

JOÃO GUILHERME GABRIEL

**Progressão de lesões cancerizáveis da
cavidade bucal - análise por citometria
digital**

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Odontologia, concentração
em Estomatologia Clínica.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LILIANE SOARES YURGEL
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. VINICIUS DUVAL DA SILVA

Porto Alegre/RS

2006

Dedico esta tese à minha família

Agradecimentos

Em especial, à Orientadora, Professora Doutora Liliane Soares Yurgel, pelos ensinamentos e dedicação no desenvolvimento desta pesquisa.

Às professoras do Programa de Doutorado em Odontologia, concentração em Estomatologia Clínica, Professoras Doutoras Karen Cherubini, Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo e Maria Antonieta Lopes de Souza, pela atenção e pelos ensinamentos transmitidos, e pela compreensão dos momentos de ausência necessários para minha permanência em Porto Alegre.

Ao Professor Doutor Vinícius Duval da Silva, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, e pela cooperação na realização deste estudo.

Aos Professores Doutores que compuseram a banca examinadora deste trabalho, pela participação e críticas, e pelo tempo que dispuseram.

À minha esposa Hanae, pelos incentivos e pelos momentos em que não pude estar com você.

À minha mãe Neuza, meu pai Arlindo e aos meus irmãos Weberson e Eduardo, por sempre acreditarem em mim.

Ao meu sogro José Afonso e à minha sogra Yoko, que tantas vezes me ajudaram.

Aos colegas de Doutorado José, Sandra, Fabiana, Ivete e Flaviana, pela amizade e contribuições.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

“...O especialista é um homem que sabe cada vez mais sobre cada vez menos, e por fim acaba sabendo tudo sobre nada.”

Ao ler esta passagem de George Bernard Shaw, pensei: - estarei a caminho do nada?

Mas logo percebi que a concentricidade do raciocínio, da aplicação, do estudo e da dedicação vinculados à esta pesquisa aludiram-me à grandeza do saber, pois, posto que o conhecimento transcende horizontes em tão restrito tema, quiçá na complexidade intangível do universo.

Só então visualizei a amplitude das asas abertas pelo doutorado, que com um breve vôo sobre a filosofia e a ética, fez-me ver quão longe se pode chegar. E mesmo que o caminho agora traçado seja o afã do retorno à querência, a luz será a mesma, mas meus olhos não.

Resumo

Esta pesquisa teve como objetivo investigar o valor prognóstico do grau de ploidia, determinado por citometria digital, na predição da transformação maligna de lesões cancerizáveis da cavidade bucal. O trabalho analisou o emprego da citometria digital no estudo dessas lesões, comparando-a com a análise histopatológica convencional. Foram avaliadas biópsias seqüenciais de dezesseis pacientes, incluindo trinta lesões cancerizáveis e treze carcinomas, além de oito casos de hiperplasia fibroepitelial, totalizando cinquenta e uma lesões. Entre as vinte e seis biópsias de lesões cancerizáveis classificadas, metodologicamente, como lesões iniciais, sete não sofreram transformação maligna e dezenove progrediram para carcinoma. Entre o total de trinta casos de lesões cancerizáveis, doze expressaram padrão diplóide, quatro padrão tetraplóide e quatorze padrão aneuplóide. Dois dos carcinomas exibiram padrão tetraplóide e onze padrão aneuplóide. Com exceção de um dos casos de hiperplasia, que exibiu padrão tetraplóide, as demais foram classificadas como diplóides. A aneuploidia em lesões cancerizáveis relacionou-se fortemente com o processo de malignização. O padrão diplóide vinculou-se preferencialmente aos casos de lesões que não progrediram para carcinoma. O padrão tetraplóide exibiu características intermediárias. O emprego do grau de ploidia, determinado por citometria digital, mostrou maior eficácia na predição da malignização de lesões cancerizáveis da cavidade bucal, quando comparado ao emprego do grau de displasia epitelial dessas lesões como marcador prognóstico. A citometria digital oferece maior objetividade para a análise histopatológica, e pode auxiliar na definição de diagnósticos e na graduação da displasia epitelial.

Palavras-chave: Citometria digital, citometria por imagem, ploidia de DNA, lesão cancerizável, câncer bucal

Abstract

The objective of this research was to investigate the prognostic value of DNA ploidy, established by digital cytometry, in predicting which oral precancerous lesion will undergo malignant transformation. The application of digital cytometry in the study of these lesions was compared with conventional histopathologic analysis. Sequential biopsies from sixteen patients were analyzed, including thirty precancerous lesions and thirteen carcinomas, besides eight fibroepithelial hiperplasias, totalizing fifty one lesions. Among the twenty-six precancerous lesions classified as initial lesions, seven did not undergo malignization and nineteen progressed to carcinoma. Twelve of the thirty cases of precancerous lesion were diploid, four tetraploid and fourteen aneuploid. Two carcinomas showed tetraploid pattern and eleven aneuploid. Out of one tetraploid hiperplasia, the others were classified as diploid. The presence of aneuploidy in precancerous lesions was strongly linked to the malignization process. In the other hand, the diploid pattern showed relation with those lesions that did not developed cancer. The tetraploid pattern presented intermediaries characteristics. The DNA ploidy, established by digital cytometry, was more efficient then epithelial displasia graduation to predict which precancerous lesion will undergo malignant transformation. Digital cytometry offers more objectivity to histopathological analysis, and can be helpful in the establishment of diagnoses and in the determination of epithelial displasia grades.

Key words: Digital cytometry, image cytometry, DNA ploidy, precancerous lesion, oral cancer

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura do delineamento da pesquisa (adaptada de Flecher, Flecher e Wagner (2003), p.133).	36
Figura 2	Leucoplasia em bordo e dorso de língua.	37
Figura 3	Leucoplasia verrucosa em palato e rebordo alveolar superior.	38
Figura 4	Leucoeritroplasia em palato mole e arco palatoglosso	38
Figura 5	Líquen plano reticular em mucosa jugal.....	38
Figura 6	Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen . A: Carcinoma (400x). B: Hiperplasia fibroepitelial (500x).....	40
Figura 7	Fotomicrografias de mitoses atípicas – coloração de Feulgen (1500x). Observa-se a especificidade da coloração pelo DNA celular, apenas os núcleos são corados.	40
Figura 8	Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen (1000x). A: Núcleos de linfócitos corados (hemáceas não coradas). B: Núcleos de plasmócitos em tecido conjuntivo frouxo (fibras colágenas não coradas).	40
Figura 9	Seqüência de captação de fotomicrografias realizando movimentos em forma de letras gregas.	43
Figura 10	Preparo dos espécimes e coleta de dados.	44
Figura 11	Segmentação da imagem de um núcleo. A: processo de segmentação. B: Cariograma.....	45

Figura 12	A: Cariograma importado para o software Image-Pro Plus. B: Cariograma convertido para tons de cinza.	45
Figura 13	Janela de seleção das medidas.....	46
Figura 14	Cálculo da IOD. A: Imagem segmentada de um núcleo celular. B: Imagem em tons de cinza - (lupa: região ampliada em D). C: Escala de valores dos tons de cinza. D: Ampliação de região da imagem B - cada quadrado da grade representa um pixel e a soma dos valores dos tons de cinza de cada pixel determina o valor da densidade óptica integrada (IOD).....	47
Figura 15	Cálculo do fator de correção. A: Cálculo da média dos valores das IODs das células de mucosa bucal. B: Cálculo do valor de correção.....	48
Figura 16	Coeficiente de variância dos linfócitos. A: Cálculo do coeficiente de variância dos linfócitos de referência. B: novo coeficiente de variância após substituição de linfócitos e cálculo da média da IOD.....	49
Figura 17	Cálculo do valor diplóide. A: Valor médio da IOD dos linfócitos já calculado. B: Estabelecimento do padrão haplóide para cada cariograma, medida obtida pela multiplicação entre a média da IOD dos linfócitos do cariograma e o fator de correção.	50
Figura 18	Construção dos histogramas. A: Padronização dos valores da IOD. B: Determinação do grau de ploidia. O gráfico representa o histograma montado a partir dos graus de ploidia de cada célula.....	50
Figura 19	Classificação dos histogramas. A: Padrão diplóide. B: Padrão diplóide. C: Padrão tetraplóide. D: Padrão aneuplóide. Adaptado de Hagaroske et al. (1998).....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificações histopatológicas das biópsias, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	55
Tabela 2	Relação entre a classificação histopatológica e a transformação maligna das lesões cancerizáveis, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	56
Tabela 3	Classificações dos graus de ploidia das biópsias, Instituto de Pesquisa Biomédicas, Porto Alegre, RS – 2005.	59
Tabela 4	Relação entre o grau de ploidia e a predição para transformação maligna das lesões cancerizáveis, Laboratório de Anatomia Patologia do IPB/HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	60
Tabela 5	Diagnósticos histopatológicos e os graus de ploidia de biópsias seqüenciais, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	61
Tabela 6	Relação entre os diagnósticos histopatológicos e os graus de ploidia, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	62
Tabela 7	Distinção das classificações histopatológicas pela cariometria, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005.	64

Lista de Apêndices

Apêndice I	Termo de compromisso de cumprimento da resolução 196/96 do CONEP – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa.	91
Apêndice II	Ficha de coleta dos dados.	92
Apêndice III	Ficha de avaliação histológica.	93
Apêndice IV	Características cariométricas.....	94
Apêndice V	CD: planilhas com cálculos e medidas das células....	95
Apêndice VI	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 1A, 1B e 2.....	96
Apêndice VII	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 3 e 4.....	97
ApêndiceVIII	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 5, 6 e 7.....	98
Apêndice IX	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 8, 9 e 10.....	99
Apêndice X	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 11, 12 e 13.....	100
Apêndice XI	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas do caso 14.	101

Apêndice XII	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas do caso 15.	102
Apêndice XIII	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas do caso 16.	103
Apêndice XIV	Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas obtidos das hiperplasias fibroepiteliais.	104
Apêndice XV	Proposta para abordagem clínica das leucoplasias orais.	105

Anexos

Anexo A	Ciclo de vida celular.....	107
Anexo B	Protocolo laboratorial para realização da coloração de Feulgen.....	108

Sumário

1 Introdução	16
2 Revisão de Literatura	19
2.1 Ploidia celular	20
2.2 Quantificação do DNA por citometria digital	22
2.3 Citometria e as lesões da cavidade bucal	23
3 Proposição	33
4 Metodologia	35
4.1 Delineamento da pesquisa	36
4.2 População	36
4.3 Amostra e amostragem	36
4.4 Critérios de exclusão	39
4.5 Preparação dos espécimes	39
4.6 Coleta dos dados	41
4.6.1 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA DISPLASIA EPITELIAL	41
4.6.2 CITOMETRIA DIGITAL	41
4.6.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PLOIDIA	46
4.7 Análise dos dados	52
4.7.1 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER	52

4.7.2	RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE PLOIDIA E O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER.....	52
4.7.3	RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E O GRAU DE PLOIDIA.....	52
4.7.4	AVALIAÇÃO CARIOMÉTRICA E A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES.....	52
5	Resultados	53
5.1	<i>Caracterização da amostra</i>	54
5.2	<i>Relação entre a classificação histopatológica e o desenvolvimento de câncer</i>	56
5.3	<i>Classificação do grau de ploidia e o desenvolvimento de câncer</i>	57
5.4	<i>Relação entre a classificação histopatológica e o grau de ploidia</i>	60
5.5	<i>Avaliação cariométrica e a classificação histopatológica das lesões</i>	62
6	Discussão	65
6.1	<i>Considerações metodológicas</i>	66
6.2	<i>Freqüência dos padrões de ploidia</i>	71
6.3	<i>Progressão dos padrões de ploidia</i>	73
6.4	<i>Valor prognóstico da graduação da displasia epitelial e do grau de ploidia</i>	75
6.5	<i>Considerações finais</i>	78
7	Conclusões	79
	Referências	82
	Apêndices	90
	Anexos	106

1 Introdução

Embora o processo de carcinogênese não esteja completamente esclarecido, sabe-se que o câncer é uma doença genética na qual várias alterações são necessárias para induzir a conversão de uma célula normal em uma célula tumoral, incluindo mutações localizadas, ampliações e translocações de genes, além de deleções, recombinações mitóticas e falhas na divisão do conteúdo cromossomal.

Estes desequilíbrios genéticos podem causar a perda funcional de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes, favorecendo o surgimento de um fenótipo neoplásico.

Algumas patologias que acometem a cavidade bucal, tais como a leucoplasia, eritroplasia e o líquen plano, podem apresentar diferentes graus de displasia epitelial, e por estarem associadas com uma incidência aumentada de carcinomas espinocelulares, essas lesões são reconhecidas como *lesões cancerizáveis* ou *lesões precursoras de câncer*.

O desenvolvimento do carcinoma espinocelular, a partir de lesões cancerizáveis da cavidade bucal, manifesta-se por alterações histológicas onde se observa um aumento gradual da displasia epitelial e, por fim, o rompimento da membrana basal com subsequente invasão de células epiteliais no tecido conjuntivo subjacente.

Devido a essas alterações genéticas e morfológicas das células epiteliais displásicas, a forma do núcleo e o conteúdo de DNA nuclear podem estar alterados. No entanto, sob a luz da microscopia ótica convencional, a análise de sua morfologia pode ser subjetiva e ter baixa reprodutibilidade.

Com a técnica de citometria digital, pode-se avaliar o conteúdo de DNA nuclear (grau de ploidia), bem como aspectos morfométricos nucleares das células epiteliais e, assim, obter marcadores prognósticos para a transformação das lesões cancerizáveis da cavidade bucal em neoplasias malignas.

2 Revisão da literatura

2.1 Ploidia celular

Durante o processo de divisão celular, o conteúdo de DNA aumenta continuamente até atingir a duplicação do genoma (fase G₂), nessa fase, as células estarão em um estado tetraplóide (4C). Após esta etapa pré-mitótica, a célula entra na fase M (mitose), quando se divide, gerando duas células diplóides, que poderão entrar em repouso celular (G₀) ou continuar o processo de divisão (STRACHAN, 2002) (Anexo A).

De acordo com sua natureza e demanda fisiológica, cada tecido possui diferentes proporções de células nas distintas fases do ciclo de vida celular. Porém, em tecidos displásicos e neoplásicos, essas proporções podem estar alteradas, e padrões atípicos de ploidia celular podem ser observados (GOULANDRIS et al., 1996).

O grau de ploidia de uma célula pode ser definido pela quantidade normal de DNA nuclear, de acordo com a fase do ciclo de vida em que essa célula se encontra (HÖGMO et al., 1998).

Quando uma célula possui uma quantidade de DNA considerada normal para a fase do ciclo celular em que se encontra, é denominada como euplóide. Deste modo, uma célula somática euplóide, na fase de repouso celular (G₀), deve possuir um conteúdo diplóide, denominado 2C ou 2C ("C" de citometria). Por sua vez, durante a fase S do ciclo de vida celular, uma célula euplóide

pode apresentar um conteúdo de DNA entre 2C e 4C. Por fim, durante a fase G2 e início da fase M, uma célula somática euplóide deve apresentar um conteúdo de DNA equivalente a 4C (AUER et al., 1984).

A aneuploidia do DNA pode ser definida como desequilíbrios na quantidade de DNA de um núcleo, em relação à fase do ciclo celular em que a célula se encontra (AUER; ASKENSTEN; AHRENS, 1989).

Quando o *índice de DNA* de uma célula somática corresponde ao valor 1,0 (um), isto significa que ela possui uma vez o valor do conteúdo de DNA esperado para esta célula durante a fase de repouso do ciclo de vida celular, ou seja, 2C (AUER et al., 1984).

O conteúdo de DNA de uma célula aneuplóide pode ser hipodiplóide ou hiperdiplóide. As células diplóides em fase G2/M podem possuir conteúdo de DNA tetraplóide, e devem ser diferenciadas de populações celulares aneuplóides com *índices de DNA* próximos a 2,0 (2 vezes o valor de 2C) (HÖGMO et al., 1998).

Böcking, Giroud e Reith (1998) citam inúmeros fatores que podem alterar a quantidade de DNA nuclear, incluindo a replicação, a poliploidização, os ganhos e as deleções, as amplificações gênicas e as infecções por partículas virais, que somados, podem alterar o tamanho ou o número das cromátides. Segundo os autores, outros fatores, como terapia citostática, radioterapia, deficiência de vitamina B12, apoptose, autólise e necrose, também devem ser considerados durante a avaliação do conteúdo de DNA.

2.2 Quantificação do DNA por citometria digital

A reação de Feulgen, introduzida por Feulgen e Rossenbeck em 1924, é considerada a técnica de eleição para coloração estequiométrica de DNA, onde ocorrem ligações químicas mol a mol, conferindo propriedades quantitativas a essa coloração. Assim, há uma relação constante entre a quantidade de substrato e o número de moléculas de corante. Desse modo, por meio de aparatos ópticos, aplicados à lei de Lambert-Beer, é possível determinar a concentração de substrato, com base na mensuração da quantidade de corante (SCHULTE; WITTEKIND, 1990).

A citometria digital tem sido empregada há mais de 30 anos, e evoluiu substancialmente com os adventos da tecnologia. Entre suas aplicações estão a implementação de maior objetividade e reprodutibilidade na análise histopatológica, e a quantificação de marcadores imunoistoquímicos e de componentes celulares e teciduais, tal como a quantificação de DNA nuclear (BAAK; JANSEN, 2004). Baak e Jansen (2004) definem o termo “morfometria” como a descrição quantitativa de características de um objeto ou estrutura (número, comprimento, largura, volume e forma). Citometria é definida como a quantificação de um componente químico celular ou tecidual, tal como a ploidia celular e proteínas marcadas com agentes imunoistoquímicos.

Baak e Jansen (2004), em uma análise crítica ao emprego da citometria digital, citam diversos fatores que podem interferir na técnica, tais como a qualidade do espécime e seu processamento, fatores associados aos equipamentos (calibração, magnificação, potência e estabilidade da fonte de luz), aspectos inerentes à segmentação dos objetos ou área de interesse e o processo de seleção dos objetos (seletivo ou randomizado).

Essa técnica não quantifica diretamente o conteúdo de DNA nuclear, mas, por comparação cromodensitométrica, estima a quantidade de DNA de um núcleo, tendo como parâmetro os núcleos de células com a quantidade de DNA conhecida. Para que isso seja possível, é necessário que a coloração tecidual empregada seja de natureza estequiométrica, ou seja, diretamente proporcional à quantidade de DNA contida em uma célula (WHEELESS et al., 1993; BAAK; JANSEN, 2004).

2.3 Citometria e as lesões da cavidade bucal

Doyle e Manhold (1975) foram dos precursores no emprego da citometria digital para avaliação do grau de ploidia de lesões da cavidade bucal. Os autores quantificaram o conteúdo de DNA de 33 lesões da mucosa oral, sendo 10 carcinomas, 16 leucoplasias e 7 hiperplasias. Todas as hiperplasias apresentaram padrão diplóide, enquanto apenas 30% dos carcinomas e 25% das leucoplasias exibiram esse padrão, sendo as demais lesões aneuplóides.

Pfizer e Pape (1975) analisaram os histogramas de distribuição de frequência dos graus de ploidia construídos a partir de monocamadas de núcleos celulares, obtidas de 22 lesões da cavidade bucal. Segundo a classificação dos autores, a amostra foi composta por espécimes de 11 leucoplasias planas, uma leucoplasia “pré-cancer”, 2 papilomas, 1 líquen plano, 3 leucoplasias com câncer em estágio inicial, 1 carcinoma e 3 espécimes com alterações inflamatórias. Os autores observaram que para as leucoplasias o pico modal dos histogramas era diplóide e, em alguns casos, estavam presentes picos tetraplóides, além disso, não foram observados picos intermediários. Os histogramas gerados a partir da leucoplasia pré-câncer e por uma das leucoplasias com câncer incipiente revelavam picos intermediários

aos valores 2C e 4C. O carcinoma exibiu padrão multiplóide, enquanto os papilomas e os líquens exibiram padrão diplóide.

Gimenéz e Conti (1977) avaliaram o grau de ploidia de lesões da cavidade bucal, incluindo cistos radiculares, ceratocistos, leucoplasias e carcinomas epidermóides. Os autores observaram o padrão preferencialmente poliplóide dos carcinomas epidermóides quando comparados às outras lesões.

Adler, Feichter e Maier (1986) avaliaram, por citometria de impulso, o conteúdo de DNA de 39 carcinomas de boca e orofaringe. Oitenta e quatro por cento dos carcinomas de boca apresentaram padrão aneuplóide, comparados a 80% de aneuploidia nos carcinomas de orofaringe. Os autores também avaliaram a porcentagem de células na fase S do ciclo celular, que foi de $9.18 \pm 4.82\%$ para os tumores de boca e de $9.16 \pm 5.85\%$ para os tumores de orofaringe. Não houve relação entre o grau de ploidia, bem como o número de células na fase S, com a presença de metástase cervical.

Franzen et al. (1987) estudaram a relação do grau de ploidia e do tamanho de carcinomas espinocelulares da cavidade bucal com o prognóstico do tratamento dessas lesões pela aplicação de radioterapia pré-operatória. Os tumores graduados como T1 e T2 responderam pronunciadamente melhor quando comparados aos tumores graduados como T3 e T4. Em relação ao grau de ploidia, 8 dos 11 tumores classificados como aneuplóides apresentaram remissão clínica completa da lesão após 4 semanas de radioterapia. Para as lesões com padrões diplóides e poliplóides, a remissão clínica total foi observada em 2 de 19 e 6 de 21 casos respectivamente. Estes achados foram compatíveis aos do estudo realizado por Franzen et al. (1986), que avaliou a relação entre o grau de ploidia, bem como o estadiamento TNM,

e a resposta à radioterapia pré-operatória em 24 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal.

Chatelain et al. (1989a) avaliaram, a partir de análise morfométrica de monocamadas celulares de 7 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal, o valor preditivo de um sistema denominado *grau de malignidade de DNA (DNA-malignancy-grade – DNA-MG)*. Este sistema classificou as lesões, de acordo com parâmetros morfométricos, em uma escala de valores contínuos entre 0 e 3. Três pacientes foram a óbito em um período máximo de 10 meses; para esses pacientes, os *graus de malignidade de DNA* estavam em valores superiores a 1,4. Os 4 pacientes que sobreviveram (período de acompanhamento de 53 meses) apresentaram valores inferiores a 1.

Abdel-Salam et al. (1990) estudaram algumas características morfométricas de núcleos de células de 35 lesões brancas da cavidade oral, das quais, 23 apresentaram transformação maligna. Os autores analisaram 8 características relativas à forma e padrão de coloração nuclear e 6 relativas ao padrão de cromatina. Após análise multivariável, os autores estabeleceram um modelo preditivo que obteve taxa de 86% de predição para transformação maligna com 83% de sensibilidade.

Bryne et al. (1991) pesquisaram o valor prognóstico da determinação do volume nuclear por estereologia e da análise de pleomorfismo nuclear em relação à sobrevida de 44 pacientes com carcinoma espinocelular da cavidade bucal. Apenas a análise de pleomorfismo nuclear mostrou-se com valor preditivo significativo.

Briggs et al. (1992) analisaram características morfométricas relacionadas à forma e ao contorno de núcleos celulares de 22 carcinomas

espinocelulares de assoalho de boca, bem como a relação desses achados com a presença de metástases em linfonodos. Nesse estudo, a morfologia nuclear não teve valor preditivo positivo para identificação de metástases.

Kinoshita et al. (1992) estabeleceram o padrão de distribuição do conteúdo de DNA e da área nuclear de células da mucosa bucal de lesões cancerizáveis e de neoplasias da cavidade bucal. A obtenção das medidas foi realizada pelo emprego da técnica de citometria digital, a partir de monocamadas de núcleos das células dessas lesões. Dos 130 espécimes avaliados, 16 eram de mucosa normal, 24 de leucoplasias, 12 de hiperplasias verrucosas e 76 de carcinomas de células escamosas. Para os espécimes de mucosa normal, os picos modais dos valores de ploidia no histograma ficaram entre 1,5N e 2,4C, e o gráfico de distribuição referente ao conteúdo de DNA e à área nuclear apresentou baixa dispersão. Para os carcinomas de células escamosas, a média do conteúdo de DNA foi de $3,44 \pm 0,69N$, e a variância no conteúdo de DNA foi superior a de outras lesões. Além disso, a frequência de células com conteúdo de DNA acima do valor 4C foi de $26,2 \pm 19\%$. O grupo dos carcinomas também foi o que apresentou a maior área nuclear média e uma maior variância da área nuclear. Entre os 24 casos de leucoplasias, o pico modal dos valores de ploidia ficaram entre 1,5N e 2,4C, e a maioria das células apresentaram valores entre 1,5N e 4C. Os gráficos de distribuição das leucoplasias expressaram-se de modo variante, oscilando entre o aspecto dos gráficos de distribuição dos tecidos normais e dos carcinomas. Apenas um caso de leucoplasia expressou valor modal acima de 2,5C, este caso transformou-se em carcinoma após 15 meses. Entre os casos de leucoplasia verrucosa, um caso que expressou várias células acima do valor de 4C e outro,

que exibiu pico modal com valor de ploidia aumentado, também desenvolveram carcinoma. Os 2 casos de eritroplasias exibiram pico modal em 2C e 3N, e as freqüências de células com valores iguais a 4C foram de 4% e 11% respectivamente. Ambos os casos foram tratados com radioterapia.

Empregando técnicas de estereologia, citometria e a avaliação de características clínicas, Bundgaard et al. (1992) calcularam o valor preditivo do volume nuclear, do grau de ploidia, do estadiamento TNM, da graduação histopatológica e do tamanho da lesão em relação ao tempo de sobrevida e à taxa de recorrência de 78 casos de carcinoma espinocelular da cavidade bucal. O tamanho do tumor, o estágio TNM, o volume nuclear e o perfil nuclear foram fatores preditivos independentes tanto para a sobrevida quanto para a recorrência. Os parâmetros histopatológicos de atividade mitótica, diferenciação nuclear morfológica, grau de malignidade e grau de ploidia não tiveram valor preditivos independentes. A análise multivariável de COX revelou alto valor preditivo do estadiamento do tumor, conjuntamente ao volume nuclear, tanto para a sobrevida ($P = 0.00001$) quanto para a recorrência ($P = 0.002$).

Beltrani, Denisan e Rubini (1992) após relacionarem o grau de ploidia, o estadiamento clínico e a graduação histopatológica de 80 carcinomas da cavidade oral, com a sobrevida dos pacientes, concluíram que o grau de ploidia só apresentou valor preditivo significativo quando associado ao estadiamento dos tumores.

Chen et al. (1993) avaliaram o conteúdo de DNA e a cinética celular como fatores preditivos de metástase ganglionar em 40 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal. Após análise por citometria de fluxo, 58%

da amostra apresentou-se aneuplóide, e dessas, 70% exibiam metástases. Em contrapartida, apenas 24% das lesões com padrão diplóide apresentavam metástases. Não houve relação entre o número de células nas fases S e G2/M com a presença de metástase.

Balsara et al. (1994) relacionaram o grau de ploidia, determinado por citometria de imagem, e a fração de células na fase S do ciclo celular de 68 carcinomas de boca com as características clínicas e histopatológicas dessas lesões. Os autores observaram relação entre o grau de ploidia e o tamanho das lesões, sendo que lesões maiores expressavam piores padrões de ploidia. Além disso, observaram que tumores pobremente diferenciados eram predominantemente não-diplóides, tais como os tumores com presença de metástases em linfonodos.

Tucker, Cowpe e Ogden (1994) testaram a capacidade de 3 métodos de determinação do grau de ploidia na diferenciação entre esfregaços de células epiteliais normais, de lesões cancerizáveis e de carcinomas da cavidade bucal. Os métodos empregados foram: leitura por microdensitometria, leitura de área por sonda linear de diodo e leitura de campo por sonda linear de diodo. Dos 48 espécimes analisados, 21 foram obtidos a partir de mucosa normal, 8 de lesões cancerizáveis e 19 de carcinomas. Os autores observaram conteúdo de DNA anormal em todas as lesões malignas, em 7 das 8 lesões cancerizáveis, e em apenas um dos esfregaços de mucosa bucal normal. Os autores obtiveram taxas de até 93% de sucesso na diferenciação entre os esfregaços de tecidos normais e patológicos, porém baixas taxas de acerto na discriminação entre lesões cancerizáveis e carcinomas.

Baretton et al. (1995) determinaram, por citometria de fluxo, o grau de

ploidia de 106 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal. Sessenta e oito por cento dos casos apresentaram padrão não-diplóide. As lesões de língua e lábio apresentaram padrão diplóide com maior frequência do que lesões localizadas em outras regiões da boca. Em 21 tumores estudados, os autores compararam o grau de ploidia dos espécimes obtidos durante a biópsia e durante a cirurgia de remoção do tumor, houve discordância em apenas 1 caso. Os autores também compararam o grau de ploidia entre os tumores primários e suas metástases em linfonodos e, para esses casos, observaram uma discrepância de 17%, sendo que, na maioria das vezes, o tumor primário era não-diplóide e sua metástase era diplóide. Os autores não encontraram relação entre o padrão de ploidia e o estágio clínico ou a graduação histopatológica das lesões, bem como com o período livre de recidiva e o tempo de sobrevida dos pacientes. Os resultados demonstraram significância entre o padrão não-diplóide e a presença de metástase em linfonodos cervicais. Nesse estudo, os autores repetiram a determinação do grau de ploidia, empregando a citometria por imagem, e observaram concordância com os resultados obtidos pela citometria de fluxo em 87% dos casos.

Giardina et al. (1996) avaliaram a relação entre a morfologia nuclear de células obtidas a partir de 30 espécimes de carcinomas espinocelulares de língua e a sobrevida dos pacientes portadores dessas lesões. As amostras foram divididas em 2 grupos, um para as lesões em que a sobrevida do paciente foi menor que 14 meses, e outro, para as lesões em que a sobrevida do paciente foi maior que 36 meses. Os dados qualitativos obtidos pela morfometria computadorizada, após análise de múltiplas variáveis, permitiram distinguir, com margem de erro de 10%, a qual grupo os pacientes pertenciam.

Empregando a citometria digital, Högmo et al. (1998) estudaram o valor prognóstico do grau de ploidia na progressão de lesões da cavidade bucal para carcinoma. Foram analisados 29 casos de lesões que progrediram para carcinoma, incluindo “lesões reacionais” (hiperplásicas ou inflamatórias) e leucoplasias com diferentes graus de displasia epitelial. Como grupo controle, foram selecionados 29 casos de “lesões reacionais” e leucoplasias, que acometiam os mesmos sítios anatômicos e apresentavam os mesmos graus de displasia epitelial que as lesões do grupo experimental; as lesões do grupo controle não apresentaram progressão para carcinoma. Entre os 21 casos de “lesões reacionais” do grupo experimental, 18 foram classificados como diplóides e 3 como não-diplóide/aneuplóide; todos os 21 casos de “lesões reacionais” do grupo controle apresentaram padrão diplóide. O grau de ploidia não permitiu a diferenciação entre as lesões desses 2 grupos. Entre os 11 casos de leucoplasia do grupo experimental, 8 foram classificados como displasia leve e 3 como displasia moderada a severa, desses, 8 apresentaram padrão não-diplóide/aneuplóide. Em contrapartida, apenas 2, dos 11 casos de displasias do grupo controle, apresentaram padrão não-diplóide/aneuplóide. Os 7 casos, que precederam carcinomas *in situ*, expressaram menores aberrações no conteúdo de DNA do que aqueles que progrediram para carcinomas invasivos.

Schimming et al. (1998) relacionaram o conteúdo de DNA de 52 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal com as características clinicopatológicas dessas lesões. Sessenta e um por cento dos carcinomas com padrão aneuplóide apresentavam metástase cervical. Porém, entre os carcinomas com padrão diplóide, apenas 29% possuíam metástase cervical.

Também foi observada relação positiva entre o padrão aneuplóide e tempo de sobrevida menor que 5 anos. Os autores não encontraram relação entre a graduação histopatológica e o grau de ploidia das lesões.

Considerando o exame histopatológico como padrão referencial, Remmerbach et al. (2001) obtiveram 100% de especificidade e 98,2% de sensibilidade no diagnóstico de carcinomas com a associação entre citologia esfoliativa e a determinação do grau de ploidia por citometria digital.

Maraki, Becker e Boecking (2004) compararam a acurácia diagnóstica da citologia esfoliativa e da citometria digital em relação ao diagnóstico histopatológico de lesões orais com suspeita de malignidade. Foram analisadas 98 lesões, das quais, 75 não revelaram sinais citológicos ou histopatológicos de malignidade ou displasia. Vinte e três casos exibiram alterações na citologia esfoliativa, incluindo positividade para células tumorais em 15 casos, suspeita de células tumorais em 4 casos, e diagnóstico duvidoso quanto à presença de células tumorais em 4 casos. Dos 23 casos que exibiram alterações, 19 apresentaram padrão aneuplóide. Os autores concluíram que a associação da citologia esfoliativa à determinação do grau de ploidia possui 100% de sensibilidade e 97,4% de especificidade diagnóstica quando comparados aos diagnósticos histopatológicos.

Empregando a citometria digital, Femiano e Scully (2005) avaliaram a frequência de aneuploidia em 40 casos de leucoplasia da cavidade bucal e em 45 casos de líquen plano. Três dos 20 casos de leucoplasia homogênea e 8, dos 20 casos de leucoplasia não-homogênea, expressaram padrão aneuplóide. Para os casos de líquen plano, 2 dos 25 casos classificados como erosivos apresentaram aneuploidia e nenhum dos 20 casos classificados como

reticulares exibiram esse padrão. Os autores relatam que os casos de líquen plano erosivo, que apresentaram padrão aneuplóide, foram tratados com radioterapia.

3 Proposição

Avaliar a relação entre os graus de displasia de lesões cancerizáveis da cavidade bucal e o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares.

Analisar a relação entre o grau de ploidia de lesões cancerizáveis da cavidade bucal e o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares.

Relacionar os diferentes graus de ploidia de lesões cancerizáveis da cavidade bucal à progressão histopatológica dos graus de displasia dessas lesões.

Avaliar os padrões de medidas de núcleos de células epiteliais em biópsias seqüenciais de lesões cancerizáveis e carcinomas espinocelulares da cavidade bucal, determinadas por citometria digital.

4 Metodologia

4.1 Delineamento da pesquisa

O estudo foi classificado como descritivo relacional, prognóstico de coorte retrospectivo (FLECHER; FLECHER; WAGNER, 2003). A figura 1 demonstra a estrutura do delineamento da pesquisa.

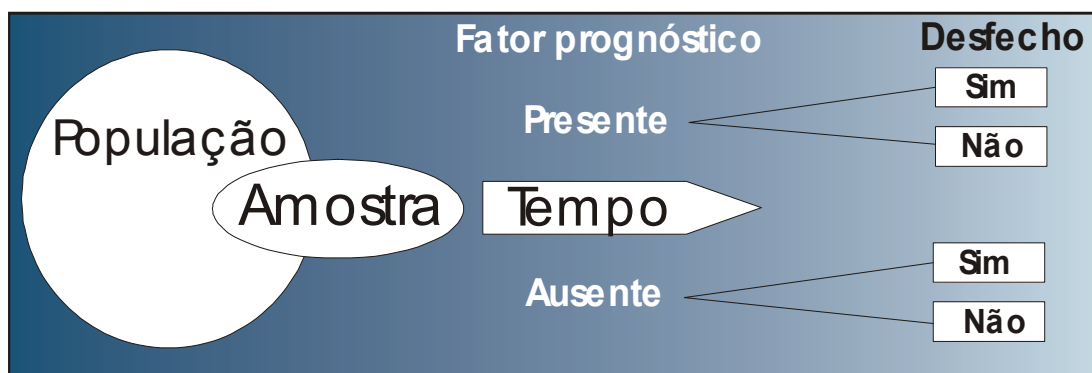


Figura 1: Estrutura do delineamento da pesquisa (adaptada de Flecher, Flecher e Wagner (2003), p.133).

4.2 População

A população foi constituída por aproximadamente 30.000 espécimes incluídos em parafina, do arquivo do Laboratório de Patologia do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC/RS.

4.3 Amostra e amostragem

Após a listagem estratificada das peças operatórias, realizou-se amostragem por conveniência de acordo com os diagnósticos clínicos e histopatológicos das lesões.

Foram selecionados os espécimes de pacientes acometidos inicialmente por uma lesão cancerizável, e que haviam sido submetidos a 2 ou mais procedimentos de biópsia no sítio anatômico onde a lesão se originou. De acordo com ordem cronológica, a última biópsia de cada seqüência determinou o desfecho de cada paciente, indicando ou não o desenvolvimento de câncer.

As determinações da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) foram respeitadas, preservando-se os princípios éticos nela estabelecidos (Apêndice I).

Foram consideradas como *lesões cancerizáveis* as lesões da cavidade bucal que apresentaram diagnóstico clínico de leucoplasia, eritroplasia e líquen plano oral (Figuras 2, 3, 4 e 5).



Figura 2: Leucoplasia em bordo e dorso de língua.

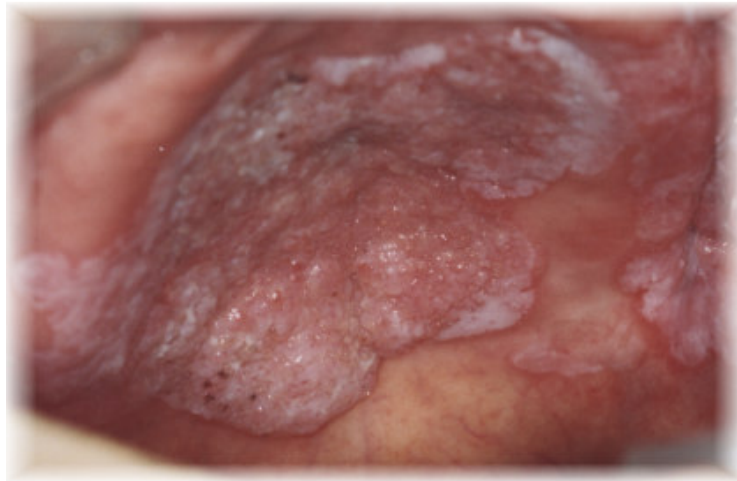


Figura 3: Leucoplasia verrucosa em palato e rebordo alveolar superior.

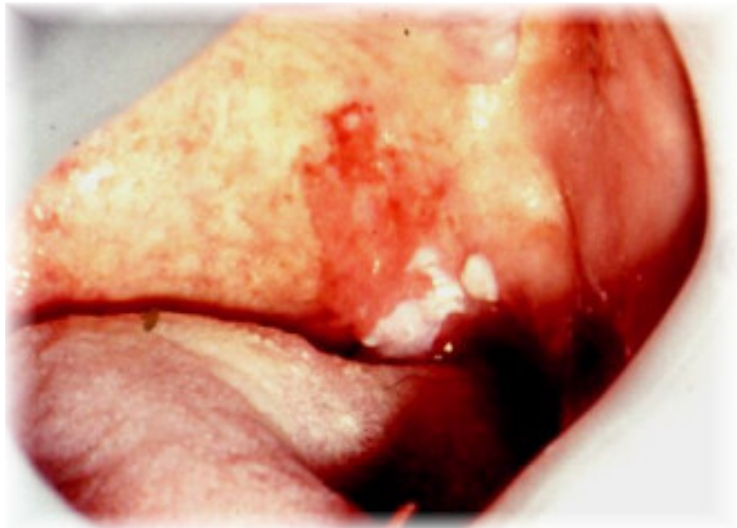


Figura 4: leucoeritropiasia em palato mole e arco palatoglossos.



Figura 5: Líquen plano reticular em mucosa jugal.

Para cada amostra foi gerada uma ficha de coleta de dados e de acompanhamento do cumprimento das etapas metodológicas (Apêndice II).

A partir da população, foram selecionadas aleatoriamente, como grupo controle, 8 biópsias com diagnóstico histopatológico de hiperplasia fibroepitelial.

Os diagnósticos foram revisados por 2 examinadores.

4.4 Critérios de exclusão

- Espécimes em que houve discordância entre os examinadores quanto ao diagnóstico histopatológico mesmo após revisão das lâminas e tentativa de consenso.
- Espécimes em que não foi possível a execução de todas as etapas referentes a preparação histológica.
- Espécimes de pacientes com história prévia de neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço.

4.5 Preparação dos espécimes

Após a seleção dos espécimes incluídos em parafina, realizou-se novos cortes com 6 e 15 μ m de espessura, os quais foram montados em lâminas de vidro silanizadas, conduzidos à estufa e mantidos a 60°C por 20 minutos. Os cortes de 6 μ m foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e os de 15 μ m com coloração de Feulgen (Figuras 6, 7 e 8), pelo emprego do Kit comercial MERCK[®], de acordo com as instruções do fabricante (Anexo B). Para padronização dos procedimentos de coloração, todas as lâminas foram coradas em bateria única.

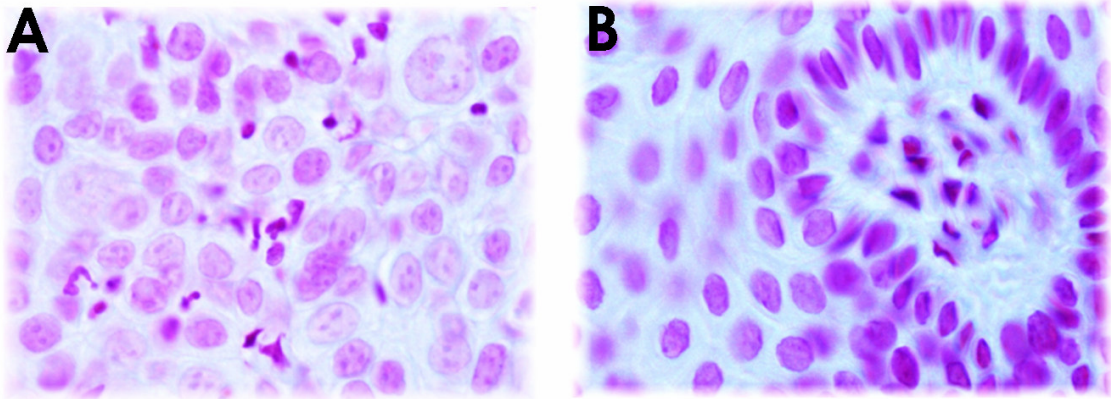


Figura 6: Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen. A: Carcinoma (400x). B: Hiperplasia fibroepitelial (500x).

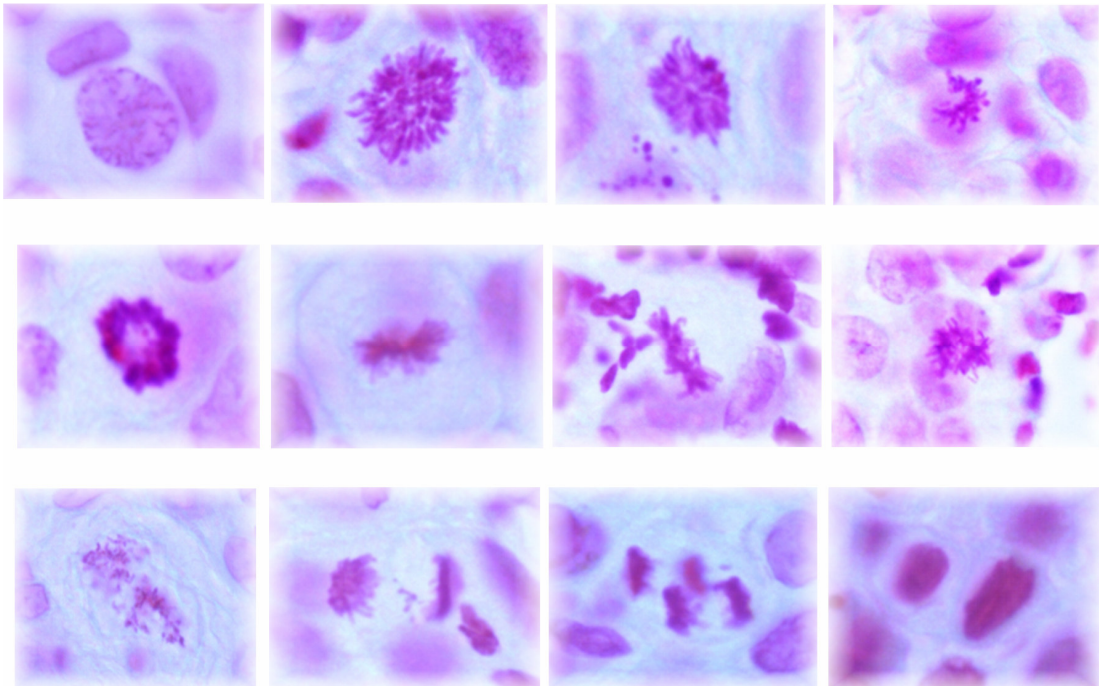


Figura 7: Fotomicrografias de mitoses atípicas - Coloração de Feulgen (1500x). Observe-se a especificidade da coloração pelo DNA celular, apenas os núcleos são corados.

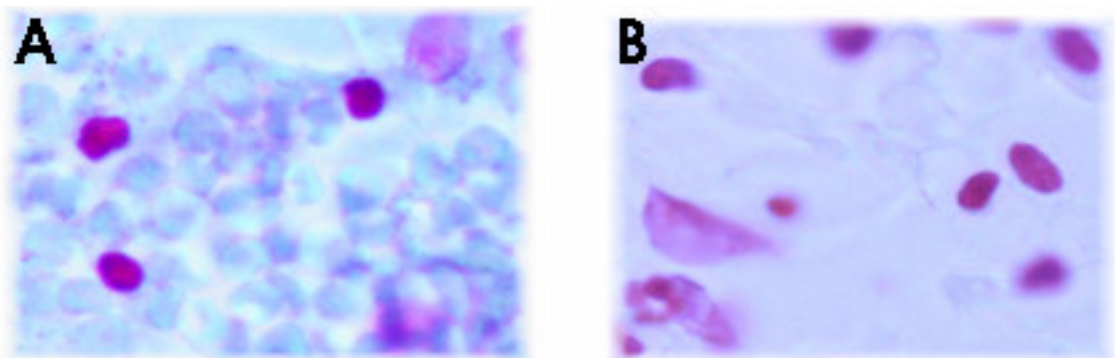


Figura 8: Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen (1000x). A: Núcleos de linfócitos corados (hemáceas não coradas). B: Núcleos de plasmócitos em tecido conjuntivo frouxo (fibras colágenas não coradas).

4.6 Coleta dos dados

4.6.1 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA DISPLASIA EPITELIAL

Após os procedimentos de coloração, as lâminas coradas em HE foram analisadas em microscópio óptico para graduação histopatológica padronizada da displasia epitelial. Empregaram-se os critérios propostos por Bánóczy e Csiba (1976), sintetizados em uma planilha contendo dados histopatológicos de cada lâmina (Apêndice III).

A graduação da displasia epitelial de cada um dos espécimes foi realizada por um examinador, após calibração aferida pelo teste Kappa. A numeração da amostra foi cegada e a graduação foi repetida 3 vezes, com intervalos de um mês entre cada aferição.

4.6.2 CITOMETRIA DIGITAL

Para a obtenção das medidas digitais, foram executadas as seguintes etapas:

1. Captura das imagens digitais
2. Segmentação dos núcleos e construção dos cariogramas
3. Citometria estática dos cariogramas

Os elementos empregados para captura das imagens foram:

1. Componente óptico: Executou-se a captação das imagens em microscópio óptico convencional marca Olympus modelo BX 60 (Tóquio, Japão), dotado de sistema de iluminação Koehler, com fonte estabilizada e regulável de luz incandescente e condensador Abbé com abertura numérica de 0,9, fototubo, óptica plana com objetiva de 50 aumentos, ampliação de 1x e lentes de projeção com 10 aumentos, determinando resoluções finais de 500 aumentos.

2. Dispositivo CCD: Utilizou-se uma videocâmara Sony 3 CCD DXC 970MD (Sony, Park Ridge, NJ, EUA) conectada ao fototubo do microscópio para captura de imagens. As imagens foram monitoradas durante as sessões de captura em monitor de vídeo Sony (Park Ridge, NJ, EUA) Trinitron PVM 1954Q com tela de 14 polegadas.

3. Placas digitalizadoras de imagem: Foram empregadas duas placas PCI de captura estática, gerando quadros de 640x480 elementos de imagem, cores de 24 bits. As imagens foram gravadas em disco rígido, com cópias de segurança em DVD gravável. Os arquivos de imagem foram gravados no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

4. Microcomputador: Conectou-se as placas de captura de imagem a um microcomputador padrão IBM-PC com processador Intel Pentium IV de 900MHz (Intel, Santa Clara, CA, EUA), 500 MB de memória RAM, disco rígido de 40GB e monitor de 17 polegadas. O sistema operacional empregado foi o Microsoft Windows 98 (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

A partir de cada lâmina, foram capturadas imagens de 20 a 40 campos visuais consecutivos, obtidos seqüencialmente, desde uma das extremidades do epitélio, realizando varredura em movimentos de letras gregas e abrangendo as camadas basal, para-basais e espinhosas (Figura 9).

A figura 10 sintetiza as etapas referentes à preparação dos espécimes e coleta de dados.

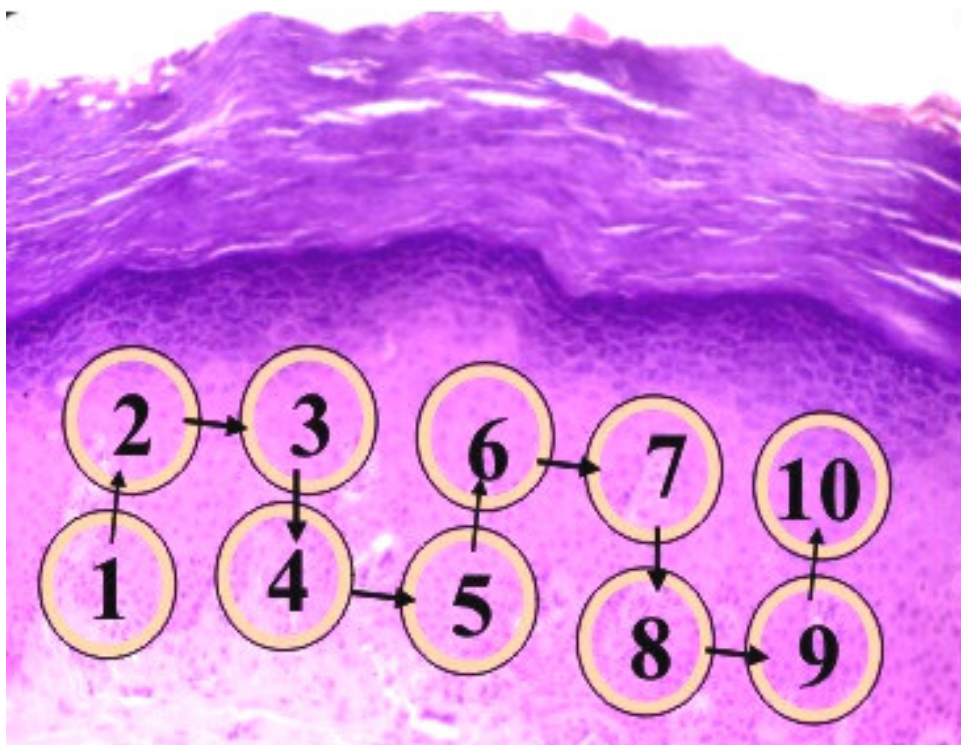


Figura 9: Seqüência de captação de fotomicrografias realizando movimentos em forma de letras gregas.

A partir das imagens capturadas, selecionou-se os núcleos de células epiteliais da camada espinhosa e da região para-basal que se encontravam no plano focal. As imagens desses núcleos foram recortadas com auxílio do software Corel Photo-Paint versão 11 e agrupados em uma imagem no formato TIFF, com plano de fundo branco, resolução de 400 dpi e dimensões de 150x100mm. Desse modo, para cada seqüência de imagens obtida por lâmina, foi criada uma nova imagem com um total de 60 núcleos de células epiteliais e 10 a 20 núcleos de linfócitos, denominada cariograma (Figura 11).

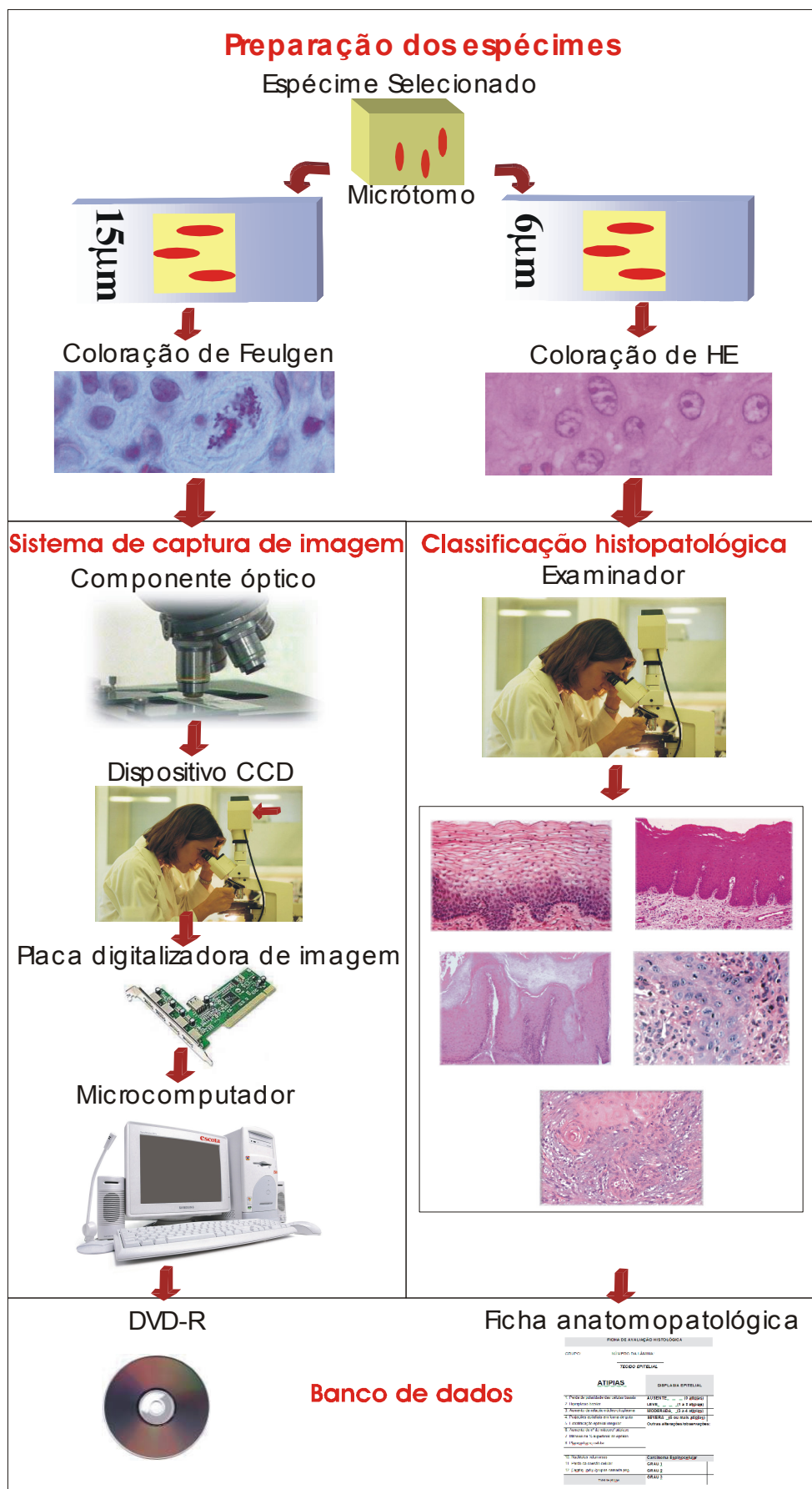


Figura 10: Preparo dos espécimes e coleta de dados.

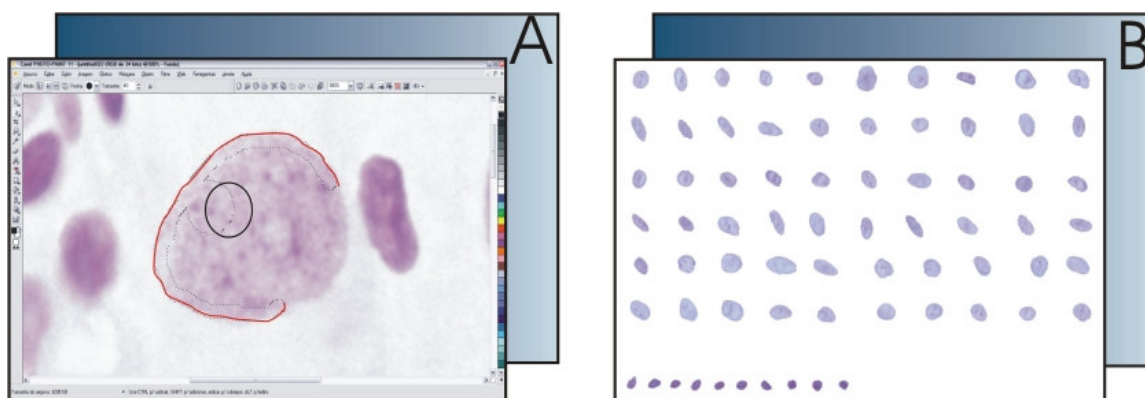


Figura 11: Segmentação da imagem de um núcleo. A: processo de segmentação. B: Cariograma.

Cada cariograma foi exportado para o *software* Image-Pro Plus (National Institute of Health, Bethesda, EUA), modificado pela Scion Corporation (Frederick, EUA), onde a imagem foi convertida para tons de cinza, no padrão 16 bits (Figura 12).

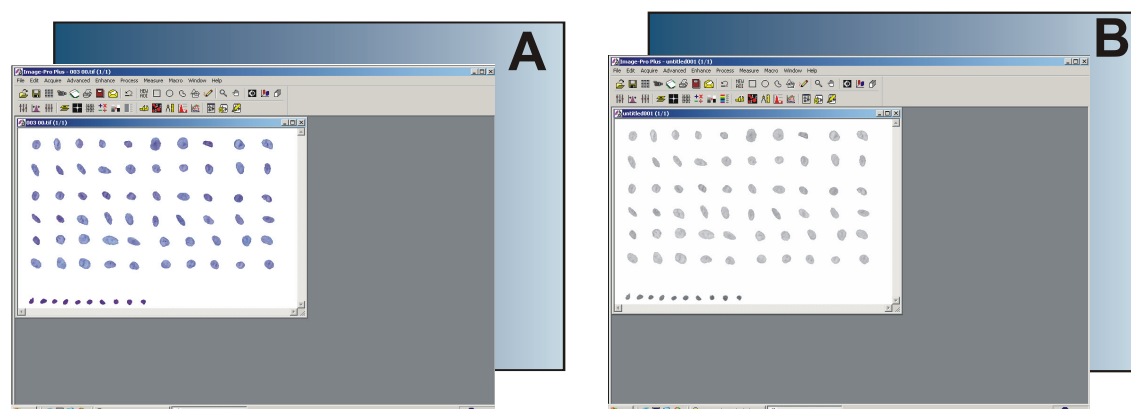


Figura 12. A: Cariograma importado para o software Image-Pro Plus. B: Cariograma convertido para tons de cinza.

Após esse processo, o software foi programado para quantificar 17 características cariométricas (Figura 13) (Apêndice IV).

As medidas obtidas a partir de cada cariograma foram exportadas para o software Microsoft Excel, e dispostas em forma de tabelas (Apêndice V).

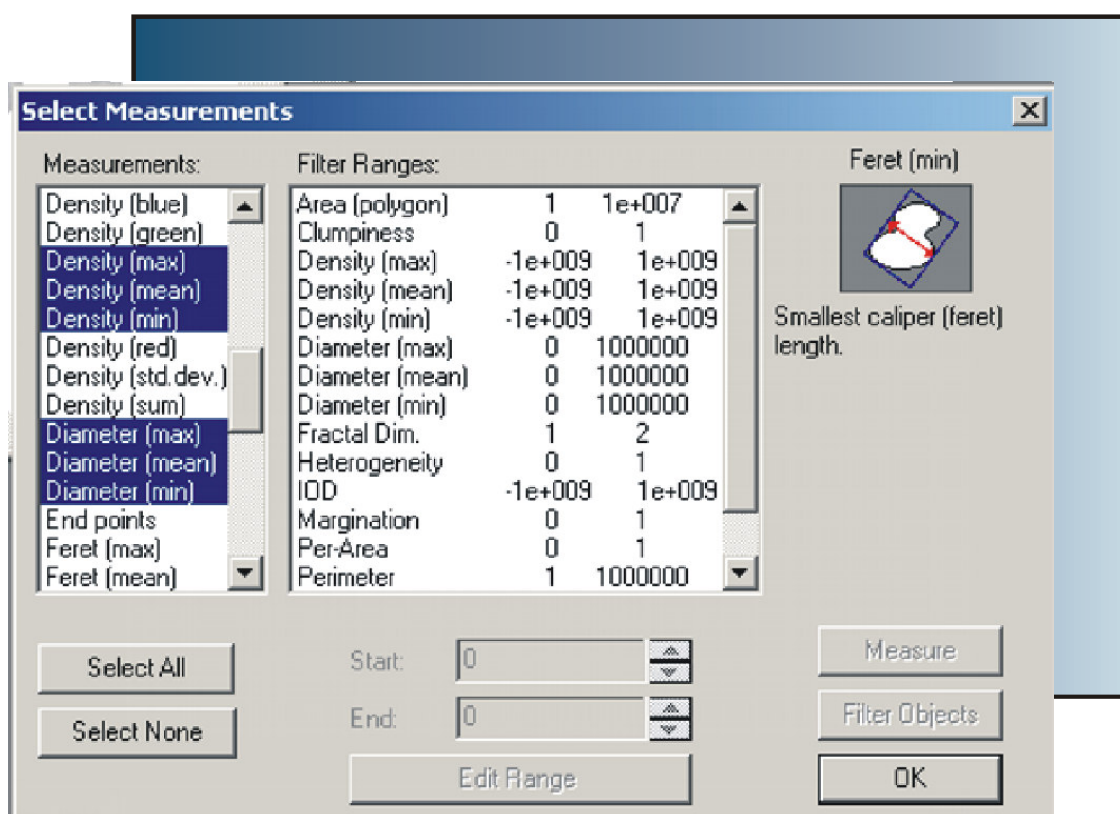


Figura 13: Janela de seleção das medidas.

4.6.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PLOIDIA

O grau de ploidia foi estabelecido com base na medida denominada densidade óptica integrada (IOD). Essa medida é a soma dos valores dos tons de cinza dos pixels que constituem a imagem de um núcleo celular (Figura 14). A comparação da IOD das células em estudo com a IOD de células somáticas euplóides (linfócitos) permite a estimativa do grau de ploidia das células em estudo.

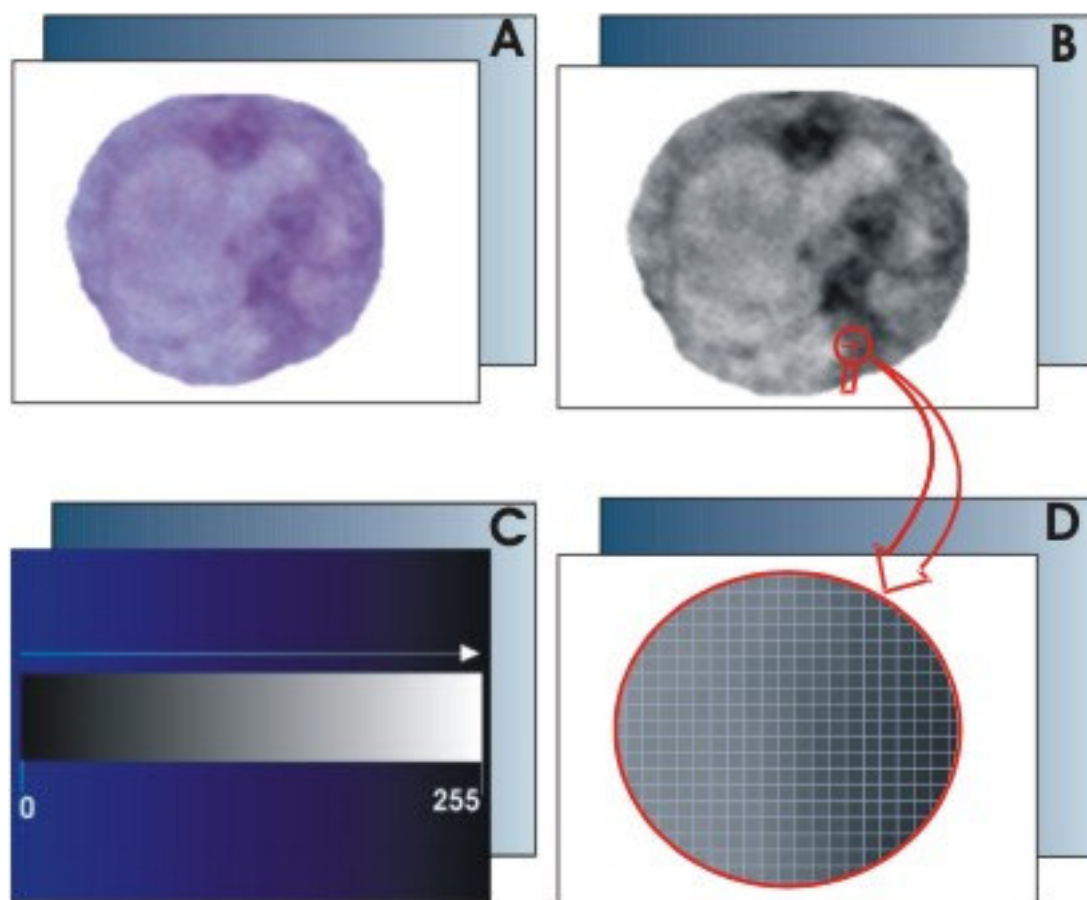


Figura 14: Cálculo da IOD. A: Imagem segmentada de um núcleo celular. B: Imagem em tons de cinza - (lupa: região ampliada em D). C: Escala de valores dos tons de cinza. D: Ampliação de região da imagem B - cada quadrado da grade representa um pixel e a soma dos valores dos tons de cinza de cada pixel determina o valor da densidade óptica integrada (IOD).

O estabelecimento do padrão diplóide individualizado para cada cariograma foi a primeira etapa para a determinação do grau de ploidia. Esta fase foi realizada de acordo com a *European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) consensus report on diagnostic DNA image cytometry* (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1998).

Primeiramente, determinou-se o coeficiente de variância ($CV = (\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100$) da IOD das imagens dos núcleos de 100 linfócitos (dois linfócitos a partir de 50 cariogramas).

A seguir, empregaram-se as imagens de cem células das extremidades dos cortes histológicos das lâminas de hiperplasias fibroepiteliais com aspecto de normalidade, compatíveis com margem de segurança. Essas também foram capturadas realizando a varredura dos campos em movimentos de letras gregas. A seleção das células de referência também foi submetida ao cálculo do coeficiente de variância, onde imagens de núcleos celulares foram substituídas até que o valor do coeficiente de variância expressasse valor menor ou igual a 10%.

A divisão entre o valor médio da IOD das células pelo valor médio da IOD dos linfócitos determinou o “fator de correção” (Figura 15 A e B).

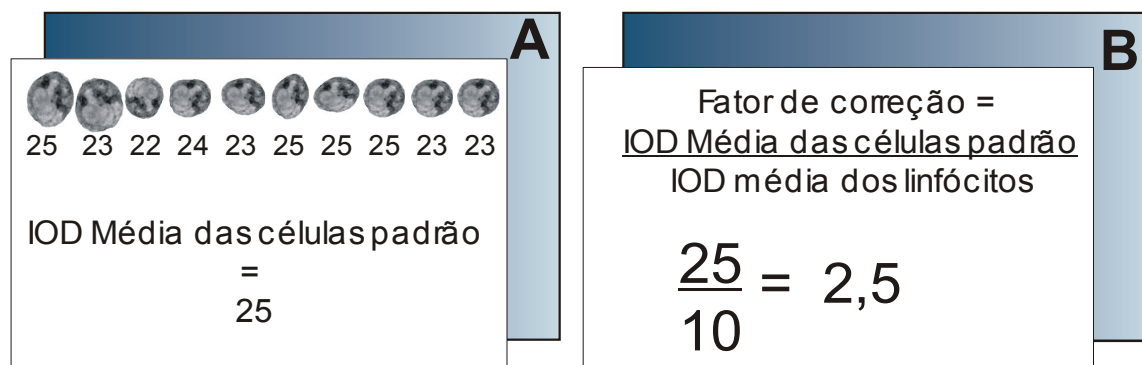


Figura 15: Cálculo do fator de correção. A: Cálculo da média dos valores das IODs das células de mucosa bucal. B: Cálculo do valor de correção.

Em seguida, calculou-se o coeficiente de variância entre os 20 linfócitos de cada cariograma, de modo que os grupos de linfócitos que apresentaram o coeficiente de variância maior que 20% foram reavaliados, sendo excluídas as imagens de linfócitos que apresentavam IOD com maior desvio da média (Figura 16 A). Novos núcleos foram selecionados para substituírem aqueles

excluídos. Após a substituição, o coeficiente de variância foi recalculado, e, quando se atingiu valor menor ou igual a 20%, calculou-se a média do valor da IOD dos linfócitos referenciais (Figura 16 B).

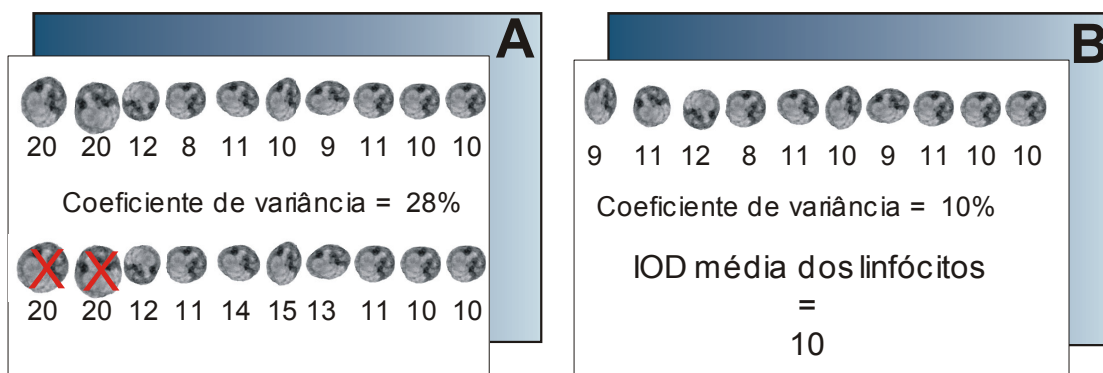


Figura 16: Coeficiente de variância dos linfócitos. A: Cálculo do coeficiente de variância dos linfócitos de referência - nesse exemplo, com apenas 10 linfócitos, o coeficiente de variância de 28% ficou acima do desejado. B: Novo coeficiente de variância após substituição de linfócitos e cálculo da média da IOD.

Determinou-se, então, o valor diplóide para cada lâmina, denominado valor 2C, resultante da multiplicação do valor médio da IOD dos linfócitos de referência de cada cariograma pelo fator de correção (Figura 17 A e B).

O próximo passo foi a padronização estatística dos valores da IOD das imagens dos núcleos de cada cariograma, sendo que os valores da IOD das 60 células de cada cariograma foram divididos em 6 grupos (Figura 18 A). As fórmulas e cálculos desse passo estão contidos no apêndice VI.

Após a aplicação do fator de correção, os valores padronizados das IODs das imagens dos núcleos de cada cariograma foram comparados com o valor referencial 2C de cada lâmina. Assim, determinou-se o valor da ploidia de cada célula (Figura 18 B).

1. Diplóide: uma única linhagem celular apresentando padrão de DNA com valor modal concentrado em região diplóide ou peridiplóide, podendo apresentar pico contendo menos que 10% das células em região peritetraplóide (Figura 19 A e B);

2. Tetraplóide: uma única linhagem celular apresentando padrão de DNA com valor modal concentrado em região tetraplóide ou peritetraplóide, podendo apresentar linhagem adicional em região peridiplóide (Figura 19 C);

3. Aneuplóide: linhagens celulares apresentando padrão de DNA fora dos valores modais descritos previamente. Podiam estar presentes linhagens diplóides, peridiplóides, tetraplóides e peritetraplóides (Figura 19 D).

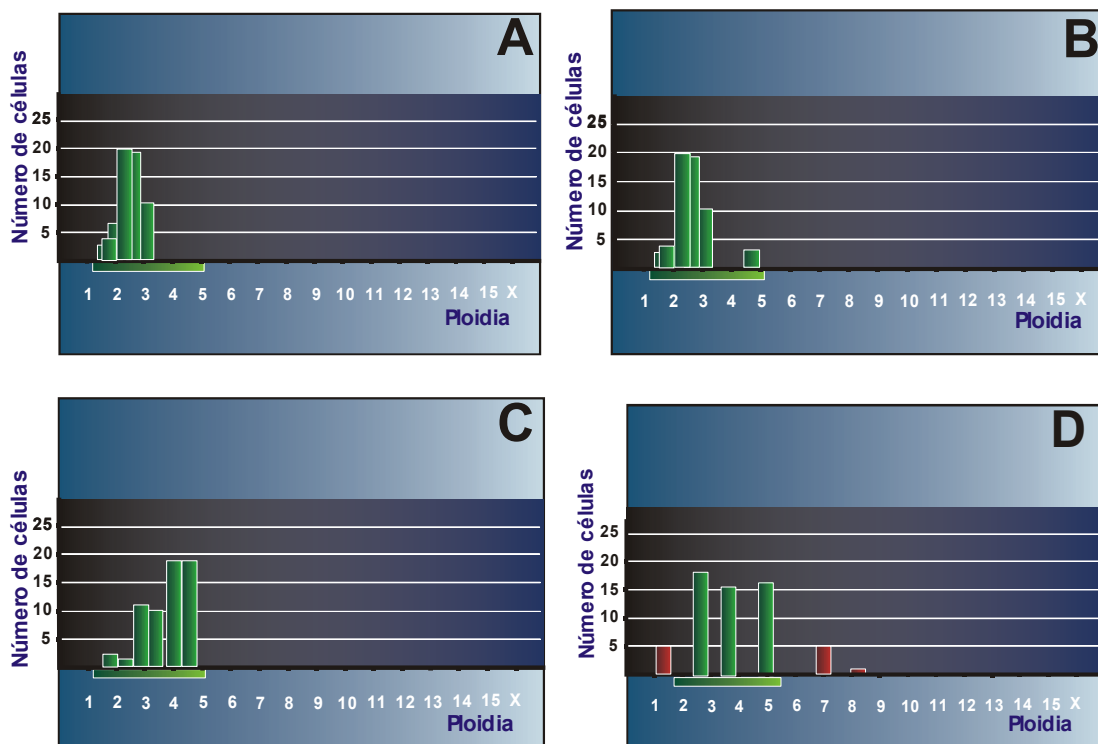


Figura 19: Classificação dos histogramas. A: Padrão diplóide. B: Padrão diplóide. C: Padrão tetraplóide. D: Padrão aneuplóide. Adaptado de Hagaroske et al. (1998).

4.7 Análise dos dados:

4.7.1 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER

Para relacionar a classificação histopatológica de cada lesão com o desenvolvimento de câncer, foi realizada análise descritiva de cada caso. A análise estatística foi feita pela aplicação do teste de Mann-Whitney.

4.7.2 RELAÇÃO ENTRE GRAU DE PLOIDIA E O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER

Para relacionar o grau de ploidia de cada lesão com o desenvolvimento de câncer, foi realizada análise descritiva de cada caso. A análise estatística foi feita pela aplicação do teste de Mann-Whitney.

4.7.3 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E O GRAU DE PLOIDIA

Para relacionar a classificação histopatológica de cada lesão com seu respectivo grau de ploidia, além da análise descritiva, empregou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas, em nível de significância de 5%.

4.7.4 AVALIAÇÃO CARIOMÉTRICA E A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

Para verificar a capacidade de 17 características cariométricas em discriminar o grupo diagnóstico ao qual cada célula pertencia, foi empregado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

5 Resultados

5.1 Caracterização da amostra

A amostra de conveniência foi constituída a partir de 24 pacientes, sendo 12 do sexo feminino e 12 do sexo masculino. Em exceção aos 8 pacientes que apresentavam hiperplasias fibroepiteliais, submetidos apenas a uma biópsia, os demais pacientes foram submetidos à biópsias seqüenciais em um mesmo sítio anatômico, sendo que 13 deles foram submetidos a duas biópsias e os outros a mais de duas biópsias. Um dos pacientes possuía biópsias seqüenciais em duas regiões anatômicas distintas; de modo que foram consideradas separadamente como 2 casos, 1A e 1B.

As interpretações histopatológicas das biópsias seqüenciais estão dispostas na Tabela 1, bem como as datas em que foram realizadas.

Das 43 biópsias estudadas, 15 expressaram ausência de displasia, 9 apresentaram displasia leve a moderada, 6 displasia severa e 13 carcinoma. As 8 biópsias com diagnóstico histopatológico de hiperplasia fibroepitelial também foram classificadas dentro dos padrões propostos pela metodologia, apresentando o padrão de displasia ausente.

Tabela 1 Classificações histopatológicas das biópsias, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

Caso	1º Diagnóstico	2º Diagnóstico	3º Diagnóstico	4º Diagnóstico	5º Diagnóstico
1A	Displasia ausente 1981	Displasia leve/moderada 2002			
1B	Displasia leve/moderada 2000	Carcinoma 2001			
2	Displasia ausente 1982	Displasia ausente 1983			
3	Displasia ausente 2000	Displasia ausente 2001			
4	Displasia ausente 1994	Displasia ausente 1999	Displasia ausente 2000	Displasia ausente 2003	
5	Displasia leve/moderada 1998	Carcinoma 2000			
6	Displasia severa 2000	Carcinoma 2000			
7	Displasia leve/moderada 2001	Carcinoma 2001			
8	Displasia ausente 1985	Carcinoma 1986			
9	Displasia leve/moderada 1984	Carcinoma 1985			
10	Displasia severa 1997	Carcinoma 2001			
11	Displasia severa 2003	Carcinoma 2004			
12	Displasia severa 1984	Carcinoma 1984			
13	Displasia ausente 1998	Carcinoma 1999			
14	Displasia leve/moderada 2001	Displasia severa 2002	Carcinoma 2003		
15	Displasia ausente 2000	Displasia ausente 2002	Displasia ausente 2003	Displasia leve/moderada 2003	Carcinoma 2004
16	Displasia ausente 2000	Displasia leve/moderada 2002	Displasia leve/moderada 2003	Displasia severa 2003	Carcinoma 2004

1A e 1B representam duas seqüências de biópsias em distintas regiões anatômicas de um mesmo paciente. O número abaixo de cada diagnóstico representa o ano em que as biópsias foram realizadas. Fonte: Dados da pesquisa, 2005.

5.2 Relação entre a classificação histopatológica e o desenvolvimento de câncer

Na análise da relação entre o diagnóstico histopatológico e a ausência ou presença de carcinoma no desfecho, foram comparadas todas as biópsias de uma seqüência com a última biópsia da mesma. Assim, nas seqüências com duas biópsias, comparou-se a primeira com a segunda; em casos com 3 biópsias, comparou-se a primeira com a terceira e a segunda com a terceira; e assim sucessivamente para os casos com mais de 3 biópsias. Assim, entre as 30 lesões cancerizáveis, 26 foram consideradas como lesões iniciais, e 4 como desfecho, indicando, nestes casos, a não malignização.

Foram 12 casos com o primeiro diagnóstico de displasia ausente sendo que em 6 delas houve o desenvolvimento de carcinomas. Entre os 6 casos que não apresentaram transformação maligna, o de número 1A, progrediu para displasia leve a moderada. Em outro sítio anatômico do mesmo paciente, caso de número 1B, houve progressão de displasia leve a moderada para carcinoma.

Todas as biópsias com diagnóstico de displasia leve a moderada desenvolveram carcinoma, bem como as biópsias com diagnóstico inicial de displasia severa.

A presença de câncer no desfecho relacionou-se com os casos de displasia leve a moderada e displasia severa (teste de Mann-Whitney: $p=0,009$) (Tabela 2).

Tabela 2 Relação entre a classificação histopatológica e a transformação maligna das lesões cancerizáveis, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

Classificação histopatológica	n	Transformação maligna	
		Ausente	Presente
Displasia ausente	12	6	6
Displasia leve a moderada	8	0	8
Displasia severa	6	0	6

n: número de biópsias. Fonte: Dados da pesquisa, 2005

5.3 Classificação do grau de ploidia e o desenvolvimento de câncer

Para cada uma das 51 lâminas foram construídos histogramas, a partir dos quais as biópsias foram classificadas de acordo com seu grau de ploidia (Apêndices VI a XIII).

Entre os espécimes de lesões cancerizáveis, 12 foram classificadas como diplóides; 4 como tetraplóides e 14 como aneuplóides. Entre as 8 biópsias de hiperplasia fibroepitelial, 7 foram classificadas como diplóides e uma como tetraplóide. Dos 13 casos de carcinoma, 11 foram aneuplóides e 2 tetraplóide.

A seqüência de biópsias *1A* (*caso 1A*), que não progrediu para carcinoma, apresentou progressão em seu grau de ploidia, migrando de tetraplóide para aneuplóide. O mesmo paciente, *caso 1B*, no local em que desenvolveu carcinoma, apresentou as duas biópsias dessa seqüência como tetraplóide (Tabela 3).

Nos *casos 2, 3 e 4*, os pacientes não desenvolveram carcinomas, e suas biópsias apresentaram constância no padrão diplóide (Tabela 3).

As biópsias iniciais dos *casos 5, 6, 7 e 12* foram classificadas como aneuplóides. Esses 4 casos sofreram malignização e as biópsias das neoplasias exibiram padrão aneuplóide (Tabela 3).

A primeira biópsia do *caso 8*, realizada no ano de 1985, foi classificada como diplóide, a segunda biópsia da seqüência, realizada em 1986 e diagnosticada como carcinoma, foi classificada como aneuplóide (Tabela 3).

Os *casos 9 e 10* progrediram para carcinomas e tanto a biópsia inicial como a seqüencial expressaram padrão aneuplóide. O mesmo pode ser observado nas biópsias do *caso 13*, que também sofreu transformação

maligna (Tabela 3).

O *caso 11* apresentou padrão diplóide na primeira biópsia e padrão tetraplóide na biópsia seqüencial e desenvolveu câncer em seu desfecho (Tabela 3).

Das 3 biópsias do *caso 14*, a primeira exibiu padrão diplóide e a segunda e terceira exibiram padrão aneuplóide. Os diagnósticos histopatológicos dessas 3 biópsias foram, respectivamente, displasia leve a moderada, displasia severa e carcinoma (Tabela 3).

Todas as biópsias do *caso 15* apresentaram padrão aneuplóide e este paciente também desenvolveu carcinoma, detectado 4 anos após a primeira biópsia (Tabela 3).

As 5 biópsias do *caso 16* foram classificadas, em ordem cronológica crescente, como: diplóide, tetraplóide, aneuplóide, tetraplóide e aneuplóide. Este paciente desenvolveu carcinoma 04 anos após a primeira biópsia (Tabela 3).

Do mesmo modo que na avaliação da graduação histopatológica, na análise da relação entre o grau de ploidia e a ausência ou presença de carcinoma no desfecho, foram comparadas todas as biópsias de uma seqüência com a última biópsia da mesma.

De 26 biópsias iniciais, 9 apresentaram padrão diplóide, das quais, 5 não progrediram para carcinoma e 4 progrediram (Tabela 4). Entre os 4 casos que progrediram para carcinoma, 2 tiveram outras biópsias indicadas antes da transformação maligna, as quais exibiram aneuploidia (Tabela 3 - *casos 14 e 16*).

Tabela 3 Classificações dos graus de ploidia das biópsias, Instituto de Pesquisa Biomédicas, Porto Alegre, RS – 2005

CASO	1º HISTOGRAMA	2º HISTOGRAMA	3º HISTOGRAMA	4º HISTOGRAMA	5º HISTOGRAMA
1A	Tetraplóide 1981	Aneuplóide 2002			
1B	Tetraplóide 2000	Tetraplóide 2001			
2	Diplóide 1982	Diplóide 1983			
3	Diplóide 2000	Diplóide 2001			
4	Diplóide 1994	Diplóide 1999	Diplóide 2000	Diplóide 2003	
5	Aneuplóide 1998	Aneuplóide 2000			
6	Aneuplóide 2000	Aneuplóide 2000			
7	Aneuplóide 2001	Aneuplóide 2001			
8	Diplóide 1985	Aneuplóide 1986			
9	Aneuplóide 1984	Aneuplóide 1985			
10	Aneuplóide 1997	Aneuplóide 2001			
11	Diplóide 2003	Tetraplóide 2004			
12	Aneuplóide 1984	Aneuplóide 1984			
13	Aneuplóide 1998	Aneuplóide 1999			
14	Diplóide 2001	Aneuplóide 2002	Aneuplóide 2003		
15	Aneuplóide 2000	Aneuplóide 2002	Aneuplóide 2003	Aneuplóide 2003	Aneuplóide 2004
16	Diplóide 2000	Tetraplóide 2002	Aneuplóide 2003	Tetraplóide 2003	Aneuplóide 2004

1A e 1B representam duas seqüências de biópsias em distintas regiões anatômicas de um mesmo paciente. O número abaixo de cada grau de ploidia representa o ano em que as biópsias foram realizadas. Fonte: Dados da pesquisa, 2005.

Quatro biópsias iniciais apresentaram padrão tetraplóide, dessas, apenas uma não desenvolveu carcinoma (Tabela 4).

As 13 biópsias iniciais classificadas como aneuplóide evoluíram para carcinoma. Houve relação entre os graus de ploidia aneuplóide com o desenvolvimento de carcinoma (teste de Mann-Whitney: $p=0,004$).

Tabela 4 Relação entre o grau de ploidia e a predição para transformação maligna das lesões cancerizáveis, Laboratório de Anatomia Patologia do IPB/HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

Grau de ploidia	n	Transformação maligna	
		Ausente	Presente
Diplóide	9	5	4
tetraplóide	4	1	3
aneuplóide	13	0	13

n: número de biópsias. Teste Não-paramétrico Mann-Whitney: $p=0,004$. Fonte: Dados da pesquisa.

5.4 Relação entre a classificação histopatológica e o grau de ploidia

Das 15 lesões classificadas como “displasia ausente”, 9 expressaram padrão diplóide, duas, padrão tetraplóide e 4, padrão aneuplóide (Tabela 5).

Dos 9 casos de displasia leve a moderada, 7 expressaram padrão aneuplóide, 1 tetraplóide e 1 diplóide (Tabela 5).

Dos 6 casos de displasia severa, 4 expressaram padrão aneuplóide, 1 tetraplóide e 1 diplóide (Tabela 5).

Entre as 13 lesões com diagnóstico de carcinoma, 12 expressaram padrão aneuplóide e uma tetraplóide. Nenhuma das lesões com esse diagnóstico expressou padrão diplóide (Tabela 5).

Tabela 5 Diagnósticos histopatológicos e os graus de ploidia de biópsias seqüenciais, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

CASO	1ª BIÓPSIA	2ª BIÓPSIA	3ª BIÓPSIA	4ª BIÓPSIA	5ª BIÓPSIA
1A	D A Tetraplóide	D L/M Aneuplóide			
1B	D L/M Tetraplóide	CA Tetraplóide			
2	D A Diplóide	D A Diplóide			
3	D A Diplóide	D A Diplóide			
4	D A Diplóide	D A Diplóide	D A Diplóide	DA Diplóide	
5	D L/M Aneuplóide	CA Aneuplóide			
6	D S Aneuplóide	CA Aneuplóide			
7	D L/M Aneuplóide	CA Aneuplóide			
8	D A Diplóide	CA Aneuplóide			
9	D L/M Aneuplóide	CA Aneuplóide			
10	D S Aneuplóide	CA Aneuplóide			
11	D S Diplóide	CA Tetraplóide			
12	D S Aneuplóide	CA Aneuplóide			
13	D A Aneuplóide	CA Aneuplóide			
14	D L/M Diplóide	D S Aneuplóide	CA Aneuplóide		
15	D A Aneuplóide	D A Aneuplóide	D A Aneuplóide	D L/M Aneuplóide	CA Aneuplóide
16	D A Diplóide	D L/M Tetraplóide	D L/M Aneuplóide	D S Tetraplóide	CA Aneuplóide

Legenda: D A: displasia ausente. D L/M: displasia leve a moderada. D S: displasia severa. CA: carcinoma. Fonte: Dados da pesquisa, 2005.

O emprego do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas, comprovou, em nível de significância de 5%, a relação entre o padrão diplóide e os diagnósticos de hiperplasia e displasia ausente. Sete das 8 hiperplasias apresentaram padrão diplóide, e apenas uma padrão tetraplóide (Tabela 6).

O mesmo teste comprovou relação entre o padrão aneuplóide com os diagnósticos de displasia leve a moderada, displasia severa e carcinoma (Tabela 6).

O padrão tetraplóide apresentou características intermediárias e, pela análise estatística, não se vinculou a nenhum dos diagnósticos (Tabela 6).

Tabela 6 Relação entre os diagnósticos histopatológicos e os graus de ploidia, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

Classificação histopatológica	Grau de Ploidia		
	Diplóide (n=18)	Tetraplóide (n=6)	Aneuplóide (n=27)
	número de casos	número de casos	número de casos
Hiperplasia	7	1	0
Displasia ausente	10	2	4
Displasia leve a moderada	1	1	6
Displasia severa	1	1	4
Carcinoma	0	1	12

n: número de casos. Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 Avaliação cariométrica e a classificação histopatológica das lesões

Para verificar a capacidade das medidas nucleares de discriminar o grupo diagnóstico ao qual cada célula pertencia, foi empregado o teste estatístico de Análise de Variância complementada pelo Teste de

Comparações Múltiplas de Tukey, a partir do qual construiu-se uma tabela de comparação (Tabela 7).

As medidas de “área”, “diâmetro médio” e “perímetro” nucleares permitiram distinguir as células das lesões com classificação histopatológica de “displasia ausente” e “displasia severa” das células dos demais grupos. Por essas medidas, não foi possível a distinção entre as células das lesões com classificação histopatológica de “displasia leve a moderada” e “carcinoma” (Tabela 7).

O “diâmetro máximo” também permitiu a distinção das células das lesões com classificação histopatológica de “displasia ausente” das demais células distribuídas em outros grupos (Tabela 7).

As medidas denominadas “densidade média” e “dimensão fractal” diferenciaram as células das lesões com classificação histopatológica de “displasia leve a moderada” das células contidas nos outros grupos.

A medida “densidade óptica integrada” diferenciou isoladamente as células das lesões com classificação histopatológica de “carcinoma” das demais células distribuídas em outros grupos (Tabela 7).

Isoladamente, as medidas de “*clumpness*” e “*roundness*” não permitiram a distinção de nenhum dos diagnósticos.

TABELA 7 Distinção das classificações histopatológicas pela cariometria, Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2005

	Classificação Histopatológica			
	Displasia ausente	Displasia leve/moderada	Displasia severa	Carcinoma
Área	A	C	B	C
Densidade média	A	B	A	A
Dimensão fractal	A	B	A	A
IOD	A	A	A	B
Diâmetro máximo	A	B	C	C
Diâmetro mínimo	A	B	A	B
Diâmetro médio	A	C	B	C
Perímetro	A	C	B	C
Roundness	A	A	A	A
Clumpness	A	B	A	B

Tabela de comparação na linha: letras distintas indicam capacidade de diferenciação diagnóstica entre as classificações histopatológicas. A significância da diferenciação foi comprovada através da Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%. IOD: densidade óptica integrada. Fonte: Dados da pesquisa.

6 Discussão

6.1 Considerações metodológicas

Há mais de 3 décadas, a citometria digital vem sendo empregada na avaliação de lesões da cavidade bucal sob várias sinonímias, tais como citometria por imagem, citometria digital, assinatura digital, morfocitometria, citomorfometria e citometria nuclear (PFITZER; PAPE, 1975; DOYLE; MANHOLD, 1975). Por ser a mais utilizada, a terminologia citometria digital foi adotada ao longo desse texto, visando facilitar a leitura.

Nesta pesquisa, durante a construção dos primeiros cariogramas, foi observado que o tempo consumido era longo, além de ser uma atividade monótona e repetitiva. Além disso, o processo de segmentação das imagens foi relativamente lento e trabalhoso, principalmente quando comparado ao número de células avaliadas por minuto pela citometria de fluxo (cerca de dez mil células). Esses achados condizem com aqueles citados por Danque et al. (1993), que descreveram algumas desvantagens da citometria digital em relação à citometria de fluxo, tais como a lentidão do processo, a menor resolução na quantificação de DNA, a sensibilidade aos procedimentos de preparação da amostra e a menor representatividade da amostra.

A seleção de 60 células por cariograma sugere uma aparente discrepância entre o número de células avaliadas e as milhares de células constituintes de cada fragmento biopsiado. Entretanto, esse número é compensado pelas altas especificidade e sensibilidade da citometria digital

durante a seleção das imagens dos grupos celulares de interesse. Além disso, a determinação do número de células por cariograma seguiu as recomendações do *European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP): Consensus report on diagnostic DNA image cytometry (1997)*, e, considerando-se os 51 cariogramas construídos, totalizou-se cerca de 3 mil e quinhentas células analisadas (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1998).

Devido a esse processo não automatizado de seleção dos núcleos, a citometria digital apresentou várias vantagens, entre elas a visualização de detalhes citológicos da amostra, a identificação e seleção de uma população celular específica, a detecção de populações celulares pouco expressadas nos tecidos, a análise poder ser feita sobre cortes histológicos já preparados, a possibilidade de avaliação da textura de cromatina e a garantia de correta quantificação de parâmetros morfométricos.

Embora existam métodos automatizados de citometria digital, capazes de segmentar cerca de 5 mil imagens de núcleos celulares em minutos, a sua utilização, ao mesmo tempo em que aumenta a representatividade da amostra, reduz a especificidade e a sensibilidade no reconhecimento de pequenas populações de células alteradas (BAAK; JANSEN, 2004).

Böcking, Giroud e Reith (1998) recomendam que sempre sejam selecionados os núcleos celulares com os piores aspectos morfológicos. Essa recomendação pode sugerir a introdução de um viés de seleção, mas, se for considerado o processo de uma análise histopatológica para estabelecer o diagnóstico de carcinoma, devemos lembrar que independentemente do tamanho do fragmento biopsiado, basta que haja uma pequena área de invasão, para que toda a lesão seja classificada como carcinoma; do mesmo

modo, bastam algumas células alteradas para caracterizar uma lesão como aneuplóide.

Em geral, a citometria de imagem possui maior sensibilidade na detecção de clones celulares em pequenas quantidades, ou seja, esta parece ser vantajosa à citometria de fluxo em amostras que apresentam poucas células aneuplóides em uma população celular predominantemente diplóide. Na citometria de fluxo, pequenas populações celulares aneuplóides podem ser mascaradas pela presença de células diplóides. Embora Cohen (1996) e Faranda et al. (1997) concordem com essas vantagens, citam como principal limitação da citometria digital seu baixo potencial para discriminar picos peridiplóides, devido aos altos coeficientes de variância que ocorrem em amostras de tecidos incluídos em parafina.

Um dos pontos cruciais na determinação do grau de ploidia está centrado no estabelecimento do padrão diplóide, que pode ser obtido por referências celulares internas ou externas. Como citado por Böcking, Giroud e Reith (1998), as referências externas podem ser, entre outros, hepatócitos de ratos, linhagens de linfócitos e células da glia; e as internas, linfócitos do próprio paciente, obtidos na própria lâmina histológica estudada ou por esfregaços sanguíneos, além de células de tecidos saudáveis obtidos por biópsias, incluindo a citologia esfoliativa. No presente trabalho, a opção de empregar células de referência interna, linfócitos das próprias lâminas histológicas, teve como intenção minimizar vieses relativos a possíveis discrepâncias entre as colorações das 53 lâminas e entre peculiaridades do processamento e armazenamento dos espécimes.

Os coeficientes de variância calculados para os linfócitos de referência

desta pesquisa ficaram entre 8 e 26% e, com base nesses valores, calcularam-se os parâmetros de ploidia para cada lâmina. Os altos valores dos coeficientes de variância obtidos impossibilitaram a discriminação dos valores peridiplóides e peritetraplóides, além de gerar nos histogramas áreas de confluência entre os padrões diplóides e tetraplóides sem a possibilidade de discriminação. Böcking, Giroud e Reith (1998) consideraram que o coeficiente de variância para IOD das células referência deve preferencialmente ser menor ou igual a 5%, pois assim, obtém-se uma significância de 95% na definição do padrão diplóide, devendo ser consideradas diplóides todas as células que apresentarem um valor de ploidia entre 1,8 e 2,2C. Do mesmo modo, devem ser consideradas tetraplóides todas as células com valor de ploidia entre 3,6 e 4,4C.

Provavelmente, a falta da exatidão na determinação do grau de ploidia pela citometria digital foi um dos motivos que levou Auer, Fallenius e Erhardt (1984a) a classificar o grau de ploidia de uma lesão pelo padrão gráfico do histograma, e não apenas pelos valores numéricos da ploidia de cada célula expressados em um cariograma. Para Fleege, Baak e Smeulders (1988) e Sorwsen (1991), a obtenção de um padrão diplóide com baixo coeficiente de variância também é um momento crítico no desenvolvimento de pesquisas que empregam a citometria digital.

Noguchi et al. (2002), a partir de 20 linfócitos de referência, obtiveram, para cada cariograma, coeficientes de variância entre 4,9 e 10,8%. Os pesquisadores obtiveram os espécimes especificamente para sua pesquisa, durante cirurgias para remoção de carcinomas de boca e, além disso, padronizaram a solução de fixação. No presente estudo, a amostra foi selecionada a partir de uma população composta por aproximadamente 30.000

espécimes incluídos em parafina, do arquivo do Laboratório de Patologia do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC/RS, obtidos ao longo de 25 anos de existência do Serviço, onde o período de fixação, a solução de fixação, o tempo de armazenamento e o padrão de inclusão em parafina não foram controlados. Esses fatores podem influenciar negativamente na preservação do DNA desfavorecendo a natureza estequiométrica desejada para reação de Feulgen. As soluções fixadoras podem modificar os parâmetros nucleares morfométricos, densitométricos e de textura. Por exemplo, os núcleos fixados com formol têm um tamanho reduzido em relação àqueles fixados com solução de Carnoy; fato que repercute na distribuição da cromatina nuclear, uma vez que núcleos menores apresentam um maior grau de condensação da cromatina. Porém, mais importante do que a seleção do agente fixador é a necessidade de padronização desse agente em toda a amostra (COOMBS et al., 1999; WILLIAMS et al., 1999; SERTH et al., 2000).

Embora não tenham sido encontrados na literatura trabalhos que discutissem a formatação gráfica dos histogramas, foi observado durante a fase de construção dos mesmos, que a disposição gráfica de cada histograma parece colaborar com a reprodutibilidade de sua classificação. Durante o desenvolvimento desta pesquisa, foram testados vários modelos, até que se obteve a formatação apresentada.

A padronização dos valores das IODs das células dos cariogramas, descrita no capítulo referente a metodologia, também foi fundamental na construção dos histogramas, pois a natureza dos valores numéricos da IOD, resultantes da soma dos valores dos tons de cinza de cada pixel de um núcleo, gerava números exponenciais e sem a repetição de valores exatos. Desse

modo, sem a padronização, os gráficos apresentariam cada célula com um valor, e não haveria picos expressivos no histograma.

A opção de adotar a padronização estatística dos valores das IODs divididos em 6 grupos, justificou-se pela representatividade de picos de ploidia e pela preservação de valores discrepantes da média; com isso, obteve-se melhor padrão gráfico dos histogramas.

Deve-se esclarecer que esta foi uma decisão aplicável ao número de células contidas nos cariogramas deste estudo, de modo que, em trabalhos que incluam maior ou menor número de células, essa etapa deve ser revista e adequada.

Com a exceção dos megacariócitos e de alguns tecidos em maturação, que podem expressar poliploidia em situação fisiológica (até 64C), e de síndromes paraneoplásicas (até 128N), a poliploidização é um achado raro em tecidos não neoplásicos (BIESTERFELD et al., 1994). Assim, nesta pesquisa, os eventos poliplóides foram interpretados como aneuploidia.

6.2 Frequência dos padrões de ploidia

Entre os 13 casos de carcinomas avaliados neste estudo, 12 apresentaram padrão aneuplóide, um tetraplóide e nenhum diplóide, demonstrando uma alta frequência de aneuploidia em lesões malignas. Esses achados demonstram similaridade com a pesquisa de Doyle e Manhold que, em 1975, relataram uma baixa frequência do padrão diplóide nessas lesões. Embora a classificação clínica e histopatológica adotada por Pfitzer e Pape (1975) ao estudar o grau de ploidia de monocamadas nucleares de lesões da cavidade bucal não coincidam com os conceitos clínicos e histopatológicos

empregados neste estudo, os resultados de sua pesquisa também exibiram correlação dos padrões aneuplóides com os carcinomas e com as leucoplasias por eles classificadas como leucoplasias pré-câncer. Do mesmo modo, Giménez e Conti (1977) observaram maior freqüência de padrões aneuplóides em lesões malignas da cavidade bucal do que em lesões benignas. Adler, Feichter e Maier (1986), também observaram uma freqüência de 84% de aneuploidia em carcinomas da cavidade bucal.

Nos resultados desta pesquisa, pôde-se observar que dos 6 casos classificados como displasia severa, 4 foram aneuplóides, um tetraplóide e um diplóide; e entre os 9 casos de displasia leve a moderada, 7 foram classificados como aneuplóides, um como tetraplóide e um como diplóide. O padrão diplóide concentrou-se principalmente nos casos que não expressaram displasia epitelial, bem como nos casos de hiperplasias fibroepiteliais. A relação entre a aneuploidia e casos de displasia severa também foi observada por Högmo et al. (1998).

No trabalho realizado por Högmo et al. (1998), os 27 casos de lesões reativas, incluindo alterações hiperplásicas ou inflamatórias, expressaram padrão diplóide. Na presente pesquisa, dos 8 casos de hiperplasias avaliadas, 7 expressaram padrão diplóide. Assim, lesões reacionais parecem estar associadas à euploidia.

Kinoshita et al. (1992), ao avaliar o conteúdo de DNA em biópsias da cavidade bucal, incluindo espécimes de mucosas normais, hiperplasias, leucoplasias e carcinomas, observaram a presença de padrão diplóide na maioria das lesões benignas e de padrão aneuplóide nos casos de carcinoma. Embora pareça estranho que poucas leucoplasias tenham expressado padrão

aneuplóide, talvez esse fato justifique-se por uma suposta ausência de displasia epitelial, uma vez que os autores não realizaram a gradação histopatológica dessa alteração.

Na pesquisa realizada por Femiano e Scully (2005), a frequência de aneuploidia em 95 casos de lesões cancerizáveis da cavidade bucal foi de 16%.

Na presente pesquisa, a presença de aneuploidia em 50% das lesões cancerizáveis estudadas (15 de 30 lesões) diferiu significativamente dos achados obtidos pelos autores supracitados. Porém, este padrão seria menos expressivo se, durante a amostragem, tivessem sido incluídos todos os casos de leucoplasia do Serviço, e não apenas os casos de biópsias seqüenciais, uma vez que uma segunda indicação de biópsia sugere transformação maligna e maior possibilidade de expressão de padrões aneuplóides.

6.3 Progressão dos padrões de ploidia

No caso 1A, o histograma da primeira biópsia revela um número concentrado de células na região tetraplóide, já, no segundo histograma, vários picos aneuplóides foram observados. Não houve transformação maligna no sítio anatômico avaliado por essas biópsias.

No caso 1B, referente à mesma paciente do caso 1A, porém em outro sítio anatômico, o primeiro e o segundo histogramas representam uma lesão cancerizável e um carcinoma, ambos expressaram padrão tetraplóide.

Sabendo que os caso 1A e 1B pertencem ao mesmo paciente, pode parecer contra-senso que uma lesão cancerizável apresente padrão aneuplóide, e um carcinoma padrão tetraplóide. Porém, se desconsiderarmos o

sítio anatômico, e adotarmos a ordem cronológica em que as biópsias sucederam-se (1981, 2000, 2001, 2002), a seqüência da classificação do grau de ploidia ficaria assim: tetraplóide, tetraplóide, tetraplóide e aneuplóide. Essa seqüência parece não contrariar os princípios da cancerização de campo e da irreversibilidade dos danos genéticos.

Considerando os casos 1A e 1B como um único caso, os valores dos testes estatísticos aplicados sofreriam alterações. Por outro lado, como a amostra foi relativamente pequena, o tratamento estatístico teve uma função mais metodológica do que pragmática e hermenêutica.

Nos casos 2, 3 e 4, todas as biópsias apresentaram padrão diplóide e nenhum desses paciente apresentou desenvolvimento de carcinoma. Nota-se aqui uma forte relação entre o padrão diplóide e lesões que não apresentam progressão.

Nos casos 5, 6, 7, 9, 10, 12 e 13, que progrediram para carcinoma, todos os histogramas expressam padrão aneuplóide, demonstrando relação entre esse padrão e a malignização. Os histogramas representativos dos carcinomas expressaram maiores alterações no conteúdo de DNA do que os histogramas de suas biópsias iniciais. O histograma inicial do caso 13 foi o único a apresentar aneuploidia com presença de picos na região hipodiplóide.

O caso 8 foi o único em que uma lesão cancerizável com padrão diplóide transformou-se em carcinoma com padrão aneuplóide em apenas um ano de intervalo, diferentemente dos casos 14 e 16, que também apresentaram suas biópsias iniciais com padrão diplóide, porém, só desenvolveram carcinoma 2 e 3 anos depois, respectivamente, e apresentaram outras biópsias classificadas como aneuplóides antes da transformação maligna.

Além do caso 1B, apenas um carcinoma apresentou padrão tetraplóide, correspondendo ao histograma final do caso 11. A lesão cancerizável que precedeu este carcinoma apresentava padrão diplóide, porém, na análise histopatológica, a lesão cancerizável expressava displasia epitelial severa.

As 4 biópsias do caso 15 que antecederam o desenvolvimento de carcinoma apresentaram padrão aneuplóide. Foram aproximadamente 4 anos entre a primeira e a última biópsia. Houve expressividade do padrão aneuplóide que já indicava a gravidade da lesão muito antes de sua malignização, e mesmo assim, as 3 primeiras biópsias foram classificadas histopatologicamente com displasia ausente.

O caso 16 foi o único onde se observou uma regressão no grau de ploidia, ocorrida entre a terceira e a quarta biópsia. Não foram identificadas justificativas para esse evento, porém, pode estar relacionado à área biopsiada, aos procedimentos de seleção dos núcleos, ou mesmo de processamento do espécime.

6.4 Valor prognóstico da graduação da displasia epitelial e do grau de ploidia

Uns dos desafios da estomatologia refere-se ao tratamento das lesões cancerizáveis. Inúmeros marcadores têm sido pesquisados nesse sentido, incluindo o emprego dos mais diversos recursos, como a graduação histopatológica da displasia epitelial, aspectos clínicos das lesões, o uso da imunohistoquímica e os marcadores moleculares (TRALONGO et al., 1999; SCULLY; SUDBO; SPEIGHT, 2003).

A graduação histopatológica da displasia epitelial é, provavelmente, a

alternativa mais empregada com propósitos prognósticos em lesões cancerizáveis da cavidade bucal (VAN DERWALL et al., 1999). Entretanto, apresenta variação considerável intra e inter examinador (ABBEY et al., 1995; KARABULUT et al., 1995; SCULLY; SUDBO; SPEIGHT, 2003).

Nesta pesquisa, buscou-se neutralizar a variação existente na classificação do grau de displasia epitelial, pelos procedimentos de calibragem descritos na metodologia, porém, no dia-a-dia de um patologista, procedimentos de calibração nem sempre são rotineiros.

Entre os 12 casos com diagnósticos iniciais classificados como displasia ausente, 6 não sofreram malignização e 6 progrediram para carcinoma; destes últimos, 5 já expressavam aneuploidia. Esses fatos sugerem que a ausência de displasia não seja indicativa de baixo risco de malignização. Por outro lado, todos os casos classificados como displasia leve a moderada e displasia severa transformaram-se em carcinomas.

Entre os 9 casos com diagnósticos iniciais classificados como diplóides, 5 não sofreram malignização e 4 sofreram, destes, um apresentava displasia epitelial leve a moderada e outro displasia severa. Embora os achados também sugiram que a presença de diploidia não seja indicativa de baixo risco de malignização, o teste estatístico exibiu significância da relação entre o padrão diplóide com os casos sem transformação maligna.

Sete, entre 8 casos de hiperplasias fibroepiteliais, expressaram padrão diplóide, e um, tetraplóide; confirmando a relação entre a euploidia e lesões benignas da cavidade bucal.

Na pesquisa realizada por Femiano e Scully (2005), os autores não encontraram relação entre a aneuploidia e os casos de lesões cancerizáveis

com displasia epitelial. Ao contrário da pesquisa desses autores, no presente estudo, a aneuploidia esteve fortemente relacionada com os casos de displasia severa. Talvez a natureza da amostra e da amostragem, já discutidas previamente, justifique a discrepância entre os estudos.

A determinação do grau de ploidia por citometria digital tem sido avaliada como um recurso no estabelecimento de marcadores prognósticos em vários tipos de lesões de tecidos humanos, tanto no aspecto de malignização, como nos aspectos de sobrevida e resposta a tratamentos rádio e quimioterápicos (BARETTON et al., 1995; SCHIMMING et al., 1998; NOGUCHI et al., 2002). Porém, foram encontradas poucas pesquisas relacionando a técnica de citometria digital e lesões cancerizáveis, principalmente tratando de estudos prognósticos avaliando biópsias seqüenciais (KINOSHITA et al., 1992; HÖGMO et al., 1998).

Neste estudo, realizou-se a avaliação de 17 características morfométricas dos núcleos celulares, 8 delas (área, densidade média, dimensão fractal, IOD, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, diâmetro médio, perímetro), após análise multivariável, permitiram discriminar a qual grupo diagnóstico cada lesão pertencia (displasia ausente, displasia leve a moderada, displasia severa e carcinoma). Assim, é possível que se estabeleçam modelos de interpretação histopatológica, baseados em medidas morfológicas do núcleo celular, que garantam a uniformização de diagnósticos e a implementação de maior objetividade na análise histopatológica.

Durante a proposição dessa pesquisa não se esperava encontrar um marcador que, isoladamente, apresentasse 100% de especificidade e sensibilidade na predição da transformação maligna de lesões cancerizáveis da

cavidade bucal. Porém, se esperava avaliar até que ponto o emprego da citometria digital, na determinação do grau de ploidia dessas lesões, poderia ser empregado como marcador preditivo.

A complexidade do processo do desenvolvimento do câncer não será desmistificada apenas por uma proteína, por um gene, ou por uma característica celular. Por outro lado, a identificação de marcadores prognósticos, com maiores capacidades preditivas, e a subsequente associação de técnicas, provavelmente será o caminho para o estabelecimento de protocolos diagnósticos, prognósticos e terapêuticos que irão garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores de lesões cancerizáveis.

6.5 Considerações finais:

A escassez de publicações, antigas ou atuais, revelam a necessidade de mais investigações das lesões precursoras de câncer da cavidade oral empregando a técnica de citometria digital.

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a necessidade do acompanhamento metódico dos pacientes portadores dessas lesões, bem como a preservação adequada dos espécimes biopsiados, possibilitando melhor emprego de marcadores preditivos e maior conhecimento da história natural da doença de cada paciente.

Com base nos resultados encontrados, referentes à relação da displasia epitelial e de padrões não-diplóides com a progressão de lesões cancerizáveis para carcinoma, propõe-se o emprego conjunto desses métodos diagnósticos no estabelecimento de um modelo para abordagem clínica dos casos de leucoplasias (Apêndice XV).

7 Conclusões

1. Para a amostra deste estudo, o diagnóstico histopatológico de displasia severa mostrou forte relação com a progressão de lesões cancerizáveis da cavidade bucal para carcinoma.

2. Considerando-se os casos de lesões cancerizáveis da cavidade bucal, observou-se frequência de 50%, 13% e 34%, para os padrões diplóide, tetraplóide e aneuplóide, respectivamente. Considerando-se os casos de carcinoma, observou-se 8% de tetraploidia e 92% de aneuploidia.

3. A aneuploidia está fortemente relacionada aos casos de lesões cancerizáveis que progrediram para carcinoma.

4. Para a amostra desta pesquisa, a relação dos graus de ploidia com a progressão de lesões cancerizáveis da cavidade bucal teve maior valor prognóstico para malignização do que a classificação histopatológica.

5. A associação da graduação da displasia epitelial com o grau de ploidia, amplia a capacidade preditiva da transformação maligna de lesões cancerizáveis da cavidade bucal.

6. A análise conjunta das medidas nucleares de área, densidade média,

dimensão fractal, IOD, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, diâmetro médio, perímetro, determinadas por citometria digital, são capazes de discriminar a qual grupo diagnóstico cada lesão pertence.

Referências

- ABBEY, L.M.; KAUGARS, G.E.; GUNSOLLEY, J.C.; BURNS, J.C.; PAGE, D.G.; SVIRSKY, J.A.; EISENBERG, E.; KRUTCHKOFF, D.J.; CUSHING, M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnoses of oral epithelial dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 80, n. 2, p. 188-191, Aug.1995.
- ABDEL-SALAM, M.; MAYALL, B.H.; CHEW, K., SILVERMAN, S. Jr.; GREENSPAN, J.S. Which oral white lesions will become malignant? An image cytometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 69, n. 3, p. 345-350, Mar. 1990.
- ADLER, D.; FEICHTER, G.E.; MAIER, H. Feasibility of DNA impulse cytophotometry (ICP) in the diagnosis of squamous cell cancers of the oral cavity and oropharynx. **Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)**, Stuttgart, v. 65, n. 4, p. 189-190, Apr. 1986.
- AUER, G.; ASKENSTEN, U.; AHRENS, O. Cytophotometry. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 20, n. 6, p. 518-527, June 1989.
- AUER, G.U.; FALLENIUS, A.G.; ERHARDT, K.Y.; SUNDELIN, B.S. Progression of mammary adenocarcinomas as reflect by nuclear DNA content. **Cytometry**, New York, v. 5, n. 4, p. 420-425, July 1984.
- AZIZ, D.C.; BARATHUR, R.B. Quantitation and morphometric analysis of tumors by image analysis. **J Cell Biochem Suppl**, New York, n. 19, p.120-125, 1994.
- BAAK, J.P.; JANSSEN, E. DNA ploidy analysis in histopathology. **Histopathology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 603-614, June 2004.
- BALBINOTTI, R.A.; SILVA, V.D.; PROLLA, J.C. Desenvolvimento e aplicação de método para estudo da ploidia do DNA em carcinomas de estômago e cólon. **Rev. Cient. AMECS**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 17-23, jan./jun. 2001.
- BALSARA, B.R.; BORGES, A.M.; PRADHAN, S.A.; RAJPAL, R.M.; BHISET, A.N. Flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity: correlation with clinical and histopathological features. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, Oxford, v. 30B, n. 2, p. 98-101, 1994.
- BÁNÓCZY, J.; CSIBA, A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 42, n. 6, p. 766-774, Dec.1976.
- BARETTON, G.; LI, X.; STOLL, C.; FISCHER-BRANDIES, E.; SCHMIDT, M.; LOHRS, U. Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas. A retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary, tumors, and lymph node metastases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St Louis, v. 79, n. 1, p. 68-76, Jan. 1995.

BELTRAMI, C.A.; DESINAN, L.; RUBINI, C. Prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. **Pathol Res Pract**, Stuttgart, v. 188, n. 4/5, p. 510-516, June 1992.

BIESTERFELD, S.; GERRES, K.; FISCHER-WEIN, G.; BOCKING, A. Polyploidy in non-neoplastic tissues. **J Clin Pathol**, London, v. 47, n. 1, p. 38-42, Jan. 1994.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis, v. 17, n. 1, p. 1-7, Feb. 1995.

BRIGGS, R.J.; PIENTA, K.J.; HRUBAN, R.H.; RICHTSMEIER, W.J. Nuclear morphometry for prediction of metastatic potential in early squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 118, n. 5, p. 531-533, May 1992.

BRYNE, M.; NIELSEN, K.; KOPPANG, H.S.; DABELSTEEN, E. Grading of nuclear pleomorphism in oral carcinomas. Higher prognostic value than stereological assessment of nuclear volume. **APMIS**, Copenhagen, v. 99, n. 4, p. 333-339, Apr. 1991.

BUNDGAARD, T.; SORENSEN, F.B.; GAIHEDE, M.; OVERGAARD, J. Stereological, histopathologic, flow cytometric, and clinical parameters in the prognostic evaluation of 74 patients with intraoral squamous cell carcinomas. **Cancer**, New York, v. 70, n. 1, p. 1-13, July 1992.

CHATELAIN, R.; HOFFMEISTER, B.; HARLE, F.; BÖCKING, A.; MITTERMAYER, C. DNA grading of oral squamous carcinomas. A preliminary report. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 43-46, Feb. 1989a.

CHATELAIN, R.; WILLMS, A.; BIESTERFELD, S.; AUFFERMANN, W.; BÖCKING, A. Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis, v. 11, n. 3, p. 211-217, June 1989b.

CHEN, R.B.; SUZUKI, K.; NOMURA, T.; NAKAJIMA, T. Flow cytometric analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity in relation to lymph node metastasis. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 51, n. 4, p.397-401, Apr. 1993.

COHEN, C. Image cytometric analysis in pathology. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 482-493, May 1996.

COOMBS, N.J.; GOUGH, A.C.; PRIMROSE, J.N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 27, n. 16, p.e12, Aug. 1999.

CRANE, I.J.; PATEL, V.; SCULLY, C.; PRIME, S.S. Development of aneuploidy in experimental oral carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 10, n. 12, p. 2375-2377, Dec. 1989.

DANQUE, P.O.; CHEN, H.B.; PATIL, J.; JAGIRDAR, J.; ORSATTI, G.; PARONETTO, F. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 6, n. 3, p. 270-275, May 1993.

DOYLE, J.L.; MANHOLD, J.H.Jr. Feulgen microspectrophotometry of oral cancer and leukoplakia. **J Dent Res**, Alexandria, v. 54, n. 6, p. 1196-1199, Nov./Dec. 1975.

FARANDA, A.; COSTA, A.; CANOVA, S.; ABOLAFIO, G.; SILVESTRINI, R. Image and flow cytometric analyses of DNA content in human solid tumors. A comparative study. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis, v. 19, n. 4, p. 338-344, Aug. 1997.

FEMIANO, F.; SCULLY, C. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.10, Suppl 1: E40-4, Apr. 2005.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. **Epidemiologia clínica**. 3a. ed. Porto Alegre:Artes Médicas, 1996.

FLEEGER, J.C.; BAAK, J.P.; SMEULDERS, A.W. Analysis of measuring system parameters that influence reproducibility of morphometric assessments with a graphic tablet. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 513-517, May 1988.

FRANZEN, G.; KLINTENBERG, C.; OLOFSSON, J.; RISBERG, B. DNA measurement--an objective predictor of response to irradiation? A review of 24 squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Br J Cancer**, London, v. 53, n. 5, p. 643-651, May 1986.

FRANZEN G, OLOFSSON J, TYTOR M, KLINTENBERG C, RISBERG B. Preoperative irradiation in oral cavity carcinoma. A study with special reference to DNA pattern, histological response and prognosis. **Acta Oncol**, Madri, v. 26, n. 5, p. 349-355, 1987.

GIARDINA, C.; CANIGLIA, D.M.; D'APRILE, M.; LETTINI, T.; SERIO, G.; CIPRIANI, T.; RICCO, R.; PESCE DELFINO V. Nuclear morphometry in squamous cell carcinoma (SCC) of the tongue. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, Oxford, v. 32B, n. 2, p. 91-96, Mar. 1996.

GIMENÉZ, I.B.; CONTI, C.J. Microspectrophotometric determination of DNA in oral lesions. **J Oral Surg**, Chicago, v. 35, n. 6, p. 465-468, June 1977.

GIROUD, F.; HAROSKE, G.; REITH, A.; BÖCKING, A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. European Society for Analytical

Cellular Pathology. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 201-208, 1998

GOULANDRIS, N.; KARAKITSOS, P.; GEORGOULAKIS, J.; BELLOS, C.; DELIVELIOTIS, C.; LEGAKI, S. Deoxyribonucleic acid measurements in transitional cell carcinomas: comparison of flow and image cytometry techniques. **J Urol**, Hagerstown, v. 156, n. 3, p. 958-90, Sep. 1996.

HAROSKE, G.; GIROUD, F.; REITH, A.; BÖCKING, A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 189-200, 1998.

HÖGMO, A.; LINDSKOG, S.; LINDHOLM, J.; KUYLENSTIERNA, R.; AUER, G.; MUNCK-WIKLAND, E. Preneoplastic Oral Lesions: The Clinical Value of Image Cytometry DNA Analysis, p53 and p21/WAF1 Expression. **Anticancer Res**, Athens, v. 18, n. 5B, p. 3645-3650, Sep./Oct. 1998.

KARABULUT, A.; REIBEL, J.; THERKILDSEN, M.H.; PRAETORIUS, F.; NIELSEN, H.W.; DABELSTEEN, E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 198-200, May 1995.

KINOSHITA, Y.; INOUE, S.; HONMA, Y.; SHIMURA, K. Diagnostic significance of nuclear DNA content and nuclear area in oral hyperplasia, dysplasia, and carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 50, n. 7, p. 728-733, July 1992.

MARAKI, D.; BECKER, J.; BOECKING, A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 33, n.7, p. 398-404, Aug. 2004.

MOLLAOGLU, N.; COWPE, J.G.; LEWIS, M.A. Quantitative cytological assessment of a persistent oral lesion that underwent malignant transformation: a case report. **Cytopathology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 62-67, Feb. 2001.

NOGUCHI, M.; KINJYO, H.; KOHAMA, G.I.; NAKAMORI, K. Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 93, n. 6, p. 682-687, June 2002.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G. Quantitative cytophotometric analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 27, n. 3, p. 224-228, June 1989.

OGDEN, G.R.; GREEN, M.W.; COWPE, J.G. Quantitative assessment of various fixatives on nuclear and cytoplasmic areas in oral cytology. **Histochem J**, London, v. 21, n. 12, p. 703-706, Dec. 1989.

PAPE, H.D.; PFITZER, P. The nuclear DNA-content of turnover cells in the oral cavity. **J Maxillofac Surg**, Stuttgart, v. 1, n. 2, p. 117-121, June 1973.

PFITZER, P.; PAPE, H.D. Characterization of tumor cell populations by DNA-measurements. **Acta Cytol**, Chicago, v. 17, n. 1, p. 19-26, Jan./Feb. 1973.

PFITZER, P.; PAPE, H.D. Investigation of DNA-content of leukoplakia cells or oral mucosa. **J Maxillofac Surg**, Stuttgart, v. 3, n. 2, p. 119-124, June 1975.

RAMAESH, T.; MENDIS, B.R.; RATNATUNGA, N.; THATTIL, R.O. Diagnosis of oral premalignant and malignant lesions using cytomorphometry. **Odontostomatol Trop**, Dakar, v. 22, n. 85, p. 23-28, Mar. 1999.

REMMERBACH, T.W.; WEIDENBACH, H.; HEMPRICH, A.; BOCKING, A. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 159-166, 2003.

SAITO, T.; MIZUNO, S.; NOTANI, K.; FUKUDA, H.; KOBAYASHI, I.; SHINDOH, M.; KOHGO, T. Flow cytometric analysis of cell cycle fractions in oral leukoplakia. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 27, n. 3, p. 217-221, June 1998.

SAITO, T.; NOTANI, K.; MIURA, H.; FUKUDA, H.; MIZUNO, S.; SHINDOH, M.; AMEMIYA, A. DNA analysis of oral leukoplakia by flow cytometry. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 20, n. 5, p. 259-263, Oct.1991.

SAITO, T.; YAMASHITA, T.; NOTANI, K.; FUKUDA, H.; MIZUNO, S.; SHINDOH, M.; AMEMIYA, A. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in oral leukoplakia: relation to clinicopathologic findings. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 44-47, Feb. 1995.

SCHULTE, E.K.W.; WITTEKIND, D.H. Standardization of the Feulgen reaction: The influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 149-157, Apr.1990.

SCHWARTZ, J.L.; MUSCAT, J.E.; BAKER, V.; LARIOS, E.; STEPHENSON, G.D.; GUO, W.; XIE, T.; GU, X.; CHUNG, F.L. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. **Oral Oncol**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 842-954, Dec. 2003.

SCULLY, C.; SUDBO, J.; SPEIGHT, P.M. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 32, n. 5, p. 251-256, May 2003.

SEOANE, J.; ASENJO, J.A.; BASCONES, A.; VARELA-CENTELLES, P.I.; ROMERO, M.A. Flow cytometric DNA ploidy analysis of oral cancer comparison with histologic grading. **Oral Oncol**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 266-272, May 1999.

SERTH, J.; KUCZYK, M.A.; PAESLACK, U.; LICHTINGHAGEN, R.; JONAS, U. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 156, n. 4, p. 1189-1196, Apr. 2000.

SCHIMMING, R.; HLAWITSCHKA, M.; HAROSKE, G.; ECKELT, U. Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis, v. 20, n. 1, p. 43-51, Feb. 1998.

SLOOTWEG, P.J.; RUTGERS, D.H.; WILS, I.S. DNA ploidy analysis of squamous cell head and neck cancer to identify distant metastasis from second primary. **Head Neck**, New York, v. 14, n. 6, p. 464-466, Nov./Dec. 1992.

SOAMES, J.V.; MACLEOD, R.I.; KELLY, P.J. Feulgen hydrolysis profiles and acid-labile DNA in oral squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, Oxford, v. 31B, n. 4, p. 222-226, July 1995.

SORENSEN, F.B. Stereological estimation of the mean and variance of nuclear volume from vertical sections. **J Microsc**, Oxford, v. 162, n. Pt 2, p. 203-229, May 1991.

STEINBECK, R.G. Atypical mitoses in lesions of the oral mucosa: a new interpretation of their impact upon tumorigenesis. **Oral Oncol**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 110-118, Mar. 1997.

STEINBECK, R.G.; MOEGE, J.; HESELMAYER, K.M.; KLEBE, W.; NEUGEBAUER, W.; BORG, B.; AUER, G.U. DNA content and PCNA immunoreactivity in oral precancerous and cancerous lesions. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, Oxford, v. 29B, n. 4, p. 279-284, Oct. 1993.

STRACHAN, T. Genética molecular humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 576 p.

TRALONGO, V.; RODOLICO, V.; LUCIANI, A.; MARRA, G.; DANIELE, E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. **Anticancer Res**, Athens, v. 19, n. 4C, p. 3503-3510 July/Aug. 1999.

TUCKER, J.H.; COWPE, J.G.; OGDEN, G.R. Nuclear DNA content and morphometric characteristics of normal, premalignant and malignant oral smears. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 117-128, Feb. 1994.

VAN DER WAAL, I.; AXELL, T. Oral Leukoplakia: a proposal for uniform reporting. **Oral Oncol**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 521-526, Sep. 2002.

VAN HEERDEN, W.F.; RAUBENHEIMER, E.J.; VAN RENSBURG, E.J.; LE ROUX, R. Lack of correlation between DNA ploidy, Langerhans cell population and grading in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 24, n. 2, p. 61-65, Feb. 1995.

WHEELESS, L.L.; BADALAMENT, R.A.; DE VERE WHITE, R.W.; FRADET, Y.; TRIBUKAIT, B. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. Report on the DNA Cytometry Consensus Conference. **Cytometry**, New York, v. 14, n. 5, p. 478-481, 1993.

WILLIAMS, C.; PONTEN, F.; MOBERG, C.; SODERKVIST, P.; UHLEN, M.; PONTEN, J.; SITBON, G.; LUNDEBERG, J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 155, n. 5, p. 1467-1471, Nov. 1999.

Apêndices

Apêndice I

TERMO DE COMPROMISSO DE CUMPRIMENTO DA RESOLUÇÃO

196/96

Justificativa de não apresentação do termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto de Pesquisa **“Progressão de lesões cancerizáveis da cavidade bucal - análise por citometria digital”** refere-se a pesquisa em espécimes do arquivo do Laboratório de Patologia do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC/RS, e em prontuários de pacientes do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC/RS . Estes espécimes são de pacientes não facilmente encontrados, sem endereço informado ou já falecidos, e por tanto impossível de localizá-los para assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Sendo assim, comprometo-me a cumprir as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde relacionado em IV.1.g “a garantia do sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa”.

Atenciosamente

Porto Alegre, 30 de outubro de 2004.

Pesquisador: João Guilherme Gabriel
Aluno do Programa de Pós-Graduação
Doutorado em Estomatologia Clínica

Orientadora: Dra. Liliane Soares Yurgel
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
de Doutorado em Estomatologia Clínica

Apêndice II

Protocolo de Pesquisa: Progressão de lesões cancerizáveis da cavidade bucal - análise por citometria digital

Código da Amostra:

Nome:

Data de Nascimento:

Idade:

Sexo:

Ficha:

Registro:

Telefone:

Hábitos/Fatores de risco:

Diagnóstico clínico:

Localização da lesão:

Data da biópsia:

Nº AP:

Diagnóstico histopatológico:

Termo de Responsabilidade		Termo de Responsabilidade	
Corte 6µm		Corte 15µm	
Coloração HE		Coloração Feulgen	
Captura de imagem		Captura de imagem	
Cariograma		Cariograma	
Image-Pro Plus		Image-Pro Plus	
Histograma		Histograma	

Apêndice III

FICHA DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

GRUPO: _____ NÚMERO DA LÂMINA: _____

TECIDO EPITELIAL

ATIPIAS		DISPLASIA EPITELIAL	
1. Perda de polaridade das células basais		AUSENTE	(0 atipias)
2. Hiperplasia basilar		LEVE	(1 a 2 atipias)
3. Aumento da relação núcleo-citoplasma		MODERADA	(3 a 4 atipias)
4. Projeções epiteliais em forma de gota		SEVERA	(5 ou mais atipias)
5. Estratificação epitelial irregular		Outras alterações/observações:	
6. Aumento do nº de mitoses/ atípicas			
7. Mitoses na ½ superficial do epitélio			
8. Pleomorfismo celular			
9. Pleomorfismo nuclear			
10. Nucléolos volumosos		Carcinoma Espinocelular	
11. Perda da coesão celular			
12. Ceratin. indiv./grupos camada esp.			
Total de atipias			

Laudo anátomo-patológico nº: _____

Apêndice IV

CARACTERÍSTICAS CITOMÉTRICAS

ÁREA

DENSIDADE MÁXIMA

DENSIDADE MÍNIMA

DENSIDADE (desvio padrão)

DENSIDADE SOMA

DENSIDADE MÉDIA

DIMENSÃO FRACTAL

IOD (*Integrated optical density*)

DIÂMETRO MÁXIMO

DIÂMETRO MÍNIMO

DIÂMETRO MÉDIO

PERÍMETRO 1

PERÍMETRO 2

ROUNDNESS

MARGINAÇÃO

CLUMPNESS

PER-AREA

Apêndice V

CD: planilhas com cálculos e medidas das células

Conteúdo:

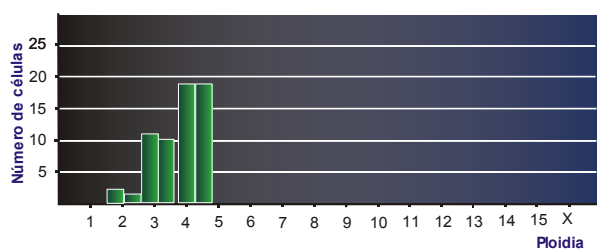
1 - Medidas geradas pelo ImagePro Plus a partir dos cariogramas

2 - Planilha do Microsoft Excel para padronização das IODs

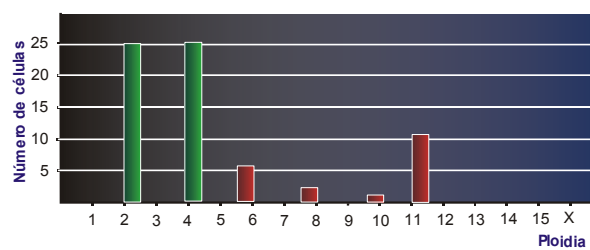
Apêndice VI

*Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos
celulares dos cariogramas dos casos 1 e 2.*

Caso 1A:

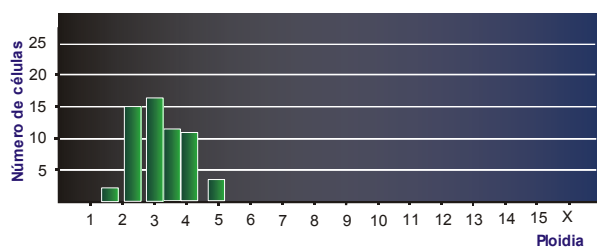


Histograma 1: Padrão tetraplóide

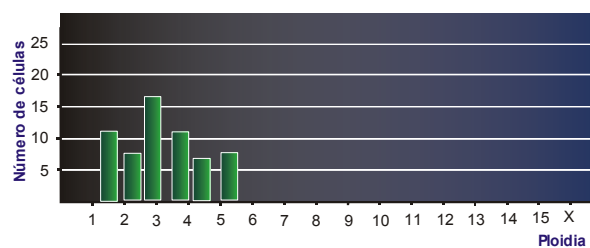


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 1B:

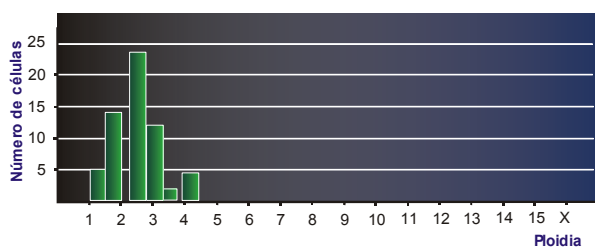


Histograma 1: tetraplóide

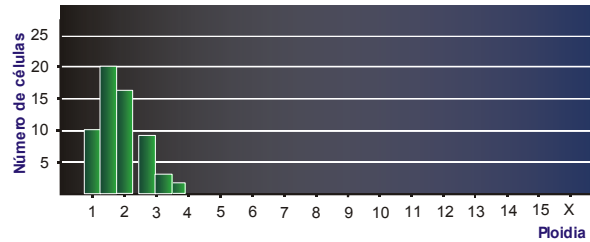


Histograma 2: padrão tetraplóide

Caso 2:



Histograma 1: padrão diplóide

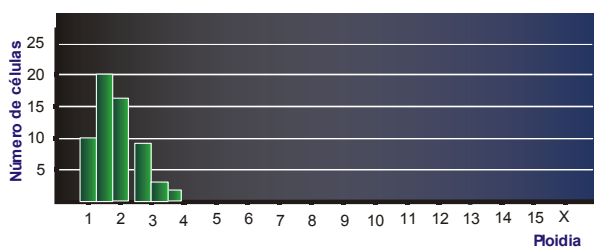


Histograma 2: padrão diplóide

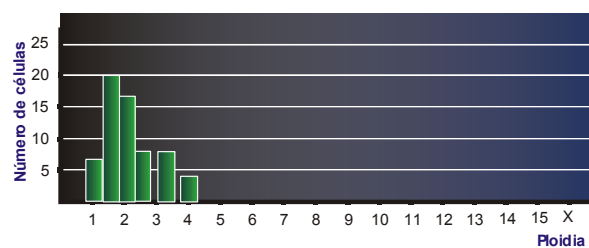
Apêndice VII

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariógramas dos casos 3 e 4.

Caso 3:

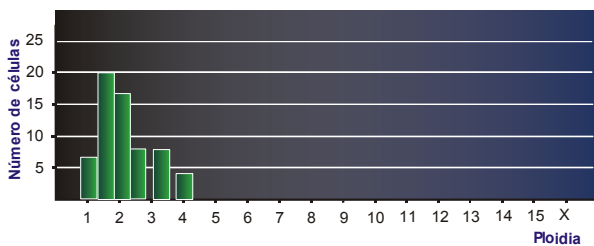


Histograma 1: padrão diplóide

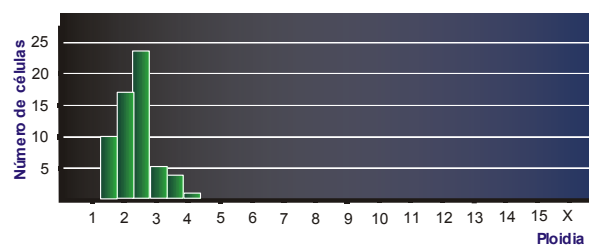


Histograma 2: padrão diplóide

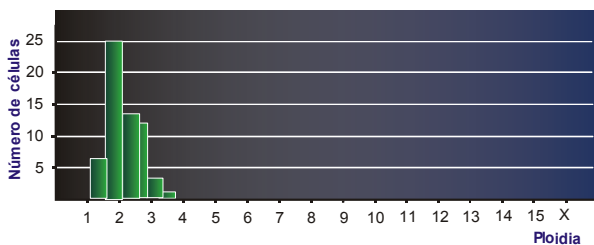
Caso 4:



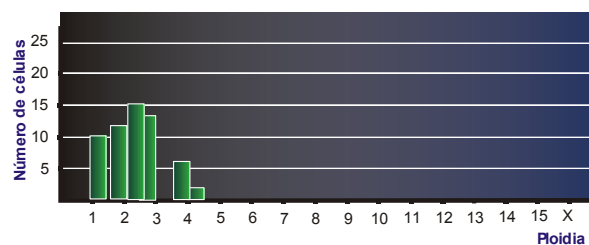
Histograma 1: padrão diplóide



Histograma 2: padrão diplóide



Histograma 3: padrão diplóide

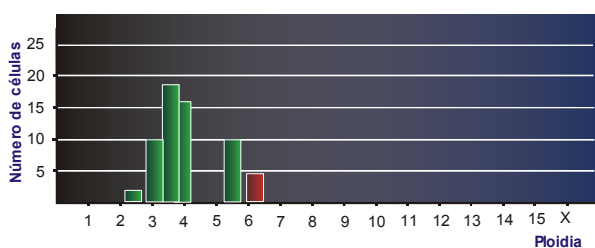


Histograma 4: padrão diplóide

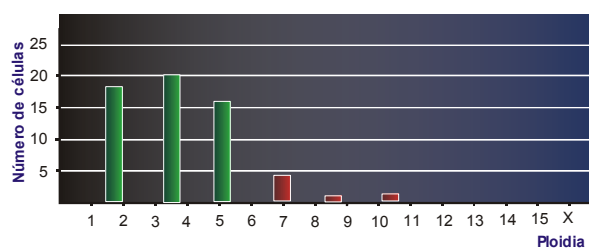
Apêndice VIII

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 5, 6 e 7.

Caso 5:

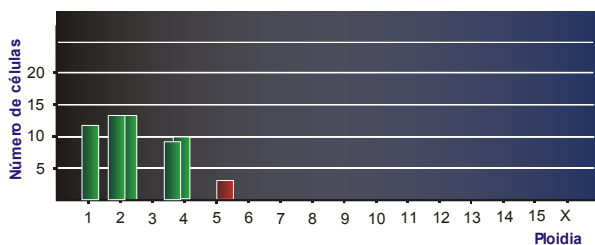


Histograma 1: padrão aneuplóide

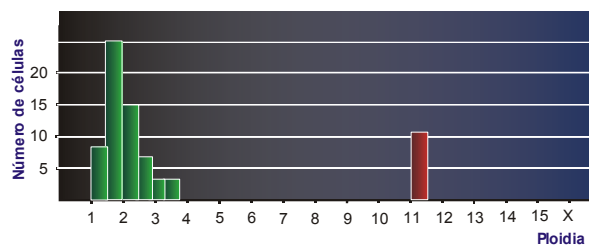


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 6:

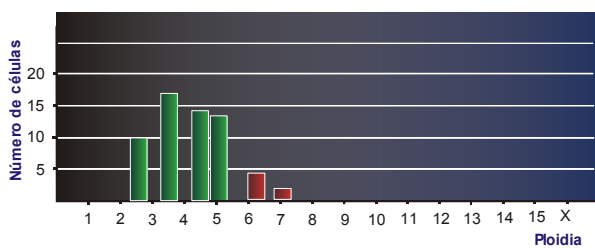


Histograma 1: padrão aneuplóide

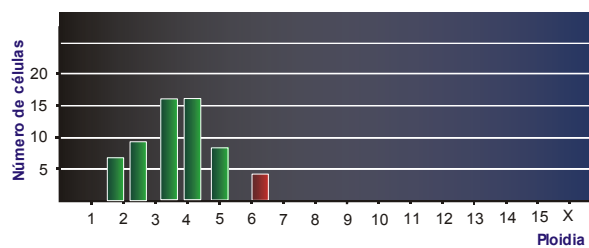


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 7:



Histograma 1: padrão aneuplóide

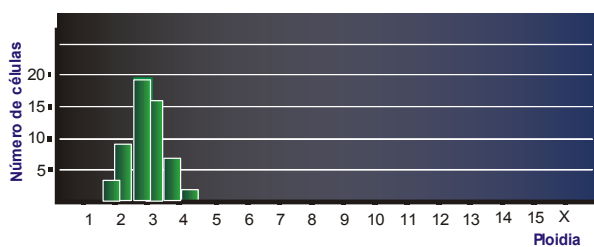


Histograma 2: padrão aneuplóide

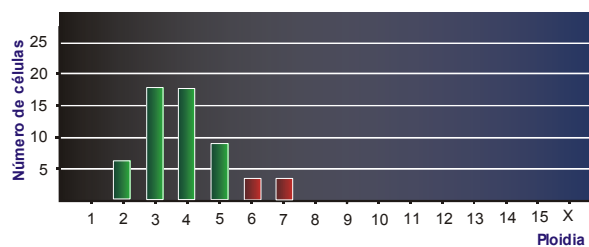
Apêndice IX

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 8, 9 e 10.

Caso 8:

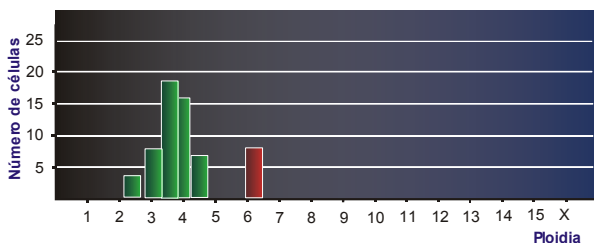


Histograma 1: padrão diplóide

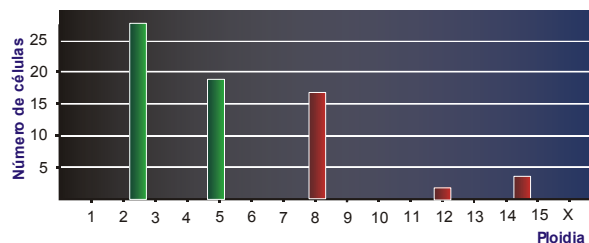


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 9:

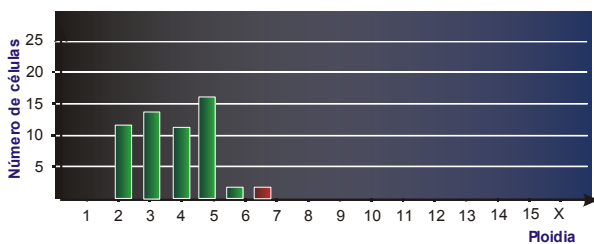


Histograma 1: padrão aneuplóide

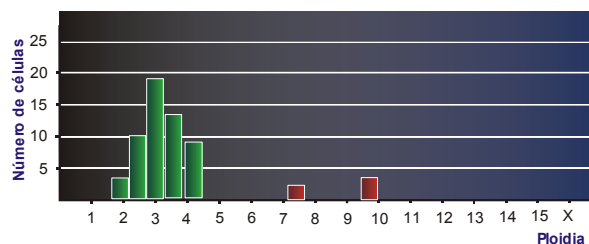


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 10:



Histograma 1: padrão aneuplóide

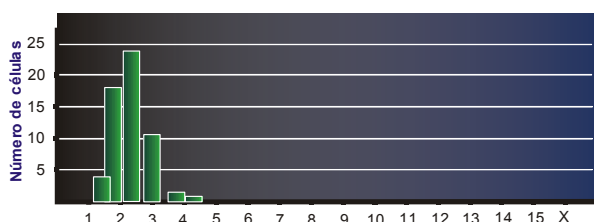


Histograma 2: padrão aneuplóide

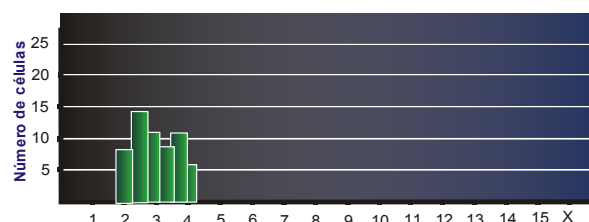
Apêndice X

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas dos casos 11, 12 e 13.

Caso 11:

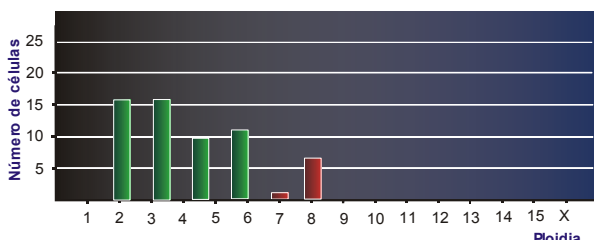


Histograma 1: padrão diplóide

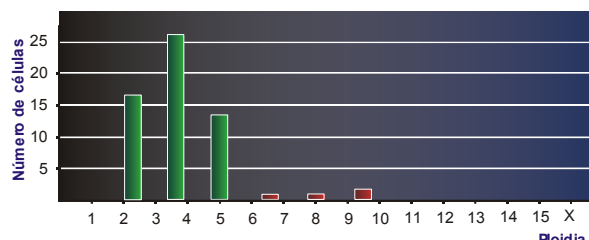


Histograma 2: padrão tetraplóide

Caso 12

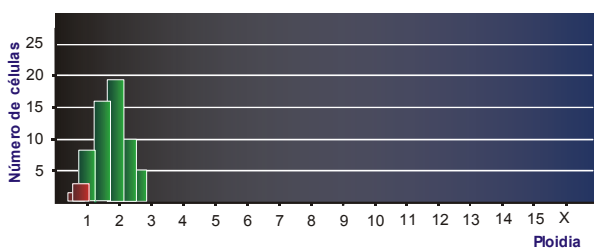


Histograma 1: padrão aneuplóide

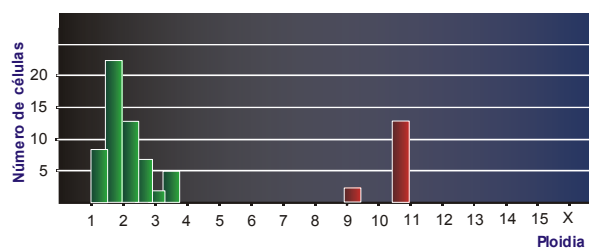


Histograma 2: padrão aneuplóide

Caso 13



Histograma 1: padrão aneuplóide

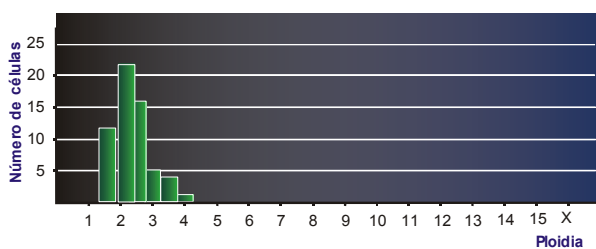


Histograma 2: padrão aneuplóide

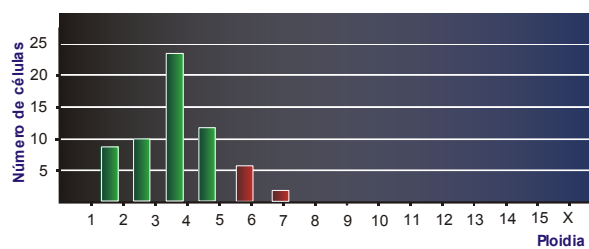
Apêndice XI

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares do cariógramas do caso 14.

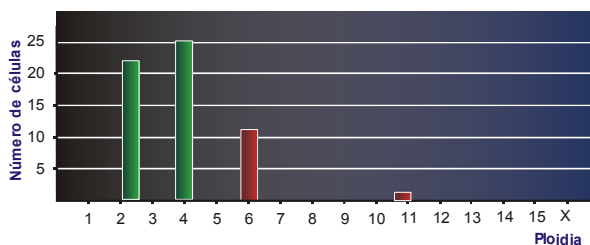
Caso 14:



Histograma 1: padrão diplóide



Histograma 2: padrão aneuplóide

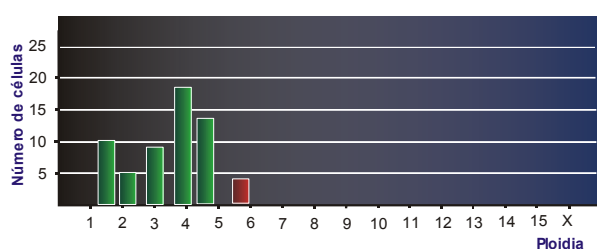


Histograma 3: padrão aneuplóide

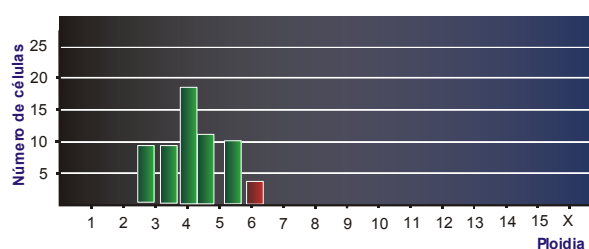
Apêndice XII

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas do caso 15.

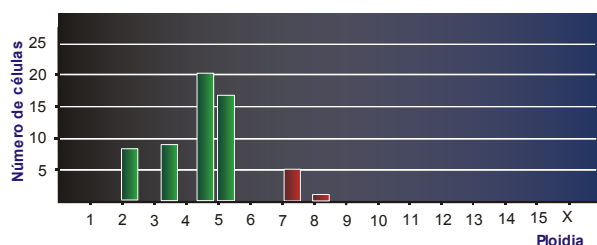
Caso 15:



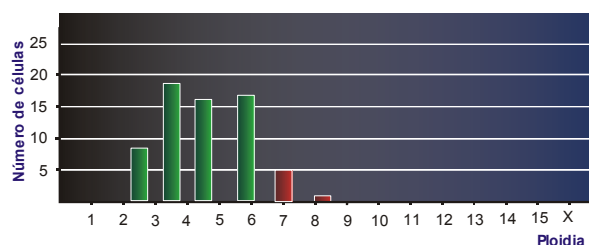
Histograma 1: padrão aneuplóide



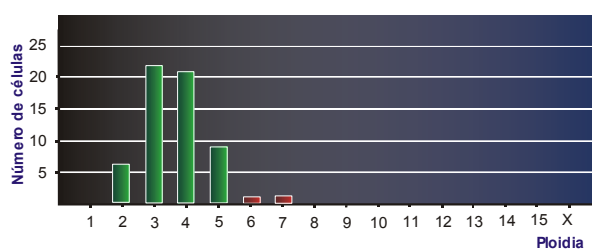
Histograma 2: padrão aneuplóide



Histograma 3: padrão aneuplóide



Histograma 4: padrão aneuplóide

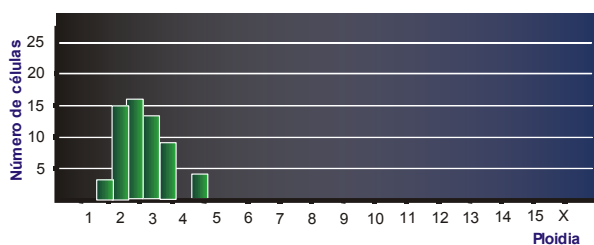


Histograma 5: padrão aneuplóide

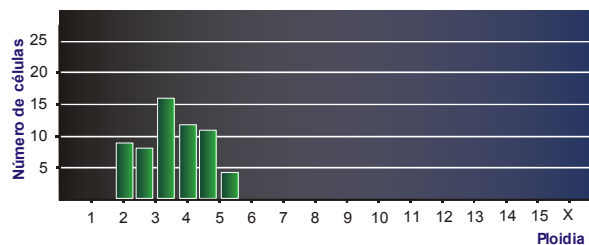
Apêndice XIII

Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas do caso 16.

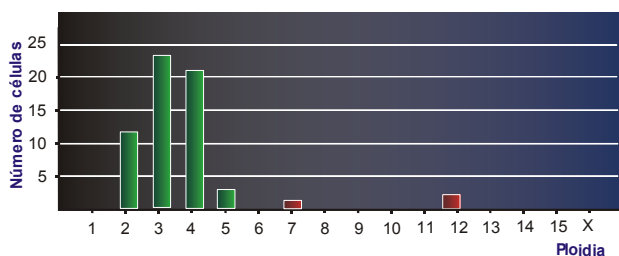
Caso 16



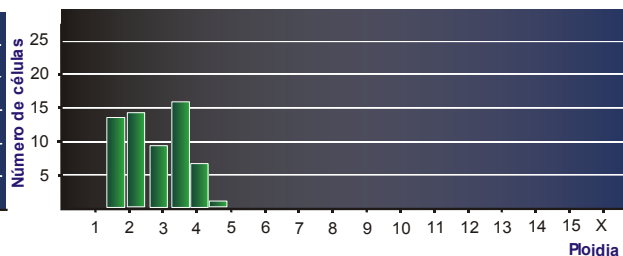
Histograma 1: padrão diplóide



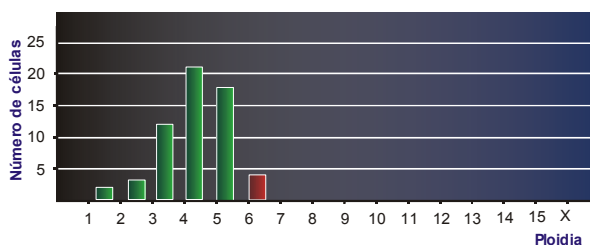
Histograma 2: padrão tetraplóide



Histograma 3: padrão aneuplóide



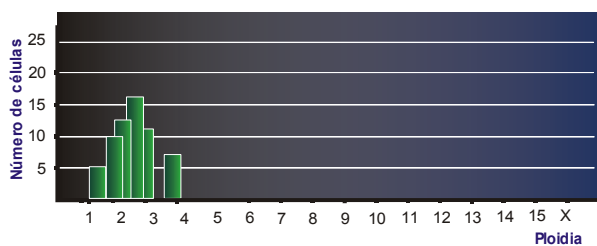
Histograma 4: padrão tetraplóide



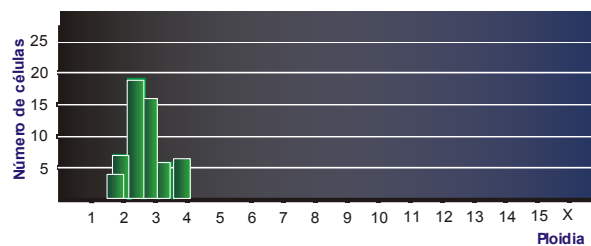
Histograma 5: padrão aneuplóide

Apêndice XIV

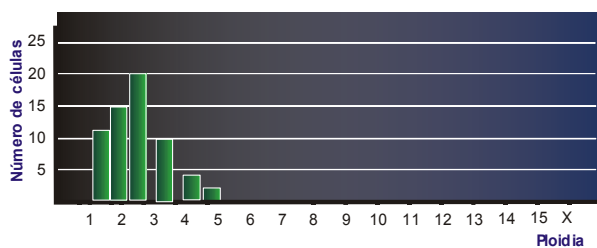
Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas obtidos das hiperplasias fibroepiteliais.



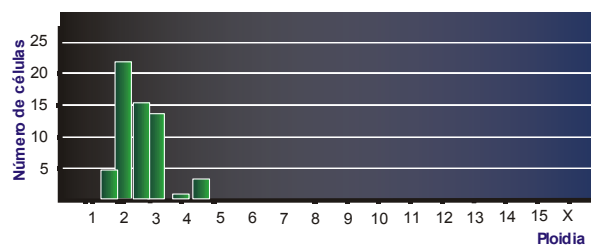
Caso 1: padrão diplóide



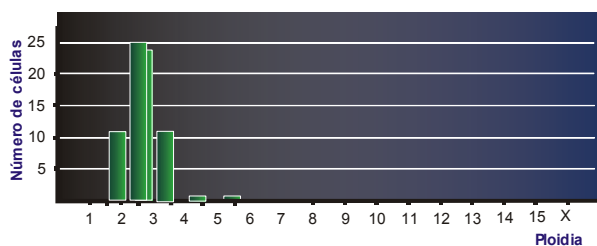
Caso 5: padrão diplóide



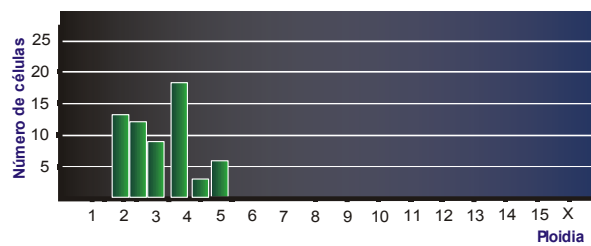
Caso 2: padrão diplóide



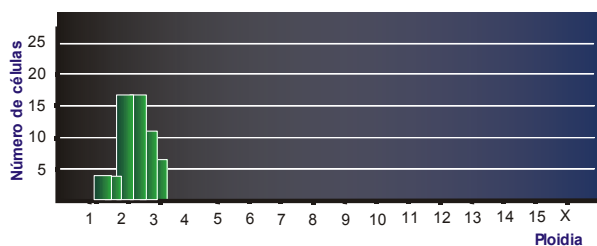
Caso 6: padrão diplóide



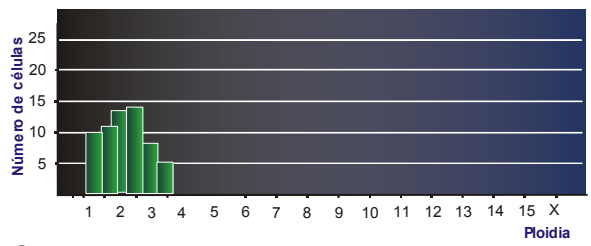
Caso 3: padrão diplóide



Caso 7: padrão tetraplóide



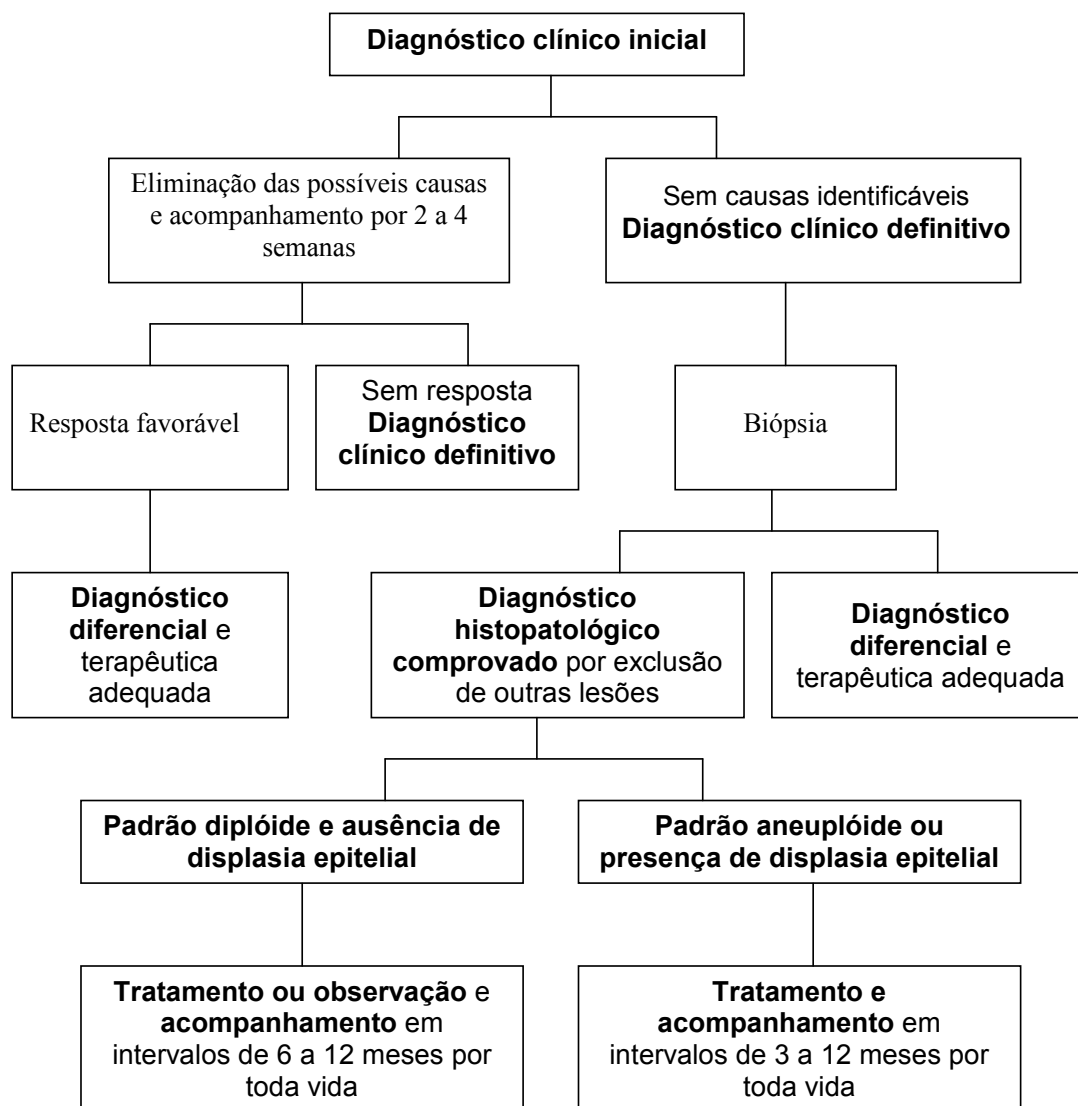
Caso 4: padrão diplóide



Caso 8: padrão diplóide

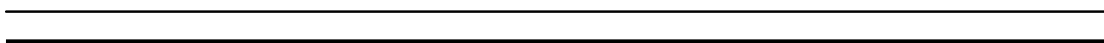
Apêndice XV

Proposta para abordagem clínica das leucoplasias orais.



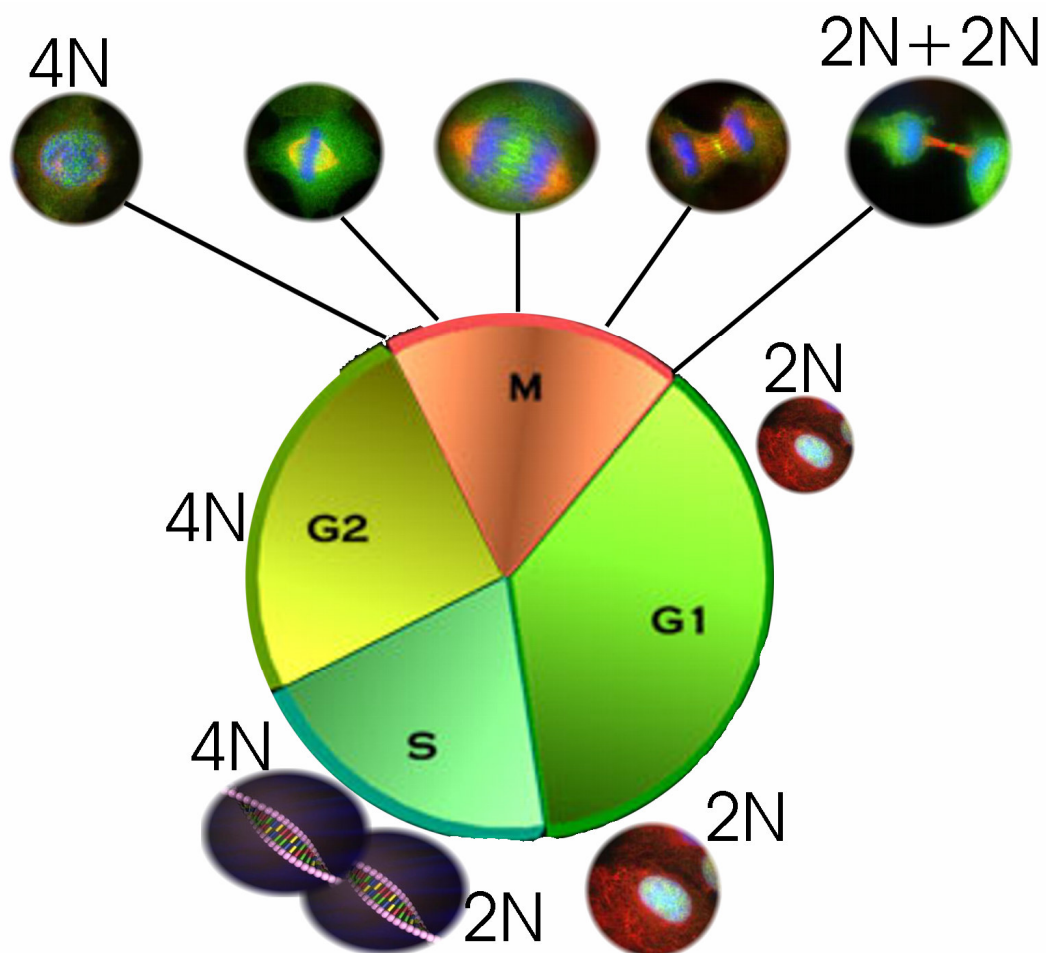
Modificado de VAN DER WAAL, I.; AXELL, T. Oral Leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol*, v. 38, n. 6, p. 521-526, Sep. 2002.

Anexos



Anexo A

Ciclo de vida celular



O ciclo de vida celular divide-se basicamente em duas etapas, a mitose (M) e a interfase (G1, S e G2). Durante a fase G1 da interfase uma célula somática humana possui conteúdo de DNA diplóide ($2C$). Ao longo da fase S, a célula duplica seu conteúdo de DNA, passando da condição diplóide para tetraplóide, permanecendo assim até o final da mitose, quando a célula divide-se em duas células filhas com conteúdo de DNA diplóide.

Anexo B

Protocolo laboratorial para realização da coloração de Feulgen

1. REAGENTES

Reagente 1: Ácido clorídrico 5 M

Reagente 2: Reativo de Schiff

Reagente 3: Disulfito sódico concentrado

2. PREPARAÇÃO

Solução de lavagem de disulfito sódico

Para preparar aproximadamente 100 ml de solução:

Disulfito sódico concentrado (reagente 3)	5 ml
Água destilada	95 ml
HCl (reagente 1)	1 ml

3. Preparação das amostras: para espécimes fixados em formalina e incluídos em parafina

Desparafinizar e re-hidratar os espécimes convencionalmente
Lavar com água corrente

4. Reação de Feulgen

HCl (reativo 1) a 22 °C ($\pm 0,5$ °C)	50 mim.
Água destilada	2 mim.
Água destilada	2 mim.
Reagente de Schiffs	60 mim.
Solução de lavagem de disulfito sódico	3 mim.
Solução de lavagem de disulfito sódico	3 mim.
Água destilada	2 mim.
Água destilada	2 mim.
Etanol 50%	1 mim.
Etanol 70%	1 mim.
Etanol 80%	1 mim.
Etanol 99%	1 mim.
Xileno	1 mim
Montar com Entellan [®] e lamínula	