüentes na cavidade oral;
- A designação de atipias escamosas de significado indeterminado (ASC-US) deve obedecer aos critérios acima relacionados
- Somente a presença do coilócito típico pode permitir o diagnóstico morfológico de HPV.

6.4. Acuidade do estudo citológico na avaliação das lesões escamosas orais

A maioria dos trabalhos mostrando a utilidade da análise morfológica do exame citológico no diagnóstico das lesões da cavidade oral data da sexta, sétima e oitava década do século passado (Tabela 17). A preocupação com a precisão do exame citológico da cavidade oral começou em 1950 com os primeiros trabalhos de Montgomery avaliando o esfregaço citológico de 15 pacientes com carcinoma de células escamosas oral, onde foram encontrados 13 casos positivos e 2 falsos negativos, assim considerados por apresentarem escassa celularidade. Posteriormente vieram os trabalhos de Sandler, Gardner, Dizner, Bánóczy, Silverman, Chomette, Rick e Perez (Tabela 17) mostrando que, apesar dos resultados falso positivos e falso negativos a técnica é sempre uma boa opção para

iniciar a investigação porque, além permitir detectar uma lesão possivelmente maligna ela é pouco invasiva, freqüentemente pouco dolorosa e de baixo custo. Os dados encontrados por Arantes (2004) mostram uma sensibilidade da técnica da citologia esfoliativa de 100%, especificamente quando utilizada para descartar malignidade em lesões bucais.

Atualmente, com a possibilidade aplicação das modernas técnicas de imunoistoquímica e biologia molecular nos esfregaços citológicos, o interesse pelo exame citológico da cavidade oral tem aumentado (Mehrotra, 2006; Castro, Filho, 2006; Diniz, 2004; Smith, 2004; Herrero, 2003; Terai, 1999).

Tabela 17 - Relação de casos da literatura em que o diagnóstico do câncer foi feito pelo exame citológico

AUTOR	ANO	Nº CASOS	CEC +(cito)	CEC (cito)	- FALSO +	FALSO -
Montgomery	1950	15	13	2	0	2
Sandler	1964	592	315	277	7	8
Gardner	1964	177	18	159		
Dizner*	1967	100	41	59	1	5
Bánóczy	1969	195	10	185	1	7
Folsom**	1972	1192	148	1041	6	64
Silverman	1977	27841	51	27790	4	10
Chomette	1980	140	117	23	15	11
Perez	2002	41	30	11	1	0
Rick***	2004	100	94	4	84	1

*O falso positivo foi um caso de pênfigo. Os 5 falsos negativos foram CEC intensamente ceratinizados. Quatro casos foram inconclusivos

3 inconclusivos * Dois casos foram inconclusivos

O questionamento maior que se faz com relação ao método são os resultados falsos positivos e falsos negativos, principalmente os falsos negativos, que podem dar ao clínico a segurança de que o paciente está bem, motivo pelo qual a repetição do exame ou mesmo a biópsia são necessários caso a suspeita clínica persista (Hammond, Sequeira, 1971).

Quanto aos resultados falsos positivos, quando se analisa a tabela 17, onde todos os diagnósticos citológicos foram comprovados por biópsia, observa-se que eles são mais freqüentes do que os falsos negativos, ou seja, é mais freqüente confundir um processo não neoplásico com uma neoplasia maligna, o que reforça a proposta de que a indicação da biópsia para confirmar o diagnóstico citológico é sempre uma conduta necessária. Dentre os processos não neoplásicos facilmente confundíveis com as neoplasias malignas deve-se ter especial atenção com a disqueratose intra-epitelial benigna hereditária, a doença de Darier, o nevus esponjoso de Canon, algumas infecções virais como o herpes, o pênfigo com a presença das células de Tzanck e a hiperqueratose oral difusa (Cahn, 1963). Em todas essas condições a história clínica do paciente poderá auxiliar na análise diagnóstica.

Ao realizar a análise da validade dos dados apresentados nesse trabalho evidencia-se que dentre os 28 casos das lesões consideradas primárias, ou seja, aquelas que não tinham diagnóstico no momento em que foi feito o exame citológico, em 26 houve concordância entre o diagnóstico citológico e o histológico, observando-se somente 2 falsos positivos e 1 falso negativo (Tabela 15).

O falso negativo talvez possa ser atribuído ao fato de tratar-se de um carcinoma bem diferenciado e, portanto com espessa camada de ceratina superficial (Figura 16A), a qual pode ter impedido a descamação de células profundas que

permitiriam o diagnóstico de malignidade. O esfregaço citológico não apresentou sinais de malignidade, mostrando-se constituído predominantemente por células da camada superficial sem alterações atípicas, notando-se somente a presença de uma única célula multinucleada com vacúolo perinuclear (Figura 16B) a qual, por não apresentar todas as alterações típicas de um coilócito, não foi considerada como alteração citopática por papilomavírus, embora a PCR mostrasse a presença de HPV18.

Quanto aos falsos positivos na realidade um trata-se de um caso em que o diagnóstico citológico mostrou células escamosas com núcleos aumentados de volume, ligeiramente irregulares, com a cromatina mais densa e o citoplasma orangeofílico (Figura 17 A e B). Foi feito o diagnóstico de atipias de células escamosas onde não é possível afastar lesão de alto grau e a o corte histológico mostrou um espessamento da camada basal restrito ao terço inferior do epitélio escamoso, tendo sido classificada como neoplasia intra-epitelial de grau I com alterações citoarquiteturais de HPV. (Figura 18 A e B). O outro falso positivo foi um caso em que houve problema no processamento histológico, sendo a biópsia inconclusiva.

Embora o uso da citologia esfoliativa em lesões ceratóticas seja questionado, considerando-se mesmo que ela seria útil somente para lesões iniciais ulceradas ou leucoplasas erosivas, quando observamos a tabela 17 vemos que existe uma variação razoável no índice de falsos positivos e falso negativos (Silverman, Bahl, 1977; Bánòczy, 1976; Folsom, 1972; Dalbelsteen, 1971). Uma análise mais geral dos resultados da tabela 17 mostra que os falsos positivos variam de 0% a 84% com enquanto que os falsos negativos variam de 0% a 64%. O cálculo da média dentre todos os falsos positivos e falsos negativos evidenciados na tabela

17 mostra que ela varia em torno de 10 casos tanto para os falso positivos como para os falsos negativos, o que é um valor razoável, considerando-se o total da amostra. A análise detalhada dos trabalhos individualmente mostra que os maiores índices de falsos negativos foram encontrados por Folsom, em 1972, os quais ele atribui as lesões ceratinizadas do vermelhão do lábio e da gengiva, onde a descamação se torna mais difícil.

Ainda analisando comparativamente os dados da tabela 17 com os resultados obtidos no presente trabalho, evidencia-se que a sensibilidade de 95% e a especificidade de 85% aqui observados são semelhantes aos valores descritos na literatura (Perez, 2002; Rick, 2003). Isso talvez se deva ao fato de que a maioria dos casos se tratava de lesões em estado avançado, ulceradas, em que as células facilmente esfoliavam, não havendo problemas para serem detectadas no esfregaço citológico.

As figuras abaixo são representativas das situações descritas como falsos negativos e falsos positivos.

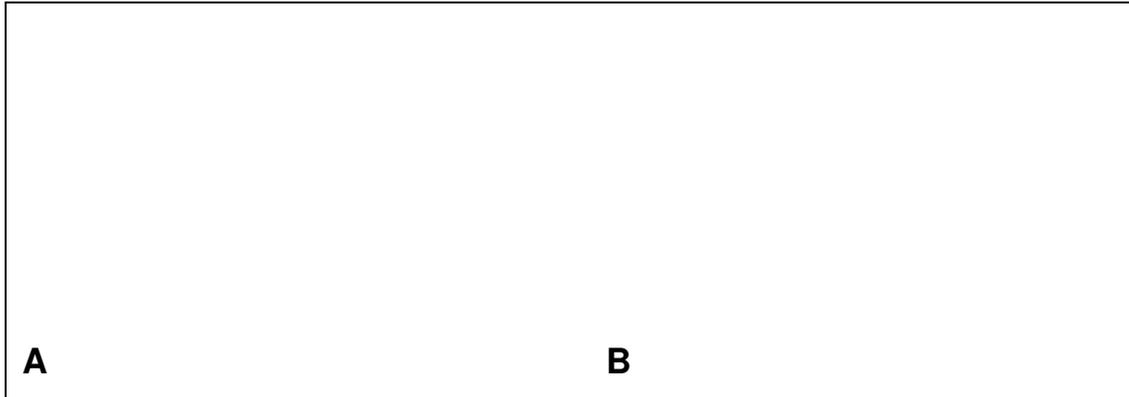


Figura 16- **Falso negativo.** **A** - Corte histológico da neoplasia com espessa camada de ceratina que não permite a descamação das células neoplásicas. HxE 100x. **B** - Esfregaço citológico contendo célula multinucleada com alterações que não preenchem todos os critérios para diagnosticar HPV. 1000xPapanicolaou.



Figura - 17 **Falso positivo.** **A** - Células escamosas com alterações atípicas com núcleos volumosos, nucleolados e escasso citoplasma. 1000x Papanicolaou. **B** - Células escamosas com alterações atípicas com núcleos de forma irregular, ligeiramente aumentados de volume e citoplasma orangeofílico. Papanicolaou1000x.

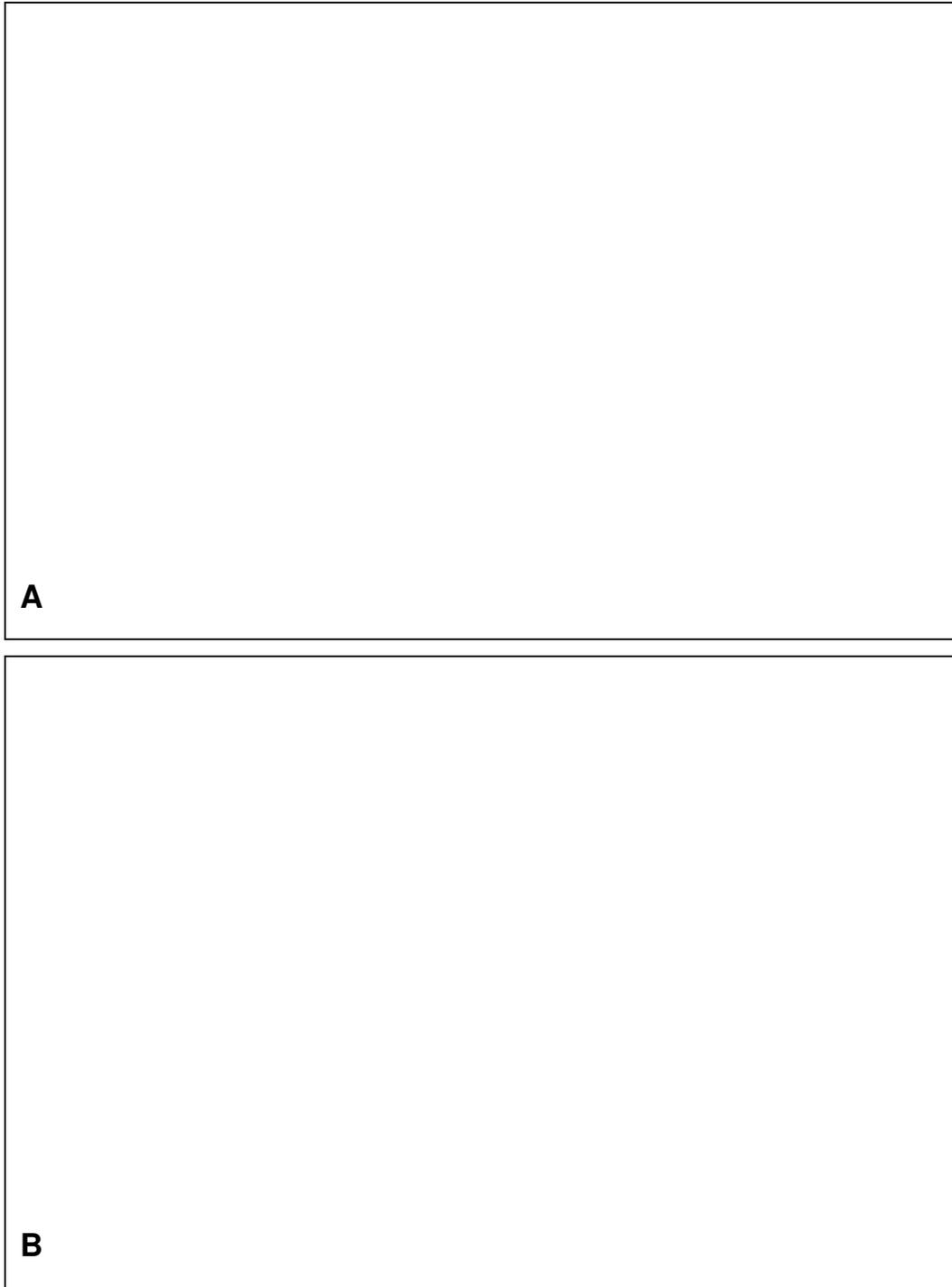


Figura 18 - **Falso positivo.** **A** - Corte histológico mostrando espessamento da camada basal. 100xHE. **B** - Corte histológico detalhando o espessamento da camada basal, o qual se estende por todo o terço inferior do revestimento epitelial. 200xHE

6.5. Relação HPV/câncer oral

Em contraste com o câncer cervical, os estudos epidemiológicos investigando a relação entre o HPV e o câncer oral são limitados e controversos, (D'Souza,2007; Smith,2004; Boy, 2006; Terai, 1999; Koch,1997; Syrjänen,1983). Enquanto alguns estudos mostram uma alta prevalência outros não confirmam tal achado (D'Souza,2007; Smith, 2004; Syrjänen, 1983; Boy,2006; Koch,1997).

O álcool e o tabaco são considerados os principais fatores de risco na gênese do câncer oral, sendo considerados por alguns autores como responsáveis por 75% dos casos observados (Sirjänen,2003; Herrero,2003). A maioria dos estudos admite haver um efeito sinérgico na ação do tabaco e do álcool, porém não consideram o mesmo com relação ao HPV, muito embora admitam a participação do HPV na etiologia do câncer oral (Sirjänen, 2003). Alguns desses trabalhos mostram não haver sinergia entre a presença do HPV e o uso do tabaco e do álcool, daí porque propõem dois padrões distintos para o desenvolvimento do câncer oral, sendo um resultante do efeito do tabaco e do álcool e o outro da instabilidade genômica induzida pelo HPV (D'Souza 2007; Smith, 1998).

Alguns desses estudos, como os realizados na África por Boy (2006), admitem que a baixa prevalência encontrada talvez se deva ao fato de que as cepas virais correlacionadas com o câncer oral naquela região possam ser outras que não os 16 e 18, que foram os pesquisados. Outros mostram que a cavidade oral pode ser considerada um reservatório de HPV, uma vez que é bem comprovada a presença de infecção subclínica e latente pelo HPV na mucosa oral normal, tanto por HPV de baixo como de alto risco, sendo o HPV18 o tipo dominante nestas infecções. (D'Souza,2007;Terai,1999; Syrjanen,1983). Por ser o HPV18 considerado um dos

tipos mais prevalente nas mucosas oral e anogenital, optou-se por pesquisar o mesmo no presente trabalho.

Nair, Pillai, 2005, relatam haver uma forte associação entre o carcinoma escamoso cervical e o oral e o alto risco de infecção pelos HPV16 e 18, enfatizando a importância do vírus na patogênese dessas lesões. No presente trabalho observou-se uma forte associação entre as lesões escamosas orais e o papilomavírus, uma vez que o HPV18 foi encontrado em vinte e quatro das vinte e seis amostras examinadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Em cinco desses pacientes, que são do sexo feminino, o álcool e o tabaco podem ser excluídos como fator etiológico, uma vez que eles não fumavam e nem bebiam, levando-se a pensar que o HPV se encontre fortemente envolvido na etiologia dessas neoplasias. Ainda em cinco outros pacientes o álcool pode ser excluído como fator etiológico, embora não se possa fazer o mesmo com relação ao tabaco, uma vez que eram pacientes que não bebiam, porém fumavam.

Contrariamente ao que ocorre na mucosa do colo uterino, aqui as alterações morfológicas causadas pelo HPV18 na célula escamosa foram pouco evidentes, notando-se a presença de coilocito típico em somente dois dos vinte e seis casos examinados (Solomon, Nayar, 2004; Gompel, Koss, 1997). Isso talvez se deva ao fato de que a saliva proteja as células escamosas orais dos efeitos carcinogênicos causados pelo HPV.

Considerando-se que o HPV18 é um dos tipos de HPV mais freqüentemente envolvido no câncer cervical e que no presente trabalho ele foi encontrado na maioria das amostras examinadas, a possibilidade de que a transmissão possa ter ocorrido por meio de sexo oral não pode ser totalmente afastada nestes pacientes (Gillison, Shah, 2003).

Concordando com o trabalho de Farshadpour (2007) foi encontrada neoplasia maligna de origem epitelial em seis pacientes do sexo feminino que não fumavam e não bebiam, sendo cinco com carcinoma de células escamosas e um com carcinoma mucoepidermóide.

A morfologia basalóide descrita por Gillison, Shah, 2003, nos tumores de vulva e região anal relacionados ao HPV não foi aqui observada nos cinco pacientes que não consumiam álcool e tabaco, nos quais o HPV18 foi considerado como possível agente etiológico da neoplasia.

Sabe-se que o uso de técnicas com variável sensibilidade e sensibilidade para detectar o DNA viral é um dos grandes responsáveis pelos diferentes valores (0 a 100%) encontrados na prevalência de HPV na mucosa oral (Boy, 2006; Campisi, 2004;.Miller, White, 1996). Utilizando o método da PCR Boy, 2006, detectou HPV18 em 7 de 59 casos examinados. Campisi, 2004, num estudo de caso controle analisando pacientes com leucoplaca e líquen plano oral encontrou o DNA do HPV em 17,6% das leucoplasas, 19,7% dos liquens planos orais e em 5,6% dos controles e Schwartz, 1998, também num estudo de caso controle de 725 pacientes, encontrou o DNA do HPV em 26% dos tumores. No presente trabalho foi encontrado o DNA do HPV18 em 92,3% da amostra, representando 24 casos positivos dentre os 26 examinados; esse alto índice de positividade talvez se deva a fixação imediata do material associada ao fato de que a coleta realizada com a escova do tipo endocervical de marca Kolplast retira uma quantidade maior de células esfoliadas.

6.6. Líquen plano e o câncer oral

O líquen plano oral é uma patologia que merece cuidados especiais por ser uma doença crônica, de longa evolução, com discutível potencial maligno, alguns estudos mostrando um índice de transformação maligna variando de 0 e 5,6% (Rajentheran 1999; Lo Muzzio,1998; Zhang,1997; Silverman, 1997; Gorsky 1996; Barnard 1993; Moncarz, Ulmansky, Luastmann, 1993; Voûte, 1992; Holmstrup, 1988; Murti,1986; Silverman,1985). Designações como doença de alto risco ou pré-maligna tem sido usadas para esta patologia. O termo pré-maligno tem sido desencorajado, uma vez que nele estaria implícito que todos os casos de líquen plano oral evoluiriam para um carcinoma escamoso, o que não é verdadeiro. (Silverman,2000). Estudos da carcinogênese dessas lesões mostram que existem diferenças no perfil molecular do líquen plano oral displásico e não displásico. As lesões com alterações displásicas apresentam perda de alelos (LOH) nos cromossomas 3p, 9p e 17p numa frequência maior do que aquelas sem displasia (Zang 1997)

Discute-se que no líquen plano oral ocorra um aumento na movimentação das células basais do revestimento epitelial, o que, na presença de iniciadores ou promotores da malignidade, predispõe ao desenvolvimento de clones malignos (Zang 1997). O mesmo fator, atuando num epitélio adelgado ou ausente, como aquele observado no líquen plano atrófico ou erosivo, pode ser um fator determinante do início da transformação maligna. Corroborando esses achados, estudos mostram que nas células da camada basal do líquen plano oral pode ser observada não somente a expressão das proteínas p53, MDL2 e Bcl-2 reguladoras

da apoptose, assim como um alto índice de mutação do gen supressor *p53* (Tanda, 2000, Ögmundsdóttir, 2002). Sabe-se que a proteína p53, produzida pelo gen *p53*, tem a função de manter a integridade do genoma, uma vez que, quando ocorre lesão no DNA da célula, ela atua de forma a impedir a reprodução da mesma, parando a divisão em fase S do ciclo celular e atrasando na fase G₁, induzindo assim os genes de reparo do DNA e restaurando o genoma. Quando essa reparação não é possível, a p53 normal induz a ativação dos genes que levam a apoptose. A proteína p53 localiza-se no núcleo da célula, tem meia-vida curta, 20 minutos, e, quando ocorre agressão ao material genético da célula, há um aumento rápido nos níveis da p53. O gen p53 é um gen supressor, homocigoto, localizado no cromossoma 17p13, que quando sofre mutação há lesão em ambos os alelos do mesmo, levando a produção de uma proteína anormal, que perde a capacidade de regular o ciclo celular, fazendo com que as células danificadas passem a se propagar de forma desordenada, levando a transformação maligna do tecido (Cotran, Kumar, Collins, 2005). A mutação no gen *p53* acomete mais do que 50% das lesões neoplásicas humanas e sua presença nas células basais do líquen plano oral leva a pensar que essas células tenham uma capacidade proliferativa maior, o que possibilita o desenvolvimento de neoplasias malignas oriundas das mesmas, corroborando assim a hipótese de transformação maligna do líquen plano oral.

Quando se analisa a tabela 18, observa-se que os grandes estudos publicados, nos quais foram usados critérios anatomopatológicos e clínicos bem precisos para o diagnóstico de líquen plano, mostram que num total de 5598 casos analisados a malignização ocorreu em somente 104. Dentre os 41 casos analisados no presente trabalho, observa-se um paciente portador de líquen plano oral e hepatite C, que posteriormente apresentou um carcinoma epidermóide bem

diferenciado em face dorsal da língua (Caso 22). A análise pela PCR mostrou a presença de HPV18 na amostra colhida desse paciente, o que possibilita levantar a hipótese de haver ou não um efeito sinérgico entre a ação do HPV, o vírus da hepatite C e o processo inflamatório decorrente do líquen plano.

Tabela 18 – Associação entre líquen plano oral e carcinoma escamoso oral

Autor	Ano	NC	País	AC	Tipo LPO	CasosCEC
Shklar	1972	600	USA	15a		4
Fulling	1973	225	Dinamarca	3,6a	Atrófico/erosivo	3
Kovesi	1973	274	Hungria	9a	erosivo	1
Silverman	1985	570	USA	5,6a	>erosivo	7
Murti	1986	702	Índia	5,1a	Atrófico	3
Holmstrup	1988	611	Dinamarca	7,5	Reticular e/ou atrófico	9
Salem	1989	72	Arábia Saudita	3,2a		4
Voûte	1992	113	Holanda	7,8a	Erosivo/reticular	3
Barnard	1993	241	Reino Unido	10a	Atrófico e/ou erosivo	9
Moncarz	1993	280	Israel	6a		8
Gorsky	1996	157	Israel	1,5a	Erosivo	2
Silverman	1997	95	USA	6,1	Atrófico/erosivo	3
Lo Muzio	1998	263	Itália	10a	Placa/reticular	14
Rajentheran	1999	883	Reino Unido	11a	Erosivo/atrófico/placa	7
Tanda	2000	10	Japão	4 a 8a		0
Mignogna	2001	502	Itália	4m a 12a	24 mistos*	27

NC – Nº casos AC – Acompanhamento

*Componente em placa foi o mais freqüente na associação

Embora o potencial maligno do líquen plano seja um fato discutível, o acompanhamento regular dos pacientes é um cuidado necessário, como preconizam alguns autores (Mattsson, Jontel, Holmstruo, 2002). Este acompanhamento poderá ajudar no sentido de detectar a transformação neoplásica em fase inicial, com conseqüente diminuição da morbidade e da mortalidade. A citologia exfoliativa pode ser uma ferramenta importante no acompanhamento desses pacientes com líquen plano oral, uma vez que não somente as alterações displásicas como também as transformações genéticas e moleculares podem ser detectadas nas células esfoliadas.

CONCLUSÃO

- A classificação de Bethesda é aplicável aos esfregaços citológicos provenientes da cavidade oral de pacientes portadores de lesões clinicamente suspeitas de malignidade, lesões benignas de provável etiologia viral e em acompanhamento após o tratamento do câncer oral, desde que sejam observados os seguintes critérios:
 - A diátese tumoral não pode ser considerada um achado relevante;
 - As áreas de paraceratose e hiperkeratose não podem ser muito valorizadas;
 - O diagnóstico de atipias escamosas em que não é possível excluir lesão de alto grau (ASC-H) deve se basear nas alterações das células das camadas basal e parabasal;
 - O diagnóstico de atipias escamosas de significado indeterminado (ASC-US) nem sempre pode se basear nas alterações morfológicas causadas pelo efeito citopático do HPV.

- As alterações morfológicas causadas pelo HPV nas células do revestimento escamoso oral não são tão exuberantes quanto àquelas observados na mucosa cervical, daí porque, na mucosa oral, o diagnóstico do efeito citopático causado pelo HPV não pode se basear na presença do coilócito, sendo necessária a análise molecular.

- A reação em cadeia da polimerase identificou HPV18 em 24 das 26 amostras examinadas.
- A citologia esfoliativa mostrou-se um exame o suficientemente sensível para detectar lesões malignas do epitélio escamoso oral, uma vez que foi observada uma sensibilidade de 95% na amostra examinada.
- A citologia esfoliativa é um boa forma de afastar malignidade na avaliação das lesões escamosas orais, uma vez que a especificidade foi de 71% nessa amostra.
- A citologia esfoliativa não é um bom exame para avaliar a presença ou ausência de HPV nas células escamosa da cavidade bucal, uma vez que sensibilidade e a especificidade na presente amostra foi de 45% e 50% respectivamente.
- A citologia esfoliativa é uma importante ferramenta que auxilia no exame da cavidade oral principalmente no estudo das lesões bolhosas, neoplásicas e infecciosas.
- Em paciente com líquen plano oral que apresentem perda da homogeneidade da lesão ao exame clínico, deve-se sempre fazer uma colheita citológica, uma vez que este pode ser o primeiro sinal de malignização.
- Nem sempre os casos clinicamente suspeitos devem ser biopsiados imediatamente, uma vez que existem lesões pseudotumorais, como é o caso da paracoccidiodomicose, em que o exame citológico permite o diagnóstico, sem necessitar de biópsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, A; et al. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) em el cáncer y precáncer oral. **Med Oral Patol Cir Bucal**, Valencia Mar, v. 19, n. 2, p. 95-102, apr. 2005.

ALVARENGA, CG et al. VMS. Papilomavírus humano e carcinogênese no colo uterino. **J Bras Doenças Sex Transm**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1 ,p. 28-38, 2000.

ARANTES, SB. **Citologia esfoliativa e biópsia aspirativa com agulha fina:** alternativas viáveis para o diagnóstico em estomatologia. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

ARAÚJO, MS; SOUSA, SCOM; CORREIA D. Avaliação do exame citopatológico como método para diagnosticar a paracoccidiodomicose crônica oral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v 36, n. 3, p 427-432, may/jun. 2003.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic changes in oral leukoplakia. **J Dent Res**, v. 48, n. 1, p.17-21, jan-feb.1969.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **Int Dent J**, v. 26, n. 4, p.398-406, dec. 1976.

BARNARD, NA et al. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v 22, n.9, p.421-424, oct. 1993.

BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus . In: PERSING, D.H. *et al.* (Ed.). **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**, Rochester: Mayo Foundation, 1993. cap. 2.16, p.407-413.

BHASKAR, SN. Oral exfoliativa cytology its uses and limitations. **Ark Dent J**, Arkansas, v. 36, n. 3, p.17-22, sep. 1965.

BOUDA, M. et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesion, but not in normal oral mucosa. **Mod Pathol**, Canadá, v. 16, n. 6, p. 644-653, dec. 2000.

BOY, S et al. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas- commensal, aetiological agent or contamination? **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 86-90, feb. 2006.

BRASILEIRO FILHO, G.. Bogliolo Patologia Geral. 3ªed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, 2004. 366p.

BRENER, S et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras de Cancerol**, v. 53, n. 1, p. 63-69 , 2007.

BRIAN, EDC. Exfoliative cytology in evaluation oral lesions. **J Dent Res**, v. 42, n. 1, p. 343-347, 1963.

BROOKS, PL. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n. 6, p. 1073-1082, sept. 1997.

CAHN, LR. Oral exfoliative cytology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v.16, n.11, p.1281-1283, nov. 1963.

CAMPISI, G et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. **Oral Radiol Endod**, St Louis, v. 98, n. 6, p.705-711, oct. 2004.

CASTRO, TPPG; FILHO, IB. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.72, n.2, p.272-82, mar-apr. 2006 .

CHOMETTE, G; AURIOL, M ; SZPIRGLAS.H. Cytologie exfoliative de la cavité buccale valeur pour la détection et le contrôle thérapeutique des cancers de la cavité buccale. **Arch Anat Cytol Path**, Paris, v. 28, n. 3, p. 169-173, fev. 1980.

COTRAN, RS, KUMAR, V, COLLINS, T. Robbins, Patologia Estrutural e Funcional. 7ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2005. 1592 p.

DALBELSTEEN, E et al. The limitations of exfoliative cytology for the detection of epithelial atypia in oral leukoplakias. **Br J Cancer**, London, v.25, n.1, p. 21-24, dec. 1971.

DE MAY, RC. The art & science of cytopathology. Aspiration cytology. 2ª. ed. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1996, vol.1, p-329-333.

DINIZ-FREITAS M, et al. Aplicaciones de la citologia exfoliativa en el diagnóstico del câncer oral. **Med Oral**, v. 9, n. 4, p. 355-61, aug-oct. 2004.

DIZNER, B; CARRARO, JJ; ALONSON, JC. La citología exfoliativa en el diagnóstico del câncer oral. **Rev Assoc Odont Argent**, Buenos Aires, v. 55, n.6, p. 232-236, jul 1967.

D'SOUZA, G et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 356. n. 19,1944-1956, may 10. 2007.

DYSON, N et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n.4893, p. 934-937, feb.1989.

EPSTEIN, JB; ZHANG, L; ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Dent Assoc**, v. 68, n.10, p. 617-621, nov. 2002.

EPSTEIN, JB et al. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 96, n. 1, p. 32-7, jul. 2003.

EPSTEIN, JB et al. The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 83, n.5, p. 537-547, may.1997.

FARSHADPOUR, F et al. Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. **Oral Dis**, London, v.13, n.2, p.239-243, mar. 2007.

FOLSOM, T, et al. Oral exfoliative study. **Oral Surg**, v. 33, n. 1, p.61-73, jan. 1972.

FULLING HJ. Cancer development in oral lichen planus. **Arch. Dermatol**, Copenhagen, v. 108, p. 667-669, nov. 1973.

GARDNER, A F. An investigation of the use of exfoliative cytology in the diagnosis of malignant lesions of the oral cavity. The cytologic diagnosis of oral carcinoma. **Acta Cytol**, New York, v. 8, n. 6, p. 436-45, nov-dec 1964.

GARDNER, A F. An investigation of 890 patients with cancer of the oral cavity: its incidence, etiology, prognosis and relationship to oral exfoliative cytology, **Acta cytol**, New York, v. 9, n. 4, p.273-280, jul-aug 1995.

GILLISON, AL; SHAH, KV. Role of mucosal human papillomaviruses in nongenital cancer. **J Natl Cancer Inst Monogr**, Oxford, v. 31, p. 57-65, 2003.

GOMPEL, C; KOSS, L. Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas. 1ªed. São Paulo-SP: Manole, 1997.200p.

GORSKY, M et al. Clinical characteristics and treatment of patients with oral lichen planus in Israel. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 82, n. 6, p. 644-649. dec.1996.

GRIMALDI, C. Citologia Oral. 1ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 159 p.

GROSS, G.E.; BARRASSO, R. **Infecção por Papilomavírus humano: atlas clínico de HPV**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

HAMMOND, HL; SEQUEIRA, EG. Oral exfoliative cytology as an aid in early cancer detection. **Iowa Dent J**, Iowa, v. 57, p. 34-37, feb 1971.

HELSPER, JT; SHARP GS. Exfoliative cytology for the detection of abnormal oral mucous membranes and early carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 17, n. 2, p.175-77, feb. 1964.

HERRERO, U et al . Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **J Natl Cancer Inst**, Oxford, v 95, n. 23, p. 1772-1783, dec. 2003.

HERRERO, U. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **J Natl Cancer Inst Monogr**, Oxford, v. 31, p. 47-51, 2003.

HINDLE, I; DOWER, MC; SPEIGHT, PM. The epidemiology of oral cancer **British J of Oral and Maxillofacial Surg**, Edinburgh, v. 34, n.5, p. 471-476, oct.1996.

HOLMSTRUP, P; THORN, JJ; RINDUM, J; PINGBORD, JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.17, n.5, p.219-225, march. 1988 .

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. [home page na internet]. Cancer incidence in five continents vol IX Disponível em: <<http://www.dep.iarc.fr>>. Acesso em 10 jan. 2008, 21:30:15.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/MS). [home page na internet] *Estimativa da incidência de mortalidade por câncer no Brasil*. Disponível em:<<http://www/inca.gov.br>>.Acesso em 10 jan. 2008, 22:10:15.

JACYNTHO, C; ALMEIDA GF; MALDONADO, P. HPV, infecção genital feminina e masculina. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.127p.

KÖVESI, G; BÁNÓCZY. J. Follow-up studies in oral lichen planus. **Int J Oral Surg**, v. 2, p. 13-19, march. 1973.

KOCH, A et al. HPV detection in children prior to sexual debut. **Int J Cancer**,v. 72, p. 621-624, jul.1997.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, London, v. 339, p. 237-238, 1989.

LANCELLOTTI,C.L.P et al. Diagnóstico Laboratorial. *In*: CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (Ed.). **I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus humano**. São Paulo: BG Cultural, 2000. cap. 4, p.45-60.

LO MUZIO, L et al. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. **Oral Oncol**, Oxford, v. 34, n.4, p.239-246, jul. 1998.

MAHONY, J.B et al. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, Washington D.C., v. 31, n.7, p.1753-1758, jul. 1993.

MANOS, M.M et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, New York, v. 7, p. 209-214, 1989.

MATTSSON, U; JONTELL, M; HOLMSTRUP P. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 5, p. 390-396, 2002.

MEHROTRA, R et al. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesion. **Mol Cancer**, Bio Mes Central, v. 5, n. 11, p.1-9, mar. 2006.

MIGNOGNA, MD et al. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in lichen planus: a 5-years experience. **Oral Oncol**, Oxford, v. 37, n. 3, p.262-267, apr.2001.

MILLER, CS; WHITE, DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. **Oral Sur, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod**, St. Louis, v. 82, n.1, p. 57-68, jul.1996.

MOLINA, PE et al. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.6, p.120-128, jan. 2002.

MONCARZ, V; ULMANSKY, M; LUSTMANN, J. Lichen planus exploring its malignant potential. **J Am Dent Assoc**. 1993;124:102-107.

MONTGOMERY, PW; VON HAAM, EV. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. **J Den Res**, v. 30, n. 1, p. 12-18, feb. 1951.

MONTGOMERY, PW; VON HAAM, EV. A study of the exfoliative cytology of oral leukoplakia, **J.D.Res**, v. 30, n.2, p. 260-264, april.1951.

MONTGOMERY, PW; VON HAAN, E. A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa. **J D Res**, v.10, n. 3, p.308-313, 1950.

MUNGER, K et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes, **J Virol**, USA, v. 63, n. 10, p. 4417-4421, oct. 1989.

MURTI, PR et al. Malignant potential of oral lichen planus: observation in 7222 patients from India. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.15, n.2, 71-77, mar. 1986.

NAIR, S; PILLAI, MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. **Oral Dis**, London, p.11, n. 6. p. 350-359, nov.2005.

NEVILLE, BW ; DAMM,DD; ALLEN, CM; BOUQUOT, JE. Patologia Oral&Maxilofacial. 2ªed. Guanabara Koogan ,2004. 798p.

ÖGMUNDSDÓTTIR, HM et al.. Oral lichen planus has a high rate of TP53 mutations. A study of oral mucosa in Iceland. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 3, p. 192-198, jun. 2002.

OKADA, MMK; GONÇALVES, MAG; GIRALDO, PC. Epidemiologia e patogênese do papilomavírus humano (HPV). **I Congresso Brasileiro de HPV**, nº1, São Paulo: BG Editora; 2000. 1; p.01-06.

PAPANICOLAOU, GN. Some improved methods for staining vaginal smears. **J Lab Clin Med**, v.26, p.1200-1205, 1941.

PEREIRA MG. Epidemiologia Teoria e Prática. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2001. 596p.

PÉREZ, OGR; LÓPEZ, MA; NAVARRO, MCA. Citología exfoliativa en el diagnóstico precoz de lesiones oncológicas bucales. **Rev Cubana Estomatol**, Habana, v. 39, n. 2, p. 1-6, may-aug. 2002.

PERUSSI, MR et al. Carcinoma epidermóide de boca em idosos. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 341-344, dec. 2002.

PURANEM, M et al. Vertical transmission of human pappilomavirus from infected mothers to they newborn babies and persistence of virus in childhood. **Am J Obstet Gynecol**, v.174, p. 694-699, feb. 1996.

RAJENTHERAN, R et al. A Malignant transformation of oral lichen planus. **Eur J Surg Oncol**, v. 25, n. 5, p. 520-523, oct. 1999.

REAGAN, JW; SEIDEMANN, IL; SARACUSA, Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. **Cancer**, Philadelphia, v. 6, n.2, p. 224-235, mar. 1953.

RICHART, RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin Obstet Gynecol**, New York, v. 10, n 4, p. 748-784, 1967.

RICK, GM; SLATER, L. Oral brush biopsy: the problem of false positive. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 96, n. 3, p. 252, sep. 2003.

RICKLES, NH. Oral exfoliative cytology: an adjunct biopsy, **C.A.Cancer J. Clin**, v. 22, n. 3, p.163-171, may-jun. 1972.

ROSENBLATT, C et al. HPV na prática clínica. 1ª ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. 285p.

ROSIN, MP et al. L Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clin Cancer Res**, Vancouver, v. 6, p.357-362, Febr. 2000.

ROUQUAYROL, MJ; ALMEIDA FILHO, NA. Epidemiologia & Saúde. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 708p.

SALEM, G. Oral lichen planus among 4277 patients from Gizan, Saudi Arabia. **Community. Dent Oral Epidemiolog**, Saudi Arabia, v.17, p. 322-324, apr. 1989.

SANDLER, AC. Reliability of oral exfoliative cytology for detection of oral cancer **J Am Dent Assoc**, v. 68, p. 300-499, apr.1964.

SANDLER, HC. Oral exfoliative cytology for detection of early mouth cancer. **Acta Cytol**, New York, v. 6, n. 4, p. 355-358, jul-aug. 1962.

SANDLER, HC. Veterans administration cooperative study of oral exfoliative cytology. **Acta Cytol**, New York, v. 7, n. 3, p.180-182, may-jun. 1963.

SCHEMAN, P. Mass survey for oral cancer by means of exfoliative cytological techniques. **Oral Surg Oral Med Oral Path**, St. Louis, v.16, n.1, p. 61-67, jan 1963.

SCHWARTZ, SM AT EL. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, Oxford, v. 90, n. 21, p.1626-1636, nov.1998.

SCULLY, C. Oral. Cancer; the evidence for sexual transmission. **Br Dent J**, London, v.199, n.4, p. 203-207, aug. 2005.

SEDLACEK, TV et al. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. **Am J Obstet Ginecol**, v.161, n.1, p.55-59, jully.1989.

SHKLAR, G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. **Oral Sur Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 33, n.3, p.376-388, march,1972.

SILVERMAN, S Jr et al. Cytologic, histologic and clinical correlations of precancerous and cancerous oral lesions in 57518 industrial workers in Gujarat, Indi. **Acta Cytol**, New York, v. 21, n. 2, p.196-199, mar-apr. 1977.

SILVERMAN, SJ. Ultrastructure observations of radiation response in oral exfoliative cytology, **Acta cytol**, New York, v. 13, n. 5, p. 292-301, mar-apr. 1969.

SILVERMAN, S; GORSKY, M; NUR-LOZADA, F; CALIF, SF. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 60, n. 1, p. 30-34, jul. 1985.

SILVERMAN, S. Prevention, early detection and diagnosis of oral cancer. **Dermatol. clin**, v. 5, n. 4, p.675-680, oct 1987.

SILVERMAN, S; BAHL, S. Oral lichen planus update: clinical characteristics, treatment responses, and malignant transformation. **Am J Dent**, v. 10, n. 6, p. 259-263, dec. 1997.

SILVERMAN, SJ. Oral lichen planus: a pothentially premalignant lesion. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.50, n.11, p.1286-1288, nov. 2000.

SMITH, EM et al. Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent developement of respiratory tract papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v 100, p.479-483, jun.1991.

SMITH, EM et al. Human papillomavirus and risk of oral cancer.**The Laryngoscope**, St. Louis, v. 108, n. 7, p. 1098-103, jul. 1998.

SMITH, EM e al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. **J Nat Can Inst**, Oxford, v 96, n.6, p. 449-455, mar 2004.

SMITH, EM et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. **Int J Cancer**, v.108, p. 766-777, sep. 2004.

SOLOMON,D; NAYAR, R. Sistema de Bethesda para citopatologia cervicovaginal. 2ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 192p.

STUDEMAN, KD et al. The effect of cellularity on the sensitivity of squamous lesions in liquid-based cervical cytology. **Acta Cytology**, New York, v. 47, p. 605-610, 2003.

SUGERMAN, PB, SAVAGE. NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. **Aust Dent J**, Austrália, v. 41, n 2, p.71-74, apr.1996.

SUNIL, R; ASHWORTH. S and L Microarray and histopathological analysis of tumors: the future and the past? **Nature Reviews, Cancer** v.1, p.151-157, nov. 2001. Disponível em:<http://www.nature.com/reviews/cancer>. Acesso em: 29 novembro 2006.

SYRJÄNEN, K et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int J Oral Surg**, v.12, n. 12, p. 418-42, mar 1983.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections and oral tumors, **Med Microbiol Immunol**, v.192, p.123-128, jan. epub 2003.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head an neck cancer. **J Clin Virology**, p. 32Suppl1, 1:s, p. 59-66, mar 2005.

TANDA N et al. Expression apoptotic signaling proteins in leukoplaka and oral oral lichen planus: quantitative and topographical studies. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29,N.8, p. 385-393, sep. 2000.

TENTI, P et al. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. **Obstet Gynecol**, v. 93, n. 4, p. 475-479, apr. 1999.

TERAI, M et al. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity adults. **Orl Microbiol Immunol**, Denmark, v 14, n.4, p. 201-205, aug.1999.

TIZEIRA, HEL, AGUAS SC, SANO SM. Transformation maligna del liquen plano bucal atípico: análisis de 32 casos. **Med Oral**, v. 8, n. 3, p. 2-9, jul-sep. 2003.

UMIKER, WO. Oral and laryngeal exfoliativa cytology. **CA Cancer J Clin**, v. 10, p.160-164, sep-oct.1960.

UMIKER, WO. Exfoliative cytology in radiotherapy of oral cancer. Its use in the diagnosis of residual carcinoma.**Radiology**, v. 75, p. 107-111, jul. 1960.

UMIKER W , MICH AA. Fluorescence microscopy in exfoliative cytology of oral carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis , v.14, n.10, p.1269-1274, oct1961.

VOÛTE, ABE et al. Possible premalignant character of oral lichen planus: the Amsterdam experience, **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 21, p. 326-329, mar.1992.

WESCOTT, BW; BRUCKNER, RJ. Oral exfoliative cytology. **Oregon State Dent Journal**, v. 5, n. 11, sep. 1965.

ZHANG, L et al. Molecular analysis of oral lichen planus. A premalignant lesion? **Am J Pathol**, v.151, n.2, p.323-327. aug. 1997.

De acordo com a ABNT NBR 6023:2002. Abreviaturas segundo Bases de Dados MEDLINE.