

ALEXANDRE FUTTERLEIB

**ACURÁCIA DAS TÉCNICAS DE PAPANICOLAOU POR CITOMORFOLOGIA E DE  
FEULGEN POR CITOMETRIA DIGITAL NO DIAGNÓSTICO DE ATIPIAS EM  
EXAMES CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA ORAL**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Doutor em  
Odontologia, Área de Concentração em  
Estomatologia Clínica, da Faculdade de  
Odontologia da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup> Karen Cherubini  
Co-orientador: Professor Dr Vinícius Duval da Silva

Porto Alegre  
2007

## Dedicatória

*Ao meu pai, Rudi, homem de poucas palavras, mas de muitas ações, que sempre soube e sabe ensinar pelo exemplo.*

*À minha mãe, Asta, mulher forte de muitas palavras e muitas ações, sempre amiga, presente e companheira que me ensinou a ler e escrever as primeiras palavras e, em muitos momentos, ensinou-me as palavras da vida.*

*À minha filha, Yasmin, exemplo de dedicação aos estudos, uma linda criança que se tornará uma bela e inteligente mulher.*

*À minha querida amiga, companheira, namorada, noiva, tripulante do meu coração e de minha mente, Andrea, que consegue ser uma fortaleza em alguns momentos e, em outros, fascina pela sua fragilidade apaixonantemente feminina.*

## Agradecimentos

*Em especial, à Orientadora e amiga, Professora Doutora Karen Cherubini, pelos ensinamentos, puxões de orelha, definição de rumos, dedicação e competência profissional no desenvolvimento desta pesquisa.*

*À Professora Doutora Nilza Pereira da Costa, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS.*

*Às professoras do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Concentração em Estomatologia - Doutorado, Professoras Doutoras Liliane Soares Yurgel, Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo, Fernanda Salum e Maria Antonieta Lopes de Souza, pela atenção e pelos ensinamentos e exemplos de profissionalismo.*

*Ao Professor Doutor Vinícius Duval da Silva, pelo auxílio nas questões citométricas, as quais eu desconhecia.*

*À Professora Doutora Dalva Maria Pereira Padilha, amiga, orientadora, conselheira, pela confiança, por abrir as portas da academia e iniciar o processo do conhecimento científico em minha vida.*

*À Doutora Lúcia do Laboratório KCM, pelo fornecimento dos Kits DNA Citoliq e coloração das lâminas de Papanicolaou.*

*Ao Tiago pela confecção das lâminas histológicas e auxílio durante a coloração de Feulgen.*

*Aos Professores Doutores componentes da Banca Examinadora, pela participação e reorientação de rumos.*

*Aos colegas de Doutorado, em especial, ao João Gabriel, pela inspiração e incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa. A Alisson, Aderson, Carol, Mariana, José, Sandra, Fabiana, Ivete e Flaviana, pela amizade e contribuições.*

*Navegadores antigos tinham uma frase gloriosa: "Navegar é preciso; viver não é preciso". Quero para mim o espírito desta frase, transformada a forma, para casar com o que sou: Viver não é necessário; o que é necessário é criar. Não conto gozar a minha vida; nem gozá-la penso. Só quero torná-la grande, ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a minha alma a lenha desse fogo. Só quero torná-la de toda a humanidade; ainda que para isso tenha de a perder como minha..."*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo comparar a acurácia dos métodos de Papanicolaou por citomorfologia e de Feulgen por citometria digital na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral. A amostra foi constituída por 68 pacientes portadores de lesões com indicação de biópsia assim distribuídas de acordo com o diagnóstico clínico: 25 carcinomas espinocelulares, uma eritroplasia, três fibromas, 23 hiperplasias fibroepiteliais, 14 leucoplasias e nove casos de líquen plano. As lesões foram submetidas à citologia esfoliativa em meio líquido e, imediatamente após a coleta citológica, foram biopsiadas. As amostras citológicas foram processadas pelos métodos de Papanicolaou e de Feulgen, e as amostras histopatológicas, pela técnica da parafina e coradas com hematoxilina e eosina, o que totalizou 225 lâminas, 75 para cada método. As lâminas processadas pelo método de Papanicolaou foram submetidas à análise citomorfológica em microscópio ótico e classificadas em positivas e negativas para atipia celular. No método de Feulgen, a análise foi feita por citometria digital, calculando-se o grau de ploidia do DNA. As amostras histopatológicas constituíram o padrão-ouro, a partir do qual foram calculados os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia para ambos os métodos citopatológicos. O método de Papanicolaou teve sensibilidade de 79,4% e especificidade de 92,1%, enquanto para o Feulgen esses índices foram, respectivamente, 96,8% e 53,1%. Os índices de valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram, respectivamente, de 90% e 83,3% para o Papanicolaou e de 66,7% e 94,4% para o Feulgen. A acurácia de Papanicolaou foi de 86,1% e de Feulgen 74,6%. Ao serem excluídas as leucoplasias da análise, o Papanicolaou sofreu incremento de sensibilidade (96,2%) sem diferir significativamente do Feulgen neste quesito. Ao serem excluídas todas as lesões cancerizáveis da análise, os dois métodos citopatológicos exibiram 100% de sensibilidade. Os resultados permitiram concluir que: (1) os métodos de Feulgen associado à citometria digital e de Papanicolaou por citomorfologia exibem acurácia semelhante na detecção de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral ( $p=0,093$ ); (2) o método de Papanicolaou associado à análise citomorfológica tem valor preditivo positivo ( $p=0,023$ ) e especificidade ( $p<0,001$ ) superiores aos do Feulgen, enquanto este exibe maior sensibilidade ( $p=0,037$ ). Os métodos não diferem significativamente no quesito valor preditivo negativo ( $p=0,251$ ); (3) no método de Feulgen, as variáveis citométricas nucleares densidade ótica integrada, área e diâmetro são capazes de diferenciar lesões positivas e negativas para atipia em exames citopatológicos da mucosa oral; (4) as diferenças de sensibilidade e especificidade sugerem que ambos os métodos citopatológicos sejam aplicados de forma combinada.

Palavras-chave: Feulgen; Papanicolaou; citopatologia; atipia celular; lesões cancerizáveis; câncer

## ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the accuracy of the methods of Papanicolaou with cytomorphology and of Feulgen with digital cytometry in the detection of cellular atypias in cytopathologic examinations of the oral mucosa. The sample comprised 68 patients with lesions as indication for biopsy, and were distributed based on clinical diagnosis as follows: 25 squamous carcinomas, one erythroplakia, three fibromas, 23 fibroepithelial hyperplasias, 14 leukoplakias and nine cases of lichen planus. The lesions were submitted to exfoliative cytology by liquid-based system, and were immediately biopsied after collection of the cytologic specimen. The cytologic specimens were processed by the methods of Papanicolaou and of Feulgen, and the histopathologic specimens by the technique of paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin, which totaled 225 slides, 75 for each method. The slides processed by the Papanicolaou method were submitted to cytomorphologic analysis using a light microscope and classified as positive or negative for cellular atypia. In the Feulgen method, the analysis was carried out by digital cytometry, calculating the degree of DNA ploidy. The histopathologic specimens constituted the gold standard from which were calculated the indices of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy for the two cytopathologic methods. The Papanicolaou method had a sensitivity of 79.4% and specificity of 92.1%, while for the Feulgen these indices were respectively 96.8% and 53.1%. The indices of positive and negative predictive value were respectively 90% and 83.3% for the Papanicolaou and 66.7% and 94.4% for the Feulgen. The accuracy was 86.1% for the Papanicolaou and 74.6% for the Feulgen. If the leukoplakias were excluded from the evaluation, the Papanicolaou method increased in sensitivity (96.2%) without differing significantly for the Feulgen in this respect. If all the premalignant lesions were excluded from the evaluation, the two cytopathologic methods exhibited 100% sensitivity. The results allowed us to conclude the following. (1) The methods of Feulgen combined with digital cytometry and of Papanicolaou with cytomorphology exhibit a similar accuracy in the detection of atypias in cytopathologic examinations of the oral mucosa ( $p=0.093$ ). (2) the Papanicolaou method combined with cytomorphologic analysis has a positive predictive value ( $p=0.023$ ) and specificity ( $p<0.001$ ) superior to those for Feulgen, while the latter has greater sensitivity ( $p=0.037$ ). The methods did not differ significantly with regard to the negative predictive value ( $p=0.251$ ). (3) In the Feulgen method, the cytometric nuclear variables integrated optical density, area and diameter are capable of differentiating positive and negative lesions for atypia in cytopathologic examinations of the oral mucosa. (4) The difference in sensitivity and specificity suggests that the two cytopathologic methods should be applied in combination.

Key words: Feulgen; Papanicolaou: cytopathology; cellular atypia; cancerous lesions; cancer

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Kit para citologia em meio líquido: escova citológica e frasco contendo a solução conservante	39
Figura 2	Citologia esfoliativa de carcinoma espinocelular. A escova citológica era rotada cinco vezes em sentido horário	40
Figura 3	Biópsia incisional de carcinoma espinocelular: (A) anestesia; (B) remoção do fragmento; (C) espécime biopsiado	40
Quadro 1	Distribuição da amostra de acordo com o diagnóstico clínico e o processamento empregado	41
Figura 4	Desenho esquemático que ilustra o mecanismo de análise das lâminas. Observar a divisão em quadrantes e sentido horário da análise	42
Figura 5	Células epiteliais normais coradas pelo método de Papanicolaou (aumento aproximado de 400X)	43
Figura 6	Células epiteliais atípicas coradas pelo método de Papanicolaou (aumento aproximado de 400X)	44
Figura 7	Captura das imagens dos núcleos no programa Image-Pro-Plus 4.0	45
Figura 8	Comando para conversão em tons de cinza	46
Figura 9	Imagem convertida em tons de cinza e seleção das variáveis	46
Figura 10	Seleção dos núcleos	47
Figura 11	Classificação dos histogramas de DNA. Modificado de Auer et al. (1991)	47
Quadro 2	Fórmulas para cálculo dos índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia. Fonte: Castro AA. Projeto de pesquisa (parte III – tipo de estudo) Planejamento da Pesquisa. São Paulo: AAC; 2001	49

Figura 12	Resultados positivos para atipia celular, negativos para atipia celular e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007	53
Figura 13	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007	54
Figura 14	Resultados verdadeiro-positivos, falso-negativos e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007	55
Figura 15	Resultados verdadeiro-negativos, falso-positivos e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007	56
Figura 16	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007	58
Figura 17	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se as leucoplasias. Porto Alegre, 2007	59
Figura 18	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se leucoplasia, líquen plano e eritroplasia. Porto Alegre, 2007	60
Figura 19	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se os carcinomas. Porto Alegre, 2007	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da amostra de acordo com os diagnósticos clínicos e histopatológicos. Porto Alegre, 2007	51
Tabela 2	Distribuição dos resultados citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007	52
Tabela 3	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007	54
Tabela 4	Distribuição dos resultados verdadeiro-positivos, falso-negativos e insatisfatórios dos exames citopatológicos pelos métodos de Papanicolaou e Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007	55
Tabela 5	Distribuição dos resultados citopatológicos verdadeiro-negativos, falso-positivos e insatisfatórios dos exames citopatológicos pelos métodos de Papanicolaou e Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007	56
Tabela 6	Distribuição das amostras de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007	57
Tabela 7	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007	57
Tabela 8	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se as leucoplasias. Porto Alegre, 2007	59
Tabela 9	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se leucoplasia, líquen plano e eritroplasia. Porto Alegre, 2007	60
Tabela 10	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se os carcinomas. Porto Alegre, 2007	61

Tabela 11	Índice de concordância Kappa entre os métodos de Papanicolaou e de Feulgen e o exame histopatológico (padrão-ouro). Porto Alegre, 2007	62
Tabela 12	Média e desvio-padrão das variáveis citométricas nucleares pelo método de Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico das lesões. Porto Alegre, 2007	63
Tabela 13	Área, diâmetro e densidade ótica integrada nucleares, segundo a positividade ou negatividade para atipia celular. Porto Alegre, 200	63

## SUMÁRIO

1	<i>INTRODUÇÃO</i>	15
2	<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	18
2.1	CITODIAGNÓSTICO	18
2.2	CITOMETRIA DIGITAL, REAÇÃO DE FEULGEN E GRAU DE PLOIDIA	20
2.3	CITODIAGNÓSTICO ORAL	24
3	<i>PROPOSIÇÃO</i>	36
3.1	HIPÓTESE	36
3.2	OBJETIVO GERAL	36
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	38
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	38
4.2	APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	38
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	38
4.4	PROCEDIMENTOS	39
4.4.1	<i>Coleta de Material da Cavidade Oral</i>	39
4.4.2	<i>Preparo das Lâminas</i>	41
4.4.3	<i>Análise das Lâminas</i>	41
4.4.3.1	Análise das Lâminas de Papanicolaou	42
4.4.3.2	Análise das Lâminas de Feulgen	44
4.4.3.3	Critérios de Análise Histopatológica	48
4.4.4	<i>Análise Estatística</i>	49

5	<i>RESULTADOS</i>	51
5.1	<i>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA</i>	51
5.2	<i>ANÁLISE CITOPATOLÓGICA</i>	52
5.2.1	<i>Resultado Citopatológico X Diagnóstico Histopatológico</i>	52
5.2.2	<i>Resultado Citopatológico X Presença/Ausência de Atipia Celular ao Exame Histopatológico, Independentemente do Diagnóstico Histopatológico</i>	56
5.2.3	<i>Resultados Citopatológicos Excluindo-se as Leucoplasias</i>	58
5.2.4	<i>Resultados Citopatológicos Excluindo-se Leucoplasia, Líquen plano e Eritroplasia</i>	59
5.2.5	<i>Resultados Citopatológicos Excluindo-se os Carcinomas</i>	60
5.2.6	<i>Concordância Entre os Métodos de Papanicolaou e Feulgen e o Exame Histopatológico (padrão-ouro)</i>	62
5.2.7	<i>Área, Diâmetro e Densidade Ótica Integrada Nucleares</i>	62
6	<i>DISCUSSÃO</i>	66
7	<i>CONCLUSÕES</i>	76
8	<i>REFERÊNCIAS</i>	78
9	<i>ANEXOS</i>	85
10	<i>APÊNDICES</i>	88

## *INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca tem início sutil e assintomático, fato que retarda o diagnóstico e exige atenção do clínico, especialmente se fatores de risco como tabaco, álcool e exposição solar estiverem presentes. O carcinoma de células escamosas ou espinocelular representa mais de 90% de todos os tumores malignos que afetam a cavidade oral (NEVILLE; DAY, 2002) e é, freqüentemente, precedido por alterações da mucosa identificáveis ao exame clínico. Tais lesões apresentam-se como máculas ou placas, brancas ou vermelhas, denominadas leucoplasias e eritroplasias, respectivamente (SCULLY; PORTER, 2000; NEVILLE; DAY, 2002).

O método clássico para o diagnóstico das lesões cancerizáveis e do câncer de boca consiste no exame histopatológico do material obtido por biópsia. A análise de cortes histológicos ao microscópio é o meio mais confiável para se determinar a natureza dessas lesões da mucosa oral (EPSTEIN et al., 2002). Entretanto, a biópsia é um método cruento que implica procedimento cirúrgico, com limitações técnicas para alguns profissionais e envolvimento psicológico do paciente. Também há limitações nos casos de lesões extensas, nas quais é importante selecionar o local mais adequado à coleta, pois as características histológicas variam de acordo com a região biopsiada, o que pode acarretar erro diagnóstico (ACHA et al., 2005).

A citologia esfoliativa constitui manobra clínica em que, ao raspar-se o tecido, é obtido material para exame citopatológico. O procedimento tem a vantagem de não causar desconforto ao paciente. A citopatologia, por sua vez, é uma técnica laboratorial de baixo custo que, por meio da análise de células descamadas da mucosa, pode revelar atipias celulares antes de sua manifestação clínica (RADOS et al., 1999). Vários estudos têm demonstrado índices confiáveis de sensibilidade e especificidade da técnica (EPSTEIN et al., 2002; FREITAS et al., 2004; ACHA et al., 2005).

A aplicação da citologia esfoliativa à cavidade oral teve início no final do século XIX, quando Miller, em 1890, identificou células epiteliais e leucócitos em saliva humana. Em 1928, Papanicolaou desenvolveu estudos sobre as características celulares de esfregaços obtidos de secreção vaginal. A partir de 1940, a coloração de Papanicolaou passou a ser rotineiramente empregada na pesquisa de atipias de células descamadas da mucosa vaginal. Com o sucesso do método no diagnóstico do câncer do colo uterino, houve interesse por seu emprego

a outros sítios anatômicos, como a cavidade oral (MONTGOMERY, 1951).

Nas décadas de 60 e 70, a citologia esfoliativa atingiu posição de destaque no meio odontológico. Entretanto, a técnica apresentava várias limitações, e o seu papel diagnóstico, na maioria dos casos, era indicativo e não definitivo, o que gerou perda de credibilidade. Com o desenvolvimento de novas técnicas citomorfométricas, imunocitoquímicas e de biologia molecular, a citologia esfoliativa vem retomando prestígio como método diagnóstico. A combinação de análises citomorfológicas na coloração de Papanicolaou com análises citomorfométricas na coloração de Feulgen tem elevado os índices de sensibilidade da citologia esfoliativa oral (OGDEN et al., 1997).

O método de Feulgen consiste em uma reação de natureza estequiométrica em que cada molécula fixada pelo reativo de Schiff corresponde a uma porção constante e equivalente da molécula de DNA. A técnica foi desenvolvida por Robert Feulgen e Rossenbeck, em 1924, para identificação de material nuclear (HARDIE et al., 2002). A mensuração do grau de ploidia do DNA emprega a citometria digital em amostras coradas pela reação de Feulgen, cujo processamento laboratorial não requer capacitação técnica superior à já desenvolvida nos laboratórios de anatomia patológica. Tais fatos sugerem que a técnica seja aplicável à identificação de lesões com potencial de malignização (SCULLY et al., 2003).

O processo de carcinogênese tem sua origem no núcleo de uma única célula que, alterado, desencadeia a reprodução de clones celulares tumorais. As alterações celulares malignas aumentam o conteúdo de DNA. Na reação de Feulgen, os reagentes têm afinidade pelos componentes nucleares, e os resultados do grau de ploidia são obtidos por cálculos matemáticos gerados no computador. Isso evita a subjetividade e sugere que a análise por citometria digital na reação de Feulgen seja mais eficaz do que a análise citomorfológica na coloração de Papanicolaou para identificação de atipias celulares.

O presente estudo teve por objetivo comparar a acurácia dos métodos de análise citomorfológica pela coloração de Papanicolaou e de citometria digital por Feulgen na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral.

## *REVISÃO DA LITERATURA*

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CITODIAGNÓSTICO

O citodiagnóstico, também denominado exame citológico ou citologia, é um processo de diagnóstico morfológico que se baseia em características microscópicas das células e dos componentes extracelulares (FOLSOM et al., 1972). Nesse espectro, inclui-se a citologia esfoliativa, procedimento que consiste em removerem-se as células mais superficiais da mucosa por meio de esfoliação para posterior exame microscópico (COHEN, 1966). Os instrumentos empregados para a coleta podem ser espátula de madeira umedecida, espátula metálica, haste flexível com ponta de algodão (KAHN, 2001) e escova citológica (*cytobrush*), sendo que esta apresenta maior praticidade do que as espátulas e permite distribuição mais uniforme das células epiteliais (JONES et al., 1994).

Papanicolaou e Traut desenvolveram um método de coloração em citologia esfoliativa, simples e de baixo custo, confiável e passível de ser empregado em rastreamentos para prevenir e controlar o câncer de colo de útero. O método de Papanicolaou é empregado para a coloração de células descamadas da mucosa. As células são fixadas em lâminas, tratadas com um corante nuclear de hematoxilina de Harris e contracoradas com uma mistura de laranja G, eosina amarela e verde resistente FCF. O tratamento confere cor característica aos núcleos e componentes citoplasmáticos (JOHNSON; KLEIN, 1956).

Chaudhry et al. (1967) compararam achados histopatológicos e citopatológicos em modelos experimentais (hamsters) após indução de carcinogênese com antraceno. O índice de concordância entre os achados citológicos e histológicos foi de 80%. Lundgren et al. (1981) compararam os diagnósticos citopatológicos e histopatológicos de 350 microlaringoscopias. Os esfregaços citológicos foram corados pelo método de Papanicolaou e classificados em quatro tipos: benigno (normal ou sem displasia), atipia moderada, atipia severa e carcinoma. Foi realizada biópsia em todos os casos. Os resultados histopatológicos revelaram 190 espécimes com diagnóstico de neoplasia maligna, para os quais o exame citopatológico evidenciou 157 (82,7%) esfregaços compatíveis com carcinoma e 33 (17,3%) resultados citopatológicos normais. Ao exame histopatológico, foram diagnosticadas 160 (45,7%) lesões benignas que, nas

citopatologias, resultaram em 134 (83,75%) esfregaços negativos e 26 (16,25%) com atipia moderada ou severa. Nestas 26 lesões com resultado falso-positivo, realizaram-se novas biópsias, sendo que, em seis espécimes, o novo exame histopatológico exibiu intensas alterações inflamatórias. Em outros seis, foi diagnosticado papiloma; em dois, o resultado foi negativo para displasia ou carcinoma e, em um, quatro meses após a primeira biópsia, o exame histopatológico diagnosticou carcinoma invasor bem-diferenciado. Nos 11 pacientes restantes, os resultados confirmaram os falso-positivos do exame citopatológico. Os pacientes foram controlados a cada seis meses durante sete anos, não sendo observadas alterações malignas à laringoscopia direta. Os autores concluíram que a citologia esfoliativa pode ter valor diagnóstico auxiliar aos procedimentos laringoscópicos, mas um esfregaço negativo não descarta a possibilidade de carcinoma.

De acordo com Ceccotti (1991), são numerosas as desvantagens da citologia esfoliativa em relação à segurança do diagnóstico. O método examina células da camada superficial do epitélio e tem o inconveniente de resultados falso-negativos em lesões malignas. Entretanto, há provas de seu valor como exame complementar. A citologia em meio líquido é uma modalidade de citologia que se tem mostrado como importante alternativa para aumentar a sensibilidade do exame de Papanicolaou. Apresenta uma série de vantagens em relação à técnica convencional, uma vez que possibilita melhor disposição celular, maior número de células e menor índice de amostras inadequadas ou limitadas, o que facilita a interpretação e o diagnóstico. Os preparados de citologias cervicovaginais em meio líquido oferecem melhor qualidade, pois diminuem a incidência de casos insatisfatórios ou com limitações. As dimensões e a limpeza da amostra em meio líquido também oferecem maior conforto visual ao observador e restringem o campo de observação aumentando a chance de detecção de alterações celulares. Embora o esfregaço convencional ainda seja preconizado para o escrutínio de lesões de colo uterino em grandes populações, parece evidente que o emprego dos preparados em meio líquido aprimora o teste de Papanicolaou (PEREIRA et al., 2003).

De acordo com Hayama et al. (2005), a citologia convencional é o método mais freqüentemente empregado nos esfregaços de rotina. Entretanto, as amostras obtidas por citologia em meio líquido proporcionam melhor visualização da morfologia celular. Segundo os autores, a desvantagem da técnica em meio líquido reside na necessidade de um laboratório com equipamentos específicos e pessoal

treinado para o manejo e processamento das amostras.

Campagnoli et al. (2005) fizeram uma revisão da literatura sobre as vantagens, desvantagens, técnicas empregadas e uso da citologia em meio líquido no diagnóstico de lesões orais e da sua viabilidade na Odontologia. De acordo com os autores, a citologia em meio líquido é um avanço em relação à citologia tradicional, devendo ser mais explorada pelo cirurgião-dentista, principalmente como um instrumento auxiliar no diagnóstico de lesões vesículo-bolhosas, infecções fúngicas, lesões cancerizáveis e no diagnóstico precoce do câncer de boca.

## 2.2 CITOMETRIA DIGITAL, REAÇÃO DE FEULGEN E GRAU DE PLOIDIA

A morfometria refere-se à descrição de características quantitativas de um objeto ou estrutura, sejam elas número, comprimento, largura ou volume. A citometria, por sua vez, consiste na quantificação de um componente químico celular ou tecidual, tal como a ploidia celular ou proteínas marcadas com agentes imunoistoquímicos (BAAK; JANSSEN, 2004). A citometria digital baseia-se na propriedade de absorção da luz que as substâncias possuem. Quando uma fonte de luz incide sobre uma substância, esta absorve determinada quantidade de luz, que é proporcional à sua concentração. O fenômeno é expresso pela Lei de Lambert-Beer com a seguinte fórmula:  $\log I_0/I = \log I_0 - \log I = \alpha c$ , então:  $\log I = -\alpha c + \log I_0$ , em que “ $I_0$ ” representa a intensidade da luz incidente; “ $I$ ” a intensidade da luz transmitida e “ $c$ ” a concentração de partículas absorventes. A partir desse princípio, a técnica permite a quantificação do grau de ploidia das células. Os tumores malignos apresentam uma importante variação do grau de ploidia que pode ser avaliada por meio de histogramas (TAURINES, 2002).

A citometria digital tem sido empregada há mais de 30 anos e evoluiu com o avanço tecnológico. Entre suas aplicações, estão a implementação de maior objetividade e reprodutibilidade à análise histopatológica, bem como a quantificação de marcadores imunoistoquímicos e de componentes celulares e teciduais, tais como a quantificação do DNA nuclear. A qualidade do espécime e seu processamento e fatores associados aos equipamentos, como calibração, magnificação, potência e estabilidade da fonte de luz podem interferir nos resultados da citometria digital. A citometria não quantifica diretamente o DNA nuclear, mas, por

comparação cromodensitométrica, estima sua quantidade, tendo por parâmetro os núcleos de células com 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 (WHEELLESS, 1993; BAAK; JANSSEN, 2004).

A reação de Feulgen é um método histoquímico aplicado para identificação dos ácidos nucléicos. O método emprega o reativo de Schiff, à base de fucsina, que possui afinidade à cromatina nuclear e aos cromossomos durante a divisão celular. O DNA reage com uma solução de ácido clorídrico, que retira as bases púricas (A e G) e forma grupamentos aldeído na desoxirribose. Então, é adicionado o reativo de Schiff, fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso, que se combina com os radicais aldeído para formar um composto insolúvel e vermelho. A intensidade da coloração é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA e, a partir dela, este é analisado por citometria digital (HARDIE et al., 2002).

A ploidia é definida como o estado de um núcleo celular em relação ao número de genomas que contém. Os gametas normalmente contêm uma única série de cromossomos ou um genoma e são haplóides, as células autossômicas contêm normalmente dois genomas e são diplóides (STEDMAN, 1996). Por outro lado, a ploidia de DNA é definida pelos citologistas como a quantidade relativa de DNA presente na célula (CORTE-REAL et al., 2002; TAURINES, 2002; HARDIE et al., 2002; BAAK; JANSSEN, 2004).

As células eucarióticas, tanto as normais como as tumorais, executam um ordenado conjunto de fases durante sua vida, denominado ciclo celular, em que cada etapa depende diretamente da que a precede. O resultado final do ciclo é a divisão celular, que preserva com fidelidade a informação genética contida na célula-mãe (SHERR, 1996). O ciclo celular é composto por estágios denominados G1, S, G2 e M. O estado diplóide de repouso é definido como G0. As células com conteúdo de DNA diplóide contêm 7,14 picogramas de DNA até a entrada na fase G1, período de proliferação. Na fase S, o conteúdo de DNA aumenta continuamente até atingir 14,28 picogramas por célula, o que caracteriza uma célula tetraplóide. A fase G2 corresponde a esse momento tetraplóide da célula prestes a se dividir. O grau de ploidia celular nas fases G0 e G1 corresponde a 46 cromossomos, ou grau  $2n$  de ploidia. Na fase S, em células normais, o grau de ploidia varia entre  $2n$  e  $4n$ . Já no momento G2 essas células apresentam grau  $4n$ . Na fase M, a célula divide-se,

gerando células-filhas diplóides, que podem ficar em repouso (G0) ou reiniciar o ciclo de divisão (ROSS, et al., 2003).

A perda ou mutação de genes que integram os pontos de restrição gera uma instabilidade genômica que levará à transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa (STRAUSS, 1999). Os cromossomos podem sofrer alterações numéricas e/ou estruturais. Tais alterações numéricas podem ser estudadas por meio de técnicas citogenéticas e citométricas. Pela análise citogenética podem-se detectar alterações numéricas do cariótipo, com a observação dos cromossomos em seu estado de condensação ou metáfase em que as mudanças numéricas produzidas podem ser de dois tipos: (1) euplóides, o número de cromossomos mantém-se equilibrado; (2) aneuplóides, existe excesso ou falta de cromossomos.

A ploidia do DNA é representada por histogramas que podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com Auer et al. (1980) e Auer et al. (1991). A distribuição do conteúdo de DNA em uma população de células é definida como diplóide quando o pico G0/G1 localiza-se na mesma faixa de conteúdo de DNA de uma população de células diplóides normais utilizadas como referência, e as frações em fase S e G2/M são pequenas. As expressões aneuploidia ou DNA aneuplóide designam quantidades anômalas de DNA detectadas por estudo citométrico. Existem cada vez mais evidências de que há associação entre aneuploidia de DNA e agressividade dos tumores malignos (KIEHL, et al., 2000; MARAKI et al., 2004). A citometria digital fornece o padrão de ploidia e dados sobre a atividade proliferativa celular, que são importantes fatores prognósticos de tumores (TUCKER et al., 1994; KIEHL, et al., 2000). Shirata et al. (2001) compararam a classificação de Papanicolaou com o grau de ploidia celular pela reação de Feulgen em esfregaços cérvico-uterinos. Foi observada associação entre classe III de Papanicolaou e aneuploidia celular na reação de Feulgen. Neher et al. (2004) investigaram a possibilidade de se identificar carcinoma de laringofaringe por meio da ploidia nuclear. Foi realizada citologia esfoliativa de 77 carcinomas de laringofaringe e de mucosa normal de 68 pacientes-controle. As coletas foram feitas com espátula de madeira, e os esfregaços corados pela reação de Feulgen. O grau de ploidia de três mil núcleos foi avaliado. O método teve 72,7% de sensibilidade, 82,4% de especificidade, valor preditivo positivo de 80,5% e valor preditivo negativo de 75,1% no diagnóstico do câncer de laringofaringe.

Kiehl et al. (2000) investigaram a ploidia do DNA em adenocarcinomas de próstata por meio de citometria digital. A ploidia foi analisada em três regiões distintas de cada uma de 15 lesões após prostatectomia radical. Os histogramas-controle foram obtidos a partir de amostras de tecido prostático hiperplásico. Os resultados evidenciaram 11 lesões diplóides (73,3%), três aneuplóides (20%) e um tumor (6,7%) com duas áreas diplóides e uma aneuplóide. Os autores concluíram que a análise da ploidia do DNA exibiu alta especificidade (93,3%) no diagnóstico de adenocarcinoma de próstata.

Balbinotti et al. (2001) desenvolveram um sistema de micromorfometria para estudo da ploidia do DNA. O sistema foi elaborado a partir de programas disponíveis gratuitamente na internet: Image (National Institute of Health, Bethesda, USA) e Taxonomic intra-cellular analytic system - TICAS (Chicago, USA). No estudo, foram investigadas 200 células provenientes de biópsias de 19 neoplasias malignas do estômago e de nove neoplasias malignas de cólon. Os graus de ploidia foram definidos por histogramas, sendo o tipo I aquele que apresentava pico unimodal na região diplóide 2c ou próximo a ela, e o histograma tipo II apresentava pico modal na região tetraplóide ou próximo a esta, ou dois picos próximos a 2c e 4c. Segundo os autores, foi possível elaborar um sistema para avaliação da ploidia celular utilizando os programas de computador disponíveis na internet.

Raimondi et al. (2005), em estudo experimental com hamsters, investigaram a transformação maligna e a expressão da cancerização de campo por meio da ploidia nuclear. Os animais do grupo-teste (n=36) foram submetidos à indução de carcinogênese na bolsa jugal por meio da aplicação de DMBA três vezes por semana durante quatro meses. O grupo-controle foi composto por 16 hamsters. Os animais foram mortos, e as bolsas jugais foram removidas e coradas por HE e Feulgen. Os graus de ploidia em áreas cancerizáveis e neoplásicas foram maiores que os das áreas de epitélio normal. O índice de aneuploidia foi significativamente superior nos espécimes que exibiram cancerização de campo e áreas neoplásicas do que nos controles. Os autores concluíram que a quantificação do DNA por citometria digital pode ser empregada como biomarcador para áreas de cancerização de campo.

### 2.3 CITODIAGNÓSTICO ORAL

Segundo Bevilacqua (1965), citodiagnóstico oral é o reconhecimento de células malignas entre as células descamadas de lesões da mucosa oral. Sua principal aplicação consiste no exame de leucoplasias, eritroplasias, fissurações e ulcerações. A citologia esfoliativa também é indicada na avaliação dos resultados terapêuticos após cirurgia ou radioterapia. O rastreamento de lesões cancerizáveis e do câncer de boca parece ser a principal aplicação da citopatologia oral (NAVONE et al., 2004; KUJAN et al, 2006).

Com base em critérios morfológicos relacionados à cor das células, Montgomery (1951) avaliou a mucosa oral de 75 indivíduos sem alterações clínicas. A amostra foi composta por 25 crianças com idade variando de três a dez anos, 25 adultos com idade entre 20 e 40 anos e 25 indivíduos com idade acima de 63 anos. Os esfregaços foram coletados de seis regiões distintas da cavidade oral: palato mole (porção látero-posterior), mucosa jugal (região de molares), mucosa labial (região de incisivo lateral inferior), superfície dorsal da língua (terços anterior e médio) e gengiva inferior (entre incisivos central e lateral). As coletas foram feitas com espátula Woodson's nº2 e processadas pelo método de Papanicolaou. Palato mole e mucosa jugal exibiram padrão celular idêntico, com predomínio de células azuis, menor número de células vermelhas e poucas células amarelas. A mucosa do lábio manteve padrão semelhante, com exceção de um aumento do número de células amarelas. As duas regiões da língua mostraram predomínio de células vermelhas e, em ambas as regiões, um terço das células eram amarelas. A região posterior da língua exibiu maior proporção de células azuis do que a região anterior. A gengiva diferiu de todos os outros locais estudados em função de elevada quantidade de células amarelas e vermelhas e reduzido número de células azuis. O autor concluiu que o padrão celular difere entre os distintos sítios anatômicos da mucosa oral avaliados.

A mesma técnica de coleta e análise foi empregada por Montgomery e Von Haam (1951a) em estudo de citologia esfoliativa de leucoplasias orais. A amostra foi constituída por dez pacientes, e as coletas foram realizadas na lesão e nas seis regiões descritas no estudo de Montgomery (1951). Os resultados evidenciaram maior grau de ceratinização nas áreas de lesão, mas não foram suficientes para definir o diagnóstico. Não foram observadas características citológicas capazes de

sugerir alterações malignas.

Em outro estudo, com a mesma metodologia, Montgomery e Von Haam (1951b) avaliaram citologias esfoliativas de 15 pacientes com diagnóstico clínico de carcinoma oral (14 homens e uma mulher) cujas idades variavam de 57 a 94 anos, e o tempo de evolução das lesões, de dois meses a seis anos. Foram coletados esfregaços das lesões e de mucosa oral sem lesão. Doze pacientes foram biopsiados, sendo que, em 11 casos, o diagnóstico histopatológico foi de carcinoma espinocelular e, em um caso, de displasia severa. Os resultados desse estudo foram comparados com os resultados do estudo de citologia esfoliativa em pacientes saudáveis realizado por Montgomery (1951). Não foi verificada diferença entre as coletas obtidas das áreas de mucosa livre de lesão dos pacientes portadores de carcinoma e áreas da mucosa oral dos pacientes não portadores de lesão. Treze casos exibiram alterações nucleares sugestivas de neoplasia maligna, como núcleos aumentados e perda da proporção núcleo/citoplasma. Para o autor, esta foi a característica indicativa de alteração maligna mais freqüente na amostra.

Vários estudos empregaram a citologia esfoliativa na detecção de atipias celulares em lesões orais. Johnston (1952) associou-a à planimetria, em que media a área nuclear (AN), a área citoplasmática (AC) e a relação núcleo/citoplasma (N:C) para caracterizar normalidade ou alterações celulares malignas. Em 1963, Goldsby e Staats sugeriram que AN, AC e N:C são importantes fatores a serem considerados para avaliar normalidade celular em citologias esfoliativas da cavidade oral. Ingram et al. (1963) avaliaram 422 lesões em 405 pacientes com diagnóstico clínico de leucoplasia (n=153), inflamação crônica (n=119), ceratose (n=43), úlceras (n=38), ceratose com ulceração (n=8), hiperplasia (n=9), fibroma (n=5), nódulos endurecidos (n=7), papiloma (n=3), suspeita de carcinoma (n=12), outras lesões (n=8) e carcinoma (n=17). Foram coletados dois esfregaços de cada lesão para exame citopatológico e realizadas 71 biópsias para exame histopatológico. Entre os 71 espécimes, 27 tiveram diagnóstico histopatológico de carcinoma. Dos 23 exames citopatológicos classificados como classe IV e V de Papanicolaou, 14 tiveram laudo histopatológico de carcinoma. Os autores afirmam que a citologia está indicada para controle clínico e acompanhamento das lesões orais, bem como na detecção precoce do câncer de boca.

Wrubel e Scopp (1961) avaliaram, por meio de citologia esfoliativa (Papanicolaou), os efeitos da cessação do tabagismo sobre o grau de ceratinização

do palato duro e da mucosa jugal. Foram selecionados 11 indivíduos tabagistas, entre 21 e 35 anos de idade, que fumavam de 20 a 30 cigarros por dia. Os participantes do estudo deixaram de fumar por quatro semanas, e as coletas foram realizadas em dias alternados, até completar-se o período de quatro semanas. Não foram verificadas alterações do padrão citológico das amostras após a cessação do tabagismo. Ramaesh et al. (1999) investigaram o efeito do tabaco, fumado e mascado (betel), sobre a mucosa oral. Foram obtidos esfregaços de mucosa oral de indivíduos fumantes, mascadores, fumantes/mascadores e não usuários, e as amostras foram submetidas à análise citomorfométrica. Os esfregaços de pacientes não usuários apresentaram o maior diâmetro celular, enquanto o maior diâmetro nuclear foi observado nos esfregaços de indivíduos que fumavam tabaco. Cançado et al. (2001) avaliaram o efeito do fumo nas regiões organizadoras nucleolares (AgNors) por meio de exame citopatológico da mucosa oral. A amostra foi constituída por 120 indivíduos, 60 fumantes e 60 não-fumantes, submetidos à citologia esfoliativa em borda de língua e assoalho de boca. Os resultados obtidos para borda de língua em não-fumantes foram 32 (53,33%) citopatológicos classe I de Papanicolaou e 28 (46,67%) classe II. O mesmo resultado foi constatado para assoalho de boca. Os fumantes exibiram 38 (63,33%) citopatológicos classe I e 22 (36,37%) classe II nas amostras coletadas da borda da língua. As amostras de assoalho de boca exibiram 31 (51,67%) resultados classe I e 29 (48,33%) classe II. Os autores concluíram que existe associação entre o hábito de fumar e alterações da atividade proliferativa celular em indivíduos entre 50 e 70 anos de idade.

Sandler (1962) analisou os resultados de um estudo de rastreamento por citologia esfoliativa para detecção precoce do câncer oral em serviços odontológicos e hospitais dos Estados Unidos. Nos primeiros dois anos do estudo, 58.497 pacientes foram examinados em nove hospitais e três clínicas odontológicas. Destes, 1.621 (2,77%) apresentaram algum tipo de lesão oral que foi, então, submetida à coleta de material para exame citopatológico. Em 1.162 (1,99%) lesões, os exames clínico e citopatológico descartaram a necessidade de biópsia e, em 84 casos, não foi possível a realização da mesma. Entre 375 (0,64%) lesões biopsiadas, foram diagnosticados 208 carcinomas (0,35%) ao exame histopatológico. Destes, 184 tiveram diagnóstico de carcinoma ao exame citopatológico; 17 casos tiveram resultado duvidoso; seis foram considerados positivos para displasia e um, normal. Nos demais 167 casos que não apresentaram

diagnóstico histopatológico de carcinoma, os resultados citopatológicos foram: 26 sugestivos de carcinoma, 16 duvidosos, 59 positivos para displasia e 66 normais. Em 19 casos com resultado citopatológico sugestivo de carcinoma, mas com laudo histopatológico inicial negativo para neoplasia maligna, foram realizadas novas biópsias, e o carcinoma foi confirmado em todas. O autor concluiu que o rastreamento de lesões orais assintomáticas ou imperceptíveis ao exame físico, por meio de citologia esfoliativa, constitui método simples e auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de boca.

Shapiro e Gorlin (1964) coletaram material para exame citopatológico de 404 lesões orais, sendo que, em 312 (77,2%) delas, não foi necessária a biópsia. Foram diagnosticadas 66 lesões benignas, 20 carcinomas espinocelulares, quatro leucoplasias, um rabdossarcoma e um linfoma. Os quatro casos de leucoplasia foram excluídos da pesquisa por inadequação da amostra. Foram identificadas 374 citologias negativas e 26 citologias positivas para carcinoma. Destas 26, 17 (65,38%) eram carcinomas espinocelulares, seis (23,07%) eram lesões benignas e três (11,54%) não foram biopsiadas, porque houve um óbito antes da realização da biópsia e dois pacientes não permitiram o procedimento cirúrgico. A taxa de falso-positivo foi de 26%. Das 374 lesões cujas citologias foram consideradas normais, 65 foram biopsiadas. Destas, 60 (92%) resultaram em diagnóstico histopatológico compatível com lesão benigna e, em cinco casos (8%), os resultados foram de três carcinomas espinocelulares, um rabdossarcoma e um linfoma. Segundo os autores, o papel do citodiagnóstico na detecção do câncer de boca é limitado, e a citologia deve ser empregada sempre em associação à biópsia ou em casos de lesões de aspecto clínico inocente em que esta esteja contra-indicada.

Folsom et al. (1972) pesquisaram alterações da mucosa oral por meio de citologia esfoliativa, em 15 serviços de saúde pública dos Estados Unidos, durante três anos. Foram examinados 158.996 pacientes, sendo 92% deles homens com idade média de 37 anos. Dos pacientes avaliados, 6.879 (4,33%) eram portadores de lesões orais, alguns deles com mais de uma, o que totalizou 9.055 lesões. A biópsia foi indicada em 1.192 (13,16%) lesões em 926 indivíduos. Foram diagnosticadas, por meio de exame histopatológico, 148 neoplasias, o que representou 0,58% dos pacientes examinados. No exame citopatológico, houve seis resultados falso-positivos, enquanto três casos de carcinoma, em estágio inicial e sem suspeita clínica de neoplasia, foram detectados. Das 148 neoplasias malignas

biopsiadas, 64 (43%) foram diagnosticadas como classe zero, I ou II de Papanicolaou, entre as quais 18 (12,16%) eram classe zero. Com isso, o índice de falso-positivos ficou em 31% (n=46). Segundo os autores, a citologia esfoliativa não substitui o exame histopatológico, já que não fornece um diagnóstico definitivo, mas pode ser empregada como método auxiliar na detecção de lesões sem suspeita clínica de neoplasia maligna.

Abdel-Salam et al. (1988) investigaram o valor preditivo da citometria digital associada à reação de Feulgen na transformação maligna de lesões da mucosa oral. Os autores compararam 16 casos de pacientes portadores de lesões orais, sendo 13 leucoplasias com atipia, uma ceratose focal, uma ceratose focal associada a líquen plano e um líquen plano. Os casos foram acompanhados por um período de dez a 15 anos. Oito casos exibiram transformação maligna, cinco deles eram leucoplasias com atipia; um era ceratose focal; um, ceratose focal associada a líquen plano e um, líquen plano. Segundo os autores, apesar do tamanho reduzido da amostra, a citometria digital mostrou-se capaz de prever o comportamento biológico das lesões orais.

Ogden et al. (1990) investigaram alterações citomorfométricas em esfregaços de Papanicolaou coletados de sítios periféricos a lesões de carcinoma oral. Foram coletados 40 esfregaços de mucosa oral normal de pacientes portadores de carcinoma espinocelular e 76 esfregaços da mucosa oral de pacientes saudáveis. Não houve diferença significativa da área nuclear entre os grupos ( $p=0,38$ ), embora houvesse redução significativa da área citoplasmática ( $p=0,002$ ) nas amostras obtidas de pacientes com carcinoma. Segundo os autores, a mucosa oral livre de lesão em pacientes com carcinoma é diferente da mucosa de pacientes não portadores da neoplasia.

Migliorati et al. (1993) investigaram a viabilidade da citologia esfoliativa como recurso diagnóstico da leucoplasia pilosa oral. Esfregaços de citologia esfoliativa corados por Papanicolaou e espécimes de biópsia foram obtidos de dez lesões com características clínicas de leucoplasia pilosa. Todos os espécimes exibiram características histopatológicas compatíveis com o diagnóstico clínico e, em todos os esfregaços, foram observadas condensação e marginação da cromatina nuclear.

Komitowski et al. (1993) avaliaram três grupos de pacientes, sendo o grupo 1 constituído por indivíduos saudáveis sem sinais de imunodepressão; o grupo 2, pacientes oncológicos em terapia imunodepressora e o grupo 3, composto de

pacientes HIV-positivos com evidência clínica de imunodepressão. Amostras de citologia esfoliativa da mucosa oral desses indivíduos foram submetidas às colorações de Papanicolaou e Feulgen para análise citomorfométrica. Os resultados demonstraram que os núcleos celulares dos pacientes imunodeprimidos apresentaram-se maiores do que os dos pacientes imunocompetentes.

Tucker et al. (1994) compararam a quantificação do DNA pela reação de Feulgen empregando microdensitometria, *linear diode array area scans* e *linear diode array field scans* com o método de Papanicolaou. Foram coradas 48 amostras para cada método, obtidas de 20 pacientes portadores de lesões orais que foram também submetidas à biópsia. As características morfológicas das células foram avaliadas nas amostras coradas por Papanicolaou. A coleta foi realizada em três locais, e os exames histopatológicos foram classificados como: (1) normal, (2) pré-maligno e (3) maligno. Os três métodos de quantificação do DNA (microdensitometria, *linear diode array area scans* e *linear diode array field scans*) foram capazes de distinguir as amostras obtidas de lesões malignas das normais, mas não distinguiram as lesões cancerizáveis das malignas. Contudo, esta discriminação pôde ser realizada a partir da análise das áreas citoplasmáticas mensuradas nas amostras coradas por Papanicolaou. Os resultados sugerem que a combinação dos métodos de quantificação do DNA e citomorfológicos pode ser útil na detecção de lesões cancerizáveis e condições malignas da mucosa oral.

Giardina et al. (1996) investigaram a relação entre morfologia nuclear e sobrevida de pacientes portadores de carcinoma espinocelular de língua. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: grupo 1, cuja sobrevida foi inferior a 14 meses, e grupo 2, cuja sobrevida foi superior a 36 meses. Cortes histológicos de 30 espécimes da neoplasia foram obtidos, processados pela técnica de rotina (HE) e submetidos à análise morfométrica por meio do software *shape analytical morphology* (SAM). A média de mitoses foi de 32 ( $\pm 15,5$ ) no grupo de menor sobrevida, enquanto no grupo de maior sobrevida a média foi de 18,4 ( $\pm 16,6$ ), sendo a diferença entre ambas estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Os dados obtidos por morfometria nuclear permitiram distinguir, com margem de erro de 10%, a qual grupo os pacientes pertenciam. Os autores encorajam o emprego de estudos morfométricos a fim de identificarem-se, entre os carcinomas, os que podem apresentar bom ou mau prognóstico.

Ramaesh et al. (1998) avaliaram alterações morfométricas celulares e nucleares em esfregaços da mucosa oral. A amostra foi constituída por 176 pacientes que foram submetidos à coleta com espátula de madeira, sendo 40 esfregaços colhidos de mucosa normal, 58 de lesões sem displasia, 27 com displasia (17 leves, sete moderadas e três severas) e 51 de carcinomas espinocelulares. Os resultados exibiram redução do diâmetro celular e aumento do diâmetro nuclear nos esfregaços de carcinomas. Os autores concluíram que a redução do diâmetro celular e o aumento do diâmetro nuclear podem ser indicadores de alterações neoplásicas e que a aplicação de técnicas quantitativas em esfregaços de lesões cancerizáveis ou de carcinomas pode aumentar o valor diagnóstico da citologia esfoliativa oral.

Navone et al. (2004) compararam os exames citopatológico (Papanicolaou) e histopatológico (HE) de 89 lesões cancerizáveis da mucosa oral (eritroplasias, leucoplasias e líquen plano). Das 89 lesões, 32 foram diagnosticadas, ao exame histopatológico, como carcinomas; 17 como displasias; 15 como processos inflamatórios e 25 como enfermidades de outro tipo. Em 11 (12,4%) dos 89 casos, as amostras citológicas foram consideradas inadequadas. Em 38 de 45 casos cujo preparo citológico era adequado, e o exame histopatológico positivo para carcinoma ou displasia, a citologia concordou com o diagnóstico histopatológico, o que resultou em índices de sensibilidade de 86,5% e acurácia de 89,6%. Segundo os autores, a citologia esfoliativa pode ser empregada em lesões da mucosa oral.

Mollaoglu et al. (2001) relatam o caso de uma paciente de 45 anos, fumante (20 cigarros por dia) e etilista, que apresentava lesões brancas na mucosa oral. Ao exame físico, foram observadas lesões brancas, difusas, com áreas erosivas em mucosa jugal direita e esquerda, bem como mancha branca em borda lateral direita da língua. Foram coletadas amostras citológicas para citometria digital com o método de Feulgen. O índice de densidade ótica integrada (DOI) e a área nuclear (AN) foram mensurados, tendo, como células-controle, eritrócitos de galinha. A análise citopatológica exibiu aumento significativo dos valores de DOI e AN nas amostras coletadas da lesão. Não havendo remissão da lesão decorridas quatro semanas do exame, foi realizada biópsia na região de mucosa jugal esquerda, cujo diagnóstico histopatológico foi candidíase crônica hiperplásica com displasia epitelial leve. Oito semanas após, novas coletas citopatológicas foram realizadas, bem como outra biópsia. A análise citopatológica exibiu novamente alterações nucleares

e a biópsia excisional da lesão teve como diagnóstico carcinoma espinocelular multifocal. De acordo com os autores, a citopatologia pode ser empregada como auxiliar no controle clínico e monitoramento de lesões como leucoplasia e líquen plano, e as alterações nucleares observadas podem indicar o momento correto de realização da biópsia.

Potter et al. (2003) investigaram a frequência de citopatologias falso-negativas em 115 casos de carcinomas da mucosa oral diagnosticados por exame histopatológico. Houve quatro diagnósticos citopatológicos negativos, o que equivaleu a um índice de 3,5% de falso-negativos. Uma vez que nem todos os carcinomas da série foram submetidos à citopatologia, é possível que este índice seja ainda maior.

Remmerbach et al. (2004) compararam o resultado de 1328 citologias esfoliativas orais coradas com Papanicolaou e Feulgen com os resultados do exame histopatológico. No estudo, o grau de ploidia foi determinado por citometria digital. Foram observados índices de 91,3% de sensibilidade com o método de Papanicolaou e 95,5% com Feulgen, enquanto a especificidade foi 95,1% com Papanicolaou e 100% com Feulgen. A combinação dos dois métodos exibiu sensibilidade de 97,8% e especificidade de 100%. Segundo os autores, a avaliação do conteúdo de DNA por meio da citometria digital constitui método muito sensível, altamente específico, objetivo e auxiliar na identificação de células neoplásicas em citologias esfoliativas orais.

Maraki et al. (2004) investigaram a acurácia da citologia esfoliativa corada por Feulgen, combinada à citometria digital, no diagnóstico de lesões cancerizáveis. Os autores realizaram esfregaços e biópsias de lesões cancerizáveis em 98 pacientes. A citologia esfoliativa e a citometria digital combinadas constituíram método sensível e específico, pois a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 97,4%.

Scheifele et al. (2004) compararam 103 citologias esfoliativas obtidas pelo método *OralCDx*<sup>®</sup> com 96 biópsias realizadas em 80 pacientes, dos quais 49 apresentavam leucoplasia; 18, líquen plano e 13, carcinoma espinocelular. Alguns pacientes apresentavam mais de uma lesão. Os esfregaços evidenciaram dois resultados falso-negativos e quatro resultados falso-positivos. O exame citopatológico teve sensibilidade de 92,3% e especificidade de 94,3% nos casos de displasia epitelial e carcinoma espinocelular. Os autores afirmam que o método

*OralCDx*<sup>®</sup> é uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico de lesões orais, principalmente do carcinoma espinocelular. No entanto, lembram que o sucesso do método diagnóstico depende de outros fatores como a garantia de que os pacientes em risco tenham acesso ao profissional da saúde e que este identifique as lesões com necessidade de biópsia.

O desenvolvimento de novos métodos de análise como a citometria digital e o aperfeiçoamento da técnica de coleta com emprego de escova citológica, permitiram melhores resultados de sensibilidade e especificidade da citologia oral (OGDEN et al., 1997; SCULLY et al., 2003). Sciubba (1999) realizou estudo duplo-cego, em 35 centros odontológicos dos Estados Unidos, para avaliar sensibilidade e especificidade do método *OralCDx*<sup>®</sup> na análise de citologias orais por escova (*brush biopsy*). No estudo, foram coletadas amostras citológicas de 945 pacientes que apresentavam algum tipo de lesão oral. Destes, 298 apresentaram, ao exame clínico, lesões suspeitas de malignidade que foram biopsiadas. Os demais 647 pacientes, segundo os examinadores, não apresentavam condição clínica passível de biópsia. Os resultados citopatológicos evidenciaram alterações em 29 pacientes que não haviam sido biopsiados. Realizadas as biópsias, em 131 delas, houve resultado histopatológico de carcinoma ou displasia. O método *OralCDx*<sup>®</sup> detectou todos os casos, sendo 78 deles positivos para displasia ou carcinoma e 53 positivos para atipia celular. Nesses 131 casos, estão incluídos os 29 biopsiados posteriormente. Os resultados demonstram o potencial do *OralCDx*<sup>®</sup> como método auxiliar na detecção de lesões precursoras e no diagnóstico precoce do câncer de boca.

Poate et al. (2004) investigaram a eficácia diagnóstica da técnica de biópsia oral por escova (*oral brush biopsy*). Foram coletados 112 esfregaços de pacientes com sinais clínicos de lesões potencialmente malignas, sendo excluídos os indivíduos com sinais óbvios de carcinoma. Dos 36 casos cujo resultado citopatológico exibiu atipia celular, 33 foram submetidos à biópsia. O exame histopatológico revelou cinco carcinomas, nove displasias e 19 espécimes normais. Dos 75 casos com exame citopatológico negativo para atipia celular, um teve diagnóstico histopatológico de carcinoma, cinco de displasia e nove exibiram aspecto normal. A técnica teve sensibilidade de 71,4%, especificidade de 32%, valor preditivo positivo de 44,1% e valor preditivo negativo de 60%. Os resultados indicam que há risco de resultado falso-negativo, uma vez que, entre os 75 casos de exame

citopatológico com resultado negativo para atipia, cinco eram displasias epiteliais. Segundo os autores, a citologia por escova pode detectar algumas lesões de displasia, mas falhar na detecção de outras, devendo, portanto, ser associada a outros marcadores dos distúrbios de proliferação e maturação celular como o grau de ploidia do DNA.

Eisen e Frist (2005) revisaram os trabalhos de Sciubba (1999), Scheifele et al. (2004) e Poate et al. (2004). A análise demonstra que, no estudo de Scheifele et al. (2004), a sensibilidade e a especificidade do método *OralCDx*<sup>®</sup> foram quase idênticas às observadas no estudo de Sciubba (1999). Entretanto, Poate et al. (2004) obtiveram valores inferiores de sensibilidade e especificidade. Segundo Eisen e Frist (2005), a discrepância dos resultados deve-se aos métodos distintos de coleta das amostras. Nos estudos de Scheifele et al. (2004) e Sciubba (1999), as coletas citopatológica e histopatológica foram realizadas no mesmo momento, enquanto no estudo de Poate et al. (2004), em um primeiro momento, foram realizadas coletas citológicas e, após o resultado dessas, foi coletado material por biópsia com um intervalo de até 233 dias. Segundo os autores, pesquisas com sistemas de coleta por escova e com novos marcadores para identificação de atipias celulares devem ser desenvolvidas.

Femiano e Scully (2005) avaliaram a ploidia nuclear em espécimes de biópsias incisoriais de 40 leucoplasias orais e de 45 casos de líquen plano. Vinte lesões leucoplásicas eram homogêneas e 20 eram não-homogêneas, os 45 casos de líquen plano foram classificados em 25 erosivos e 20 reticulares. Três dos 20 casos de leucoplasia homogênea foram considerados aneuplóides, bem como oito dos 20 casos de leucoplasia não-homogênea. Quanto aos casos de líquen plano, dois dos 25 classificados como erosivos expressaram grau aneuplóide e nenhum dos 20 classificados como reticulares exibiu esse padrão.

Pektas et al. (2006) investigaram a aplicação da morfometria nuclear e do grau de ploidia do DNA na detecção de neoplasia maligna oral. Foram selecionados 22 pacientes, 11 homens e 11 mulheres, e coletadas duas amostras, de cada um deles, com escova citológica. Uma coleta foi feita em região de mucosa saudável e outra, em área de lesão, no mesmo paciente, e, após, foi realizada biópsia. As lâminas foram coradas pela reação de Feulgen. Entre as 22 lesões, 12 (54,5%) foram diagnosticadas como carcinoma espinocelular, quatro (18,2%) como líquen plano, três (13,6%) como leucoplasia, uma (4,5%) como eritroplasia, uma (4,5%)

como eritroleucoplasia e uma (4,5%) como hiperkeratose. Os resultados exibiram 20 (90,9%) casos com DNA diplóide e, em dois casos com diagnóstico de carcinoma espinocelular, o DNA foi aneuplóide. Quando a análise foi realizada somente nos casos de carcinoma, o índice de aneuploidia ficou em 16,7%, enquanto os casos diplóides corresponderam a 83,3%. A biópsia por escova (*brush biopsy*) mostrou-se um método rápido e minimamente invasivo, com altas sensibilidade e especificidade e que não requer anestesia, embora não substitua a biópsia tradicional. Os resultados do estudo sugerem que a análise citomorfométrica é um método auxiliar na detecção de lesões cancerizáveis e do carcinoma em estágio inicial.

Maraki et al. (2006) investigaram o valor diagnóstico da citologia esfoliativa e da citometria digital em lesões de líquen plano oral. Foram realizadas citologias esfoliativas e biópsias incisionais em 56 pacientes com suspeita clínica de líquen plano. Os esfregaços foram corados com Papanicolaou e Feulgen, e as análises basearam-se em critérios estabelecidos conforme os métodos de coloração. Entre os 56 esfregaços, 50 não revelaram sinais de displasia ou células malignas. Entretanto, em quatro esfregaços que revelaram células epiteliais regeneradoras, houve dúvida quanto à presença de células neoplásicas, e dois casos com suspeita clínica de carcinoma mostraram displasia epitelial severa. A citometria digital exibiu aneuploidia de DNA nos quatro casos em que houve dúvida sobre a presença de células malignas e, nas lesões com suspeita de neoplasia maligna, a análise por citometria digital exibiu o mesmo resultado. Houve total concordância entre os achados citológicos corados por Papanicolaou e Feulgen e os resultados do exame histopatológico, com a confirmação do diagnóstico de carcinoma nos dois casos com suspeita clínica de neoplasia maligna. O estudo, além de demonstrar transformação maligna em 3% dos casos de líquen plano, evidencia a importância da aplicação de novos métodos auxiliares no diagnóstico e no monitoramento de pacientes com líquen plano erosivo, especialmente quando fatores de risco como álcool e tabaco estão envolvidos.

*PROPOSIÇÃO*

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 HIPÓTESE

A reação de Feulgen associada à citometria digital tem maior acurácia do que a análise citomorfológica pela coloração de Papanicolaou para identificar atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral.

#### 3.2 OBJETIVO GERAL

Comparar a acurácia dos métodos de análise citomorfológica na coloração de Papanicolaou e de citometria digital associada à coloração de Feulgen na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral.

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os índices de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos métodos de análise citomorfológica por Papanicolaou e de citometria digital por Feulgen na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral.

- Verificar a capacidade das variáveis citométricas nucleares área, diâmetro e densidade ótica integrada, aplicadas a exames citopatológicos corados por Feulgen, em diferenciar lesões positivas e negativas para atipia celular.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Pesquisa clínica primária de diagnóstico descritivo-quantitativo para avaliar acurácia de teste complementar (CASTRO, 2001).

### 4.2 APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

O projeto do presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Anexos A e B).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra do presente estudo foi proveniente de 68 pacientes adultos, de ambos os sexos, atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, que apresentavam lesões com indicação de biópsia cujos diagnósticos clínicos eram: 25 carcinomas espinocelulares, uma eritroplasia, três fibromas, 23 hiperplasias fibroepiteliais, 14 leucoplasias e nove casos de líquen plano.

Os pacientes foram esclarecidos a respeito dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa e só foram incluídos na amostra os indivíduos que concordaram em participar do estudo (Apêndice A).

## 4.4 PROCEDIMENTOS

### 4.4.1 Coleta de Material da Cavidade Oral

As amostras citológicas foram coletadas empregando-se o sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup> (Digene, São Paulo, Brasil, Figura 1). Previamente à coleta, os indivíduos foram instruídos a retirar as próteses dentárias removíveis. O material foi coletado com a escova pressionada contra a lesão (carcinoma espinocelular, hiperplasia fibroepitelial, leucoplasia, líquen plano, fibroma e eritroplasia) e rotada cinco vezes no sentido horário, conforme instrução do fabricante (Figura 2). Após a coleta, a escova foi imersa na solução conservante – *Universal Collection Medium*<sup>®</sup> (UCM<sup>®</sup>) e ambas foram agitadas, manualmente, durante 30 segundos para homogeneizar a amostra. Em todos os casos, imediatamente após o procedimento de citologia esfoliativa, foi realizada biópsia da lesão (Figura 3).



Figura 1 – Kit para citologia em meio líquido: escova citológica e frasco contendo a solução conservante



Figura 2 - Citologia esfoliativa de carcinoma espinocelular.  
A escova citológica era rotada cinco vezes em sentido horário



Figura 3 - Biópsia incisional de carcinoma espinocelular: (A) anestesia; (B) remoção do fragmento;  
(C) espécime biopsiado

#### 4.4.2 Preparo das Lâminas

A partir das coletas, foram confeccionadas 225 lâminas para exame em microscopia ótica, assim distribuídas: 75 amostras de citologia esfoliativa coradas pelo método de Papanicolaou (Apêndice B), 75 amostras de citologia esfoliativa coradas pela reação de Feulgen (Apêndice C) e 75 lâminas histológicas de espécimes obtidos por biópsia incisional, que foram processados pela técnica da parafina e submetidos à coloração por hematoxilina e eosina para exame histopatológico (Quadro 1).

Diagnóstico Clínico	Processamento			Total
	Citopatologia Papanicolaou	Citopatologia Feulgen	Histopatologia HE	
Carcinoma espinocelular	25	25	25	75
Eritroplasia	1	1	1	3
Fibroma	3	3	3	9
Hiperplasia fibroepitelial	23	23	23	69
Leucoplasia	14	14	14	42
Líquen plano	9	9	9	27
Total	75	75	75	225

Quadro 1 - Distribuição da amostra de acordo com o diagnóstico clínico e o processamento empregado

#### 4.4.3 Análise das Lâminas

As lâminas de citologia esfoliativa foram examinadas por dois observadores calibrados e cegados como descrito a seguir. Tanto no método de Papanicolaou quanto na reação de Feulgen foram excluídas as lâminas que (1) apresentavam contagem de células inferior a 100; (2) eram compostas por menos de 10% de células epiteliais; (3) exibiam células epiteliais obscurecidas em 75% ou mais da superfície da amostra por material hemorrágico, purulento ou dessecado.

O processo de calibração consistiu na avaliação de 15 lâminas coradas pelo

método de Papanicolaou selecionadas aleatoriamente, e o resultado foi comparado ao resultado obtido por observador padrão-ouro. O processo foi repetido até obter-se um valor Kappa superior a 80%. Após a calibração interexaminador, foram feitas duas avaliações, em momentos diferentes, de uma nova série de lâminas, para verificar-se a calibração intra-examinador, também considerando-se o índice Kappa mínimo de 80%. O diagnóstico histopatológico foi definido por dois examinadores padrão-ouro.

#### 4.4.3.1 Análise das Lâminas de Papanicolaou

As lâminas coradas pelo método de Papanicolaou foram divididas em quadrantes, a análise respeitou o sentido horário e foi feita em microscópio ótico (CARL ZEISS KF2, Jena, Turíngia, Alemanha) com a objetiva de 40X. Em cada lâmina, foram selecionados dez campos que, somados, continham 100 células bem distendidas e não sobrepostas, sendo classificadas e quantificadas quanto à presença ou ausência de atipia (Figura 4).

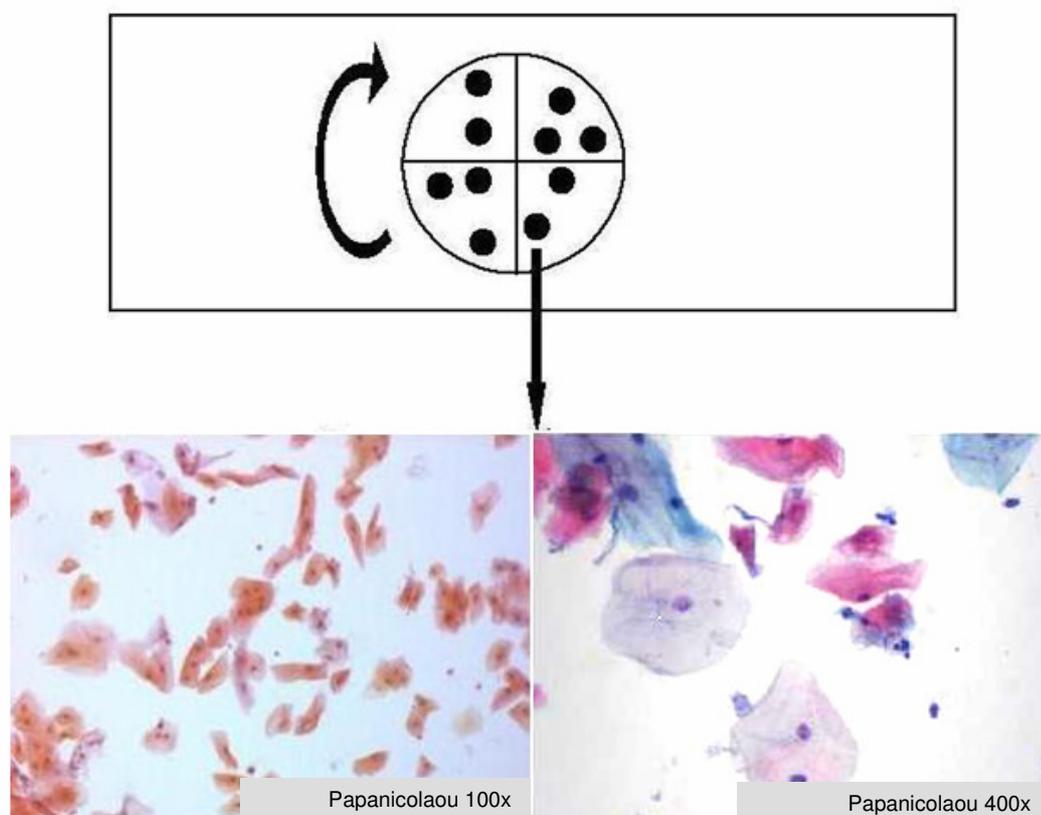


Figura 4 - Desenho esquemático que ilustra o mecanismo de análise das lâminas. Observar a divisão em quadrantes e sentido horário de análise

As lâminas coradas pelo método de Papanicolaou foram classificadas em: (1) amostra insatisfatória (composta por menos de 10% de células epiteliais ou amostra com células epiteliais obscurecidas em 75% ou mais da superfície da lâmina por material hemorrágico, purulento ou dessecado); (2) citologia normal (ausência de células anormais, com predomínio de células epiteliais escamosas, leucócitos e hemácias em pequena quantidade (Figura 5); (3) atipia celular, amostra com (a) núcleos aumentados; (b) aumento da relação núcleo/citoplasma; (c) hiperchromatismo nuclear; (d) alteração do padrão de distribuição da cromatina nuclear; (e) espessamento acentuado e irregular da membrana nuclear íntegra; (f) nucléolos múltiplos e proeminentes; (g) pleomorfismo nuclear; (h) mitoses atípicas; (i) presença de células isoladas ou agrupadas, com distribuição irregular da cromatina, variação acentuada no tamanho e nos tipos celulares (Figura 6) (CARVALHO, 2002). Os dados foram registrados em uma ficha de avaliação citopatológica (Apêndice D).

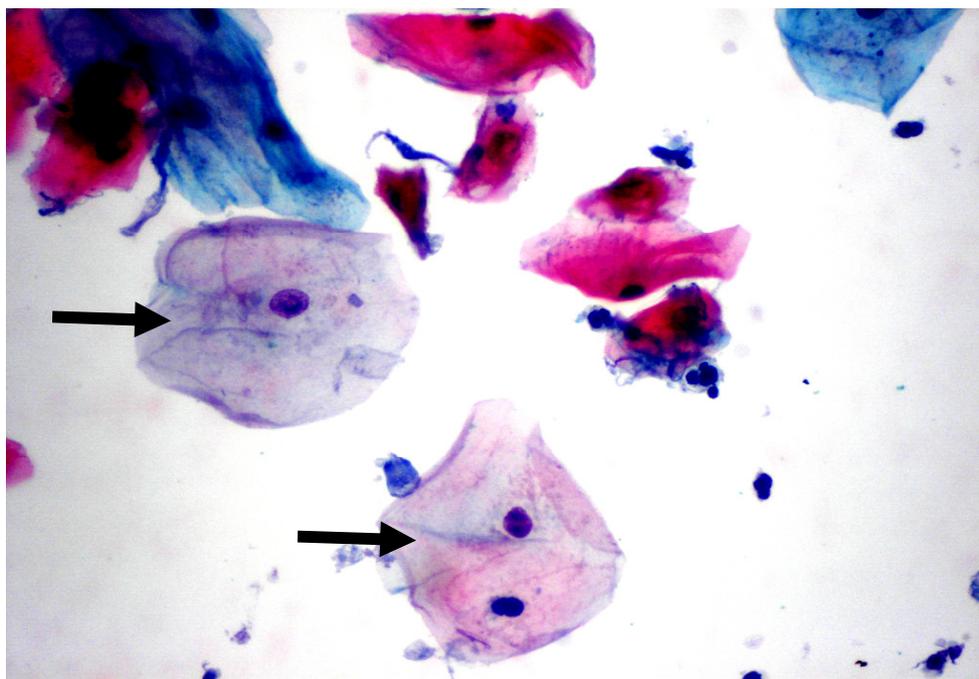


Figura 5 - Células epiteliais normais coradas pelo método de Papanicolaou (aumento aproximado de 400X)

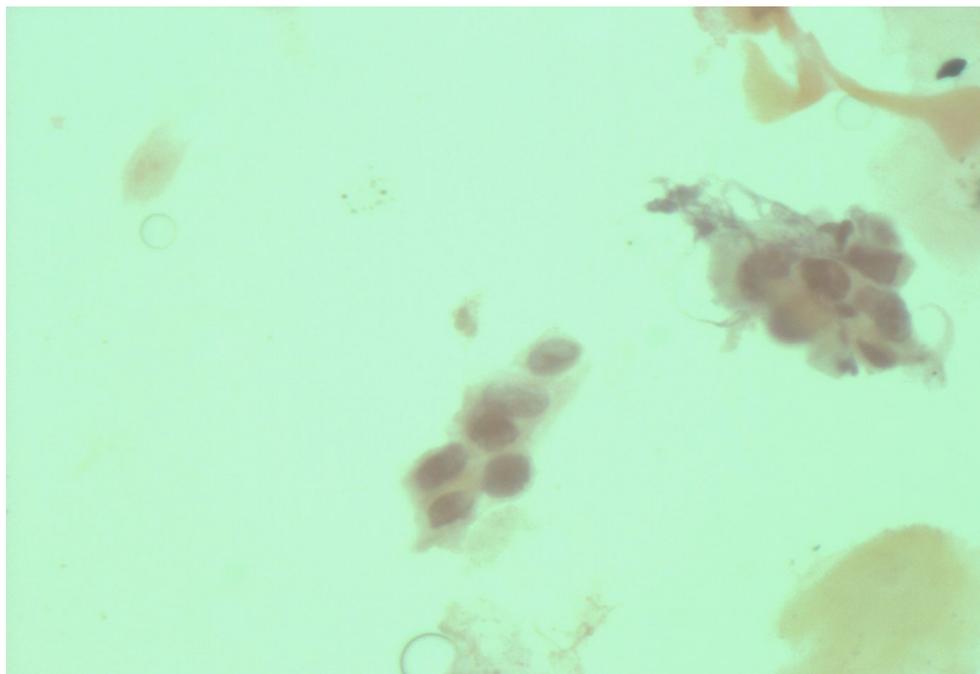


Figura 6 - Células epiteliais atípicas coradas pelo método de Papanicolaou (aumento aproximado de 400X)

#### 4.4.3.2 Análise das Lâminas de Feulgen

Nas lâminas coradas por Feulgen, os campos foram selecionados respeitando-se os mesmos critérios aplicados às amostras de Papanicolaou, e as imagens dos núcleos foram capturadas para citometria digital. A captura foi feita com uma videocâmera Sony 3 CCD DXC 970MD (Sony, Park Ridge, NJ, EUA), conectada ao fototubo do microscópio. As imagens (Figura 7) foram monitoradas durante as sessões de captura em monitor de vídeo Trinitron PVM 1954Q com tela de 14 polegadas (Sony, Park Ridge, NJ, EUA), adaptado ao microscópio ótico (Olympus BX 60, Tóquio, Japão), dotado de sistema de iluminação Koehler, com fonte estabilizada e regulável de luz incandescente e condensador Abbe. As imagens foram convertidas em tons de cinza (Figuras 8 e 9) e submetidas à análise das seguintes características nucleares: área, diâmetro e densidade ótica integrada (DOI) (Image-ProPlus 4.0, National Institute of Health, Bethesda, EUA). Após a definição das variáveis, os núcleos foram demarcados (Figura 10) pelo seu limite periférico e os valores, calculados. Os dados obtidos foram armazenados no programa Excel (Microsoft® Excel 2000 9.0.3821 SR-1).

A variável densidade ótica integrada foi utilizada para calcular a ploidia celular, sendo o padrão diplóide definido a partir de 53 linfócitos que foram selecionados em dez lâminas. A partir da montagem das planilhas no programa Excel, foram calculadas as médias e os desvios-padrão de cada uma das variáveis. Com o objetivo de uniformizarem-se os valores de densidade ótica integrada de cada amostra, foi obtida uma distribuição Z desta variável, a partir da multiplicação do desvio-padrão da DOI dos linfócitos pelos valores de DOI de cada uma das amostras coradas pela reação de Feulgen.

Para análise da ploidia, foi empregada a classificação proposta por Auer et al. (1991), que considera os histogramas dos tipos I, II, III e IV. De acordo com essa classificação, a amostra foi considerada negativa para atipia celular na presença de histograma de DNA diplóide (tipo I), e positiva na presença de histograma de DNA aneuplóide (tipos II, III e IV).

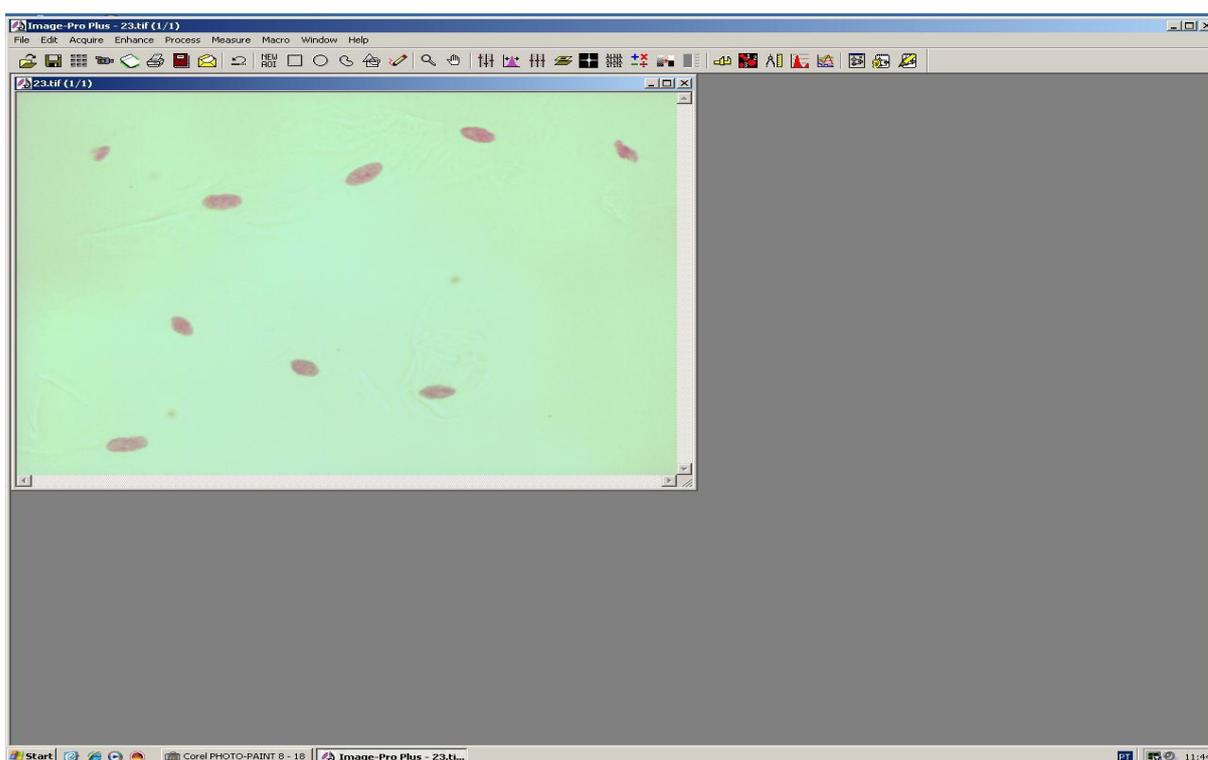


Figura 7 - Captura das imagens dos núcleos no programa Image-Pro-Plus 4.0

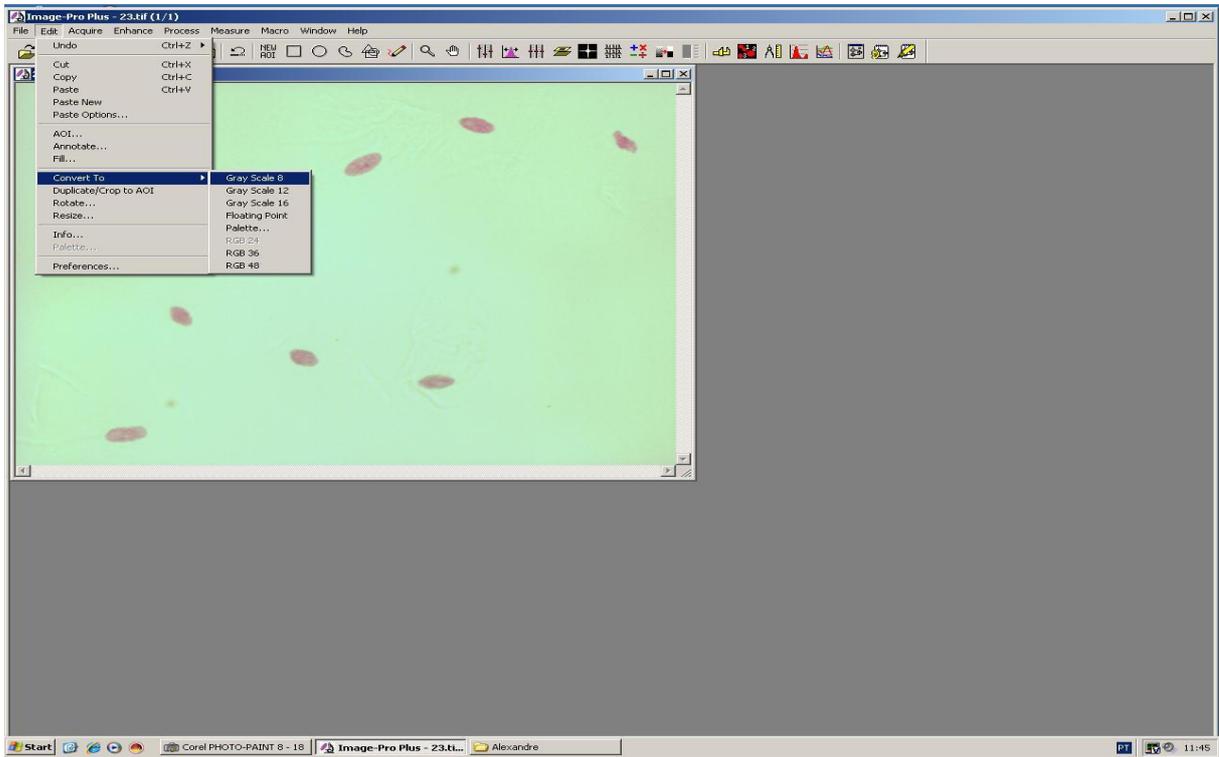


Figura 8 - Comando para conversão em tons de cinza

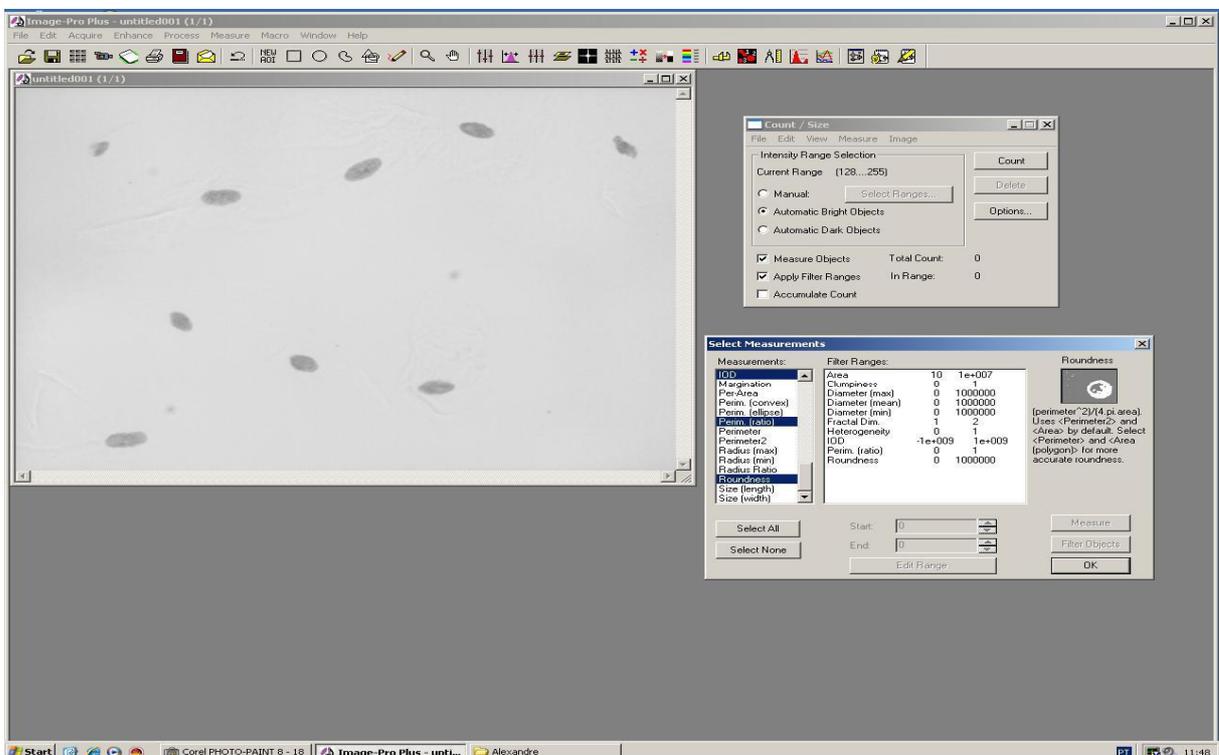


Figura 9 - Imagem convertida em tons de cinza e seleção das variáveis

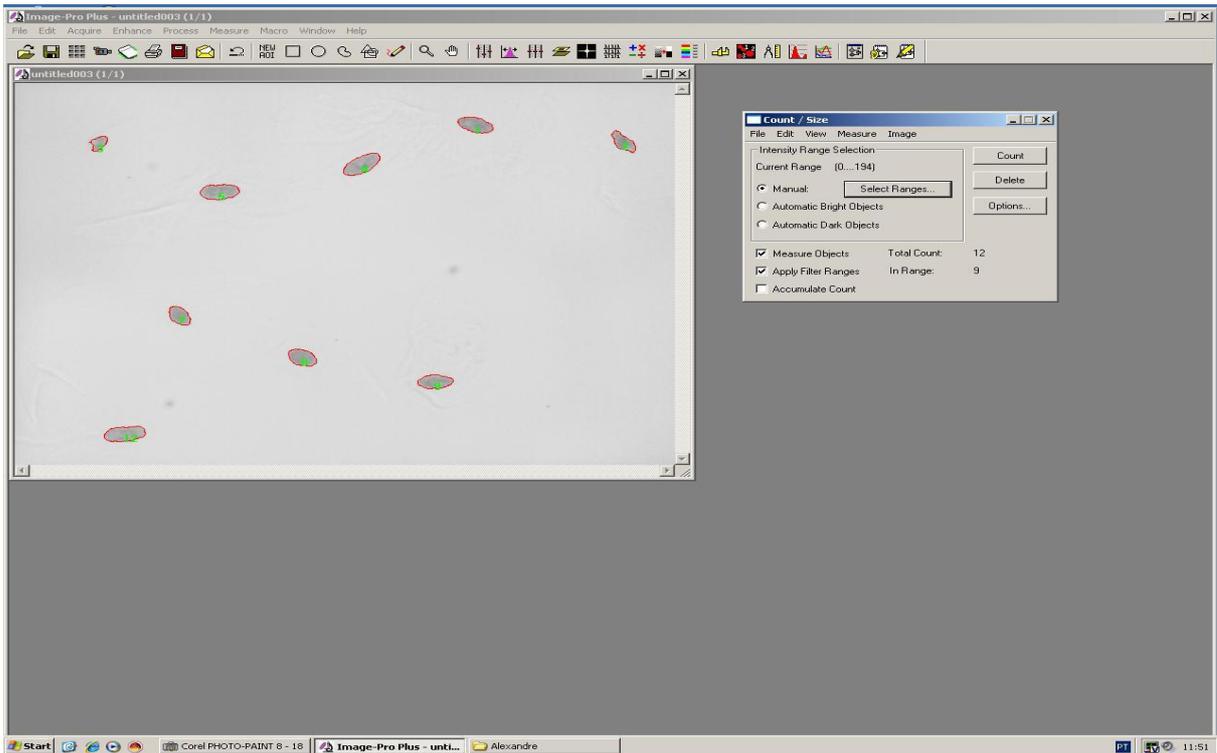


Figura 10 - Seleção dos núcleos

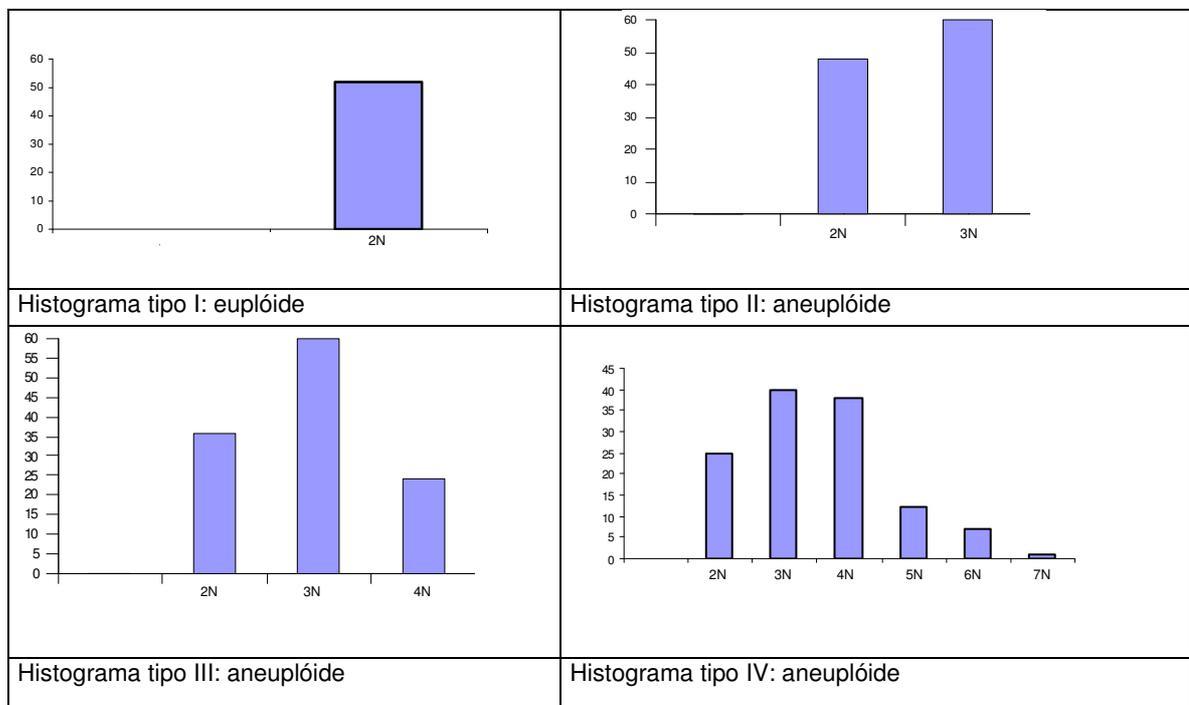


Figura 11 - Classificação dos histogramas de DNA. Modificado de Auer et al. (1991)

#### 4.4.3.3 Critérios de Análise Histopatológica

O padrão-ouro empregado no cálculo dos índices de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos métodos de Papanicolaou e Feulgen foi o exame histopatológico. Foram consideradas as alterações de maturação e proliferação do epitélio, sendo os casos classificados de acordo com dois critérios: (1) diagnóstico histopatológico e (2) presença ou ausência de atipia, independentemente do diagnóstico histopatológico.

Os critérios estabelecidos para os diagnósticos histopatológicos foram: (1) acantose: aumento da espessura da camada espinhosa do epitélio em virtude do aumento do número de células; (2) hiperqueratose: espessamento da camada de ceratina na superfície epitelial (PEREIRA- PINTO et al., 1997); (3) displasia epitelial: conjunto de alterações no processo de proliferação e diferenciação celular que resulta na organização anormal do tecido. Os critérios histológicos descritos por Reibel (2003) e aplicados para caracterizar a displasia epitelial foram: (a) perda da polaridade das células basais; (b) presença de mais de uma camada de células de aspecto basalóide; (c) aumento da relação núcleo/citoplasma; (d) projeções epiteliais em forma de gota; (e) estratificação irregular do epitélio; (f) aumento do número de figuras de mitose, podendo algumas delas apresentarem-se anômalas; (g) figuras de mitose na metade superficial do epitélio; (h) pleomorfismo celular; (i) hiperchromatismo nuclear; (j) nucléolos volumosos; (k) coesão celular reduzida; (l) ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa.

Ao considerar-se o diagnóstico histopatológico como critério de análise para o padrão-ouro, os resultados de carcinoma espinocelular e displasia epitelial foram classificados como positivos para atipia celular, enquanto acantose, acantose-hiperqueratose, fibroma, hiperplasia fibroepitelial, hiperqueratose e líquen plano foram considerados negativos para atipia celular.

As lesões também foram classificadas, ao exame histopatológico, de acordo com o critério de presença ou ausência de atipia celular, independentemente do diagnóstico histopatológico, a fim de possibilitar uma segunda comparação com os resultados das amostras citológicas. Para ser classificada como positiva para atipia celular, a amostra histopatológica deveria ter, no mínimo, 100 células atípicas em um total de dez campos, considerando-se os mesmos critérios de atipia celular empregados na avaliação de Papanicolaou.

#### 4.4.4 Análise Estatística

Foram calculados a acurácia, a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos dois métodos de coloração para o diagnóstico de atipias celulares considerando-se o exame histopatológico como padrão-ouro (Quadro 2). Os resultados obtidos foram comparados por meio do teste *t* de Student para comparação de proporções ao nível de significância de 5%.

		VERDADEIRA CONDIÇÃO DA DOENÇA		
		Presente	Ausente	
RESULTADO DO TESTE	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	

a = indivíduos com resultado verdadeiro-positivo  
 b = indivíduos com resultado falso-positivo  
 c = indivíduos com resultado falso-negativo  
 d = indivíduos com resultado verdadeiro-negativo

$a/a+c$  = SENSIBILIDADE  
 $d/b+d$  = ESPECIFICIDADE  
 $a/a+b$  = VALOR PREDITIVO POSITIVO  
 $d/c+d$  = VALOR PREDITIVO NEGATIVO

a+b = todos os indivíduos com resultado de teste positivo  
 c+d = todos os indivíduos com resultado de teste negativo  
 a+c = todos os indivíduos com a doença  
 b+d = todos os indivíduos sem a doença  
 $a+d/a+b+c+d$  = ACURÁCIA

Quadro 2 - Fórmulas para cálculo dos índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia. Fonte: Castro AA. **Projeto de pesquisa (parte III – tipo de estudo) Planejamento da Pesquisa**. São Paulo: AAC; 2001

*RESULTADOS*

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os 25 casos com diagnóstico clínico de carcinoma espinocelular e o caso de eritroplasia tiveram diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular. Dos 23 diagnósticos clínicos de hiperplasia e três de fibroma, foram confirmados, pelo exame histopatológico, 22 hiperplasias fibroepiteliais e quatro fibromas. Dos 14 casos de leucoplasia, quatro foram diagnosticados, ao exame histopatológico, como acantose-hiperceratose, dois como hiperkeratose e oito como displasia epitelial. Dos nove casos com diagnóstico clínico de líquen plano, um teve resultado histopatológico de acantose-hiperceratose, dois de hiperkeratose, um de displasia epitelial e cinco casos foram confirmados como líquen plano (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição da amostra de acordo com os diagnósticos clínicos e histopatológicos. Porto Alegre, 2007

Diagnóstico	Clínico	Histopatológico
Carcinoma espinocelular	25	26
Eritroplasia	1	-
Fibroma	3	4
Hiperplasia fibroepitelial	23	22
Leucoplasia	14	-
Acantose-hiperceratose	-	4
Hiperkeratose	-	2
Displasia epitelial	-	8
Líquen plano	9	5
Acantose -hiperceratose	-	1
Hiperkeratose	-	2
Displasia epitelial	-	1
Total	75	75

## 5.2 ANÁLISE CITOPATOLÓGICA

### 5.2.1 Resultado Citopatológico X Diagnóstico Histopatológico

A tabela 2 e a figura 12 apresentam a distribuição dos resultados citopatológicos de acordo com o diagnóstico histopatológico. O método de Papanicolaou teve 30 (40%) resultados positivos para atipia celular, 42 (56%) negativos para atipia e três (4%) insatisfatórios. Com o emprego do método de Feulgen, a frequência de resultados positivos para atipia celular foi 45 (60%), de negativos foi 18 (24%) e de insatisfatórios, 12 (16%).

Tabela 2 - Distribuição dos resultados citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007

Diagnóstico Histopatológico	Resultado Citopatológico						Total (n)
	Positivo para atipia (n)		Negativo para atipia (n)		Insatisfatórios (n)		
	Papanicolaou	Feulgen	Papanicolaou	Feulgen	Papanicolaou	Feulgen	
Acantose-Hiperkeratose	1	3	3	-	1	2	10
Carcinoma espinocelular	25	23	-	-	1	3	52
Displasia epitelial	2	7	7	1	-	1	18
Fibroma	-	1	4	3	-	-	8
Hiperkeratose	-	2	4	1	-	1	8
Hiperplasia fibroepitelial	1	5	20	13	1	4	44
Líquen plano	1	4	4	-	-	1	10
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>150</b>

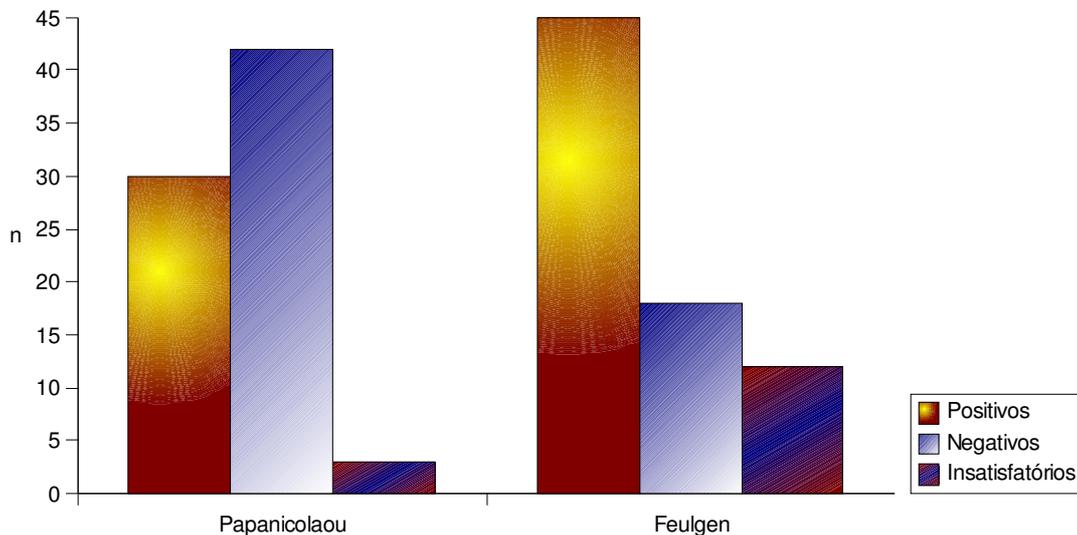


Figura 12 - Resultados positivos para atipia celular, negativos para atipia celular e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007

Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, considerando-se o diagnóstico histopatológico como critério de análise para o padrão-ouro, são apresentados na tabela 3 e na figura 13. A comparação de proporções entre os resultados dos dois métodos de diagnóstico citopatológico, empregando-se o teste *t* de Student para comparação de proporções, ao nível de significância de 5%, mostrou que a sensibilidade do método de Feulgen foi significativamente superior à de Papanicolaou ( $p=0,037$ ), enquanto a especificidade ( $p<0,001$ ) e o valor preditivo positivo ( $p=0,023$ ) foram significativamente superiores com o emprego deste último. Não houve diferença estatisticamente significativa nos quesitos valor preditivo negativo ( $p=0,251$ ) e acurácia ( $p=0,093$ ) entre os dois métodos.

Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007

	Papanicolaou	Feulgen	p*
Sensibilidade	79,4%	96,8%	0,037
Especificidade	92,1%	53,1%	<0,001
Valor preditivo positivo	90,0%	66,7%	0,023
Valor preditivo negativo	83,3%	94,4%	0,251
Acurácia	86,1%	74,6%	0,093

\*Teste *t* de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$

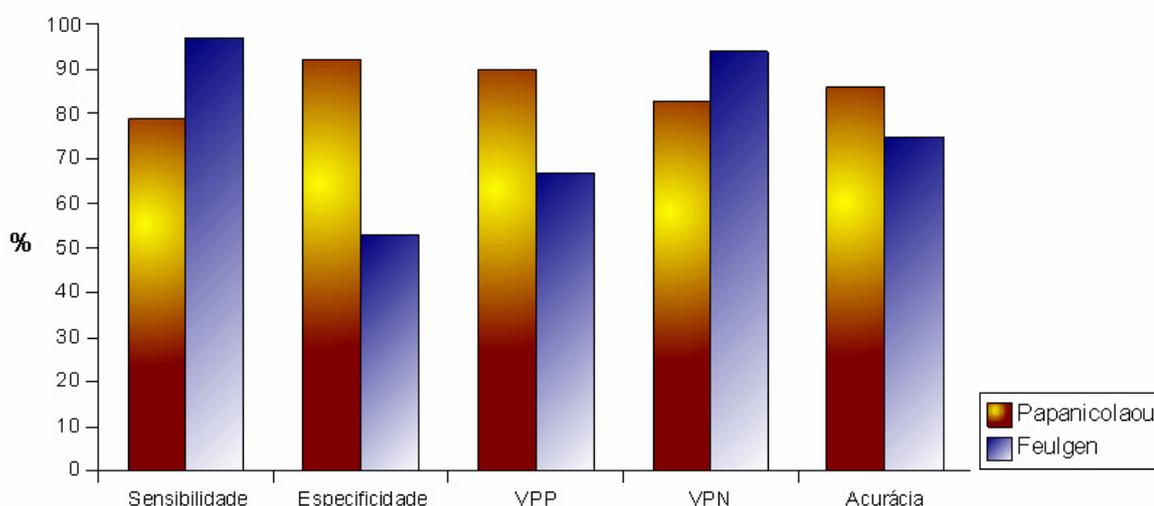


Figura 13 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007

A tabela 4 e a figura 14 exibem os resultados verdadeiro-positivos e falso-negativos dos dois métodos. Obteve-se, com o método de Papanicolaou, para os carcinomas espinocelulares, 25 (96,15%) resultados verdadeiro-positivos, nenhum falso-negativo e um (3,85%) insatisfatório. No método de Feulgen, houve 23 (88,43%) verdadeiro-positivos, nenhum falso-negativo e três (15,54%) insatisfatórios. Nos casos de displasia epitelial, as amostras coradas por Papanicolaou exibiram dois (22,22%) resultados verdadeiro-positivos, sete (77,78%) falso-negativos e nenhum insatisfatório, enquanto as amostras coradas por Feulgen exibiram sete casos (77,78%) verdadeiro-positivos, um (11,11%) falso-negativo e um (11,11%) insatisfatório.

Tabela 4 - Distribuição dos resultados verdadeiro-positivos, falso-negativos e insatisfatórios dos exames citopatológicos pelos métodos de Papanicolaou e Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007

Diagnóstico Histopatológico	Papanicolaou		Feulgen	
	Verdadeiro-positivo	Falso-negativo	Verdadeiro-positivo	Falso-negativo
Carcinoma espinocelular (n=26)	25(1)*	-	23(3)*	-
Displasia epitelial (n=9)	2	7	7(1)*	1
<b>Total</b>	<b>27(1)*</b>	<b>7</b>	<b>30(4)*</b>	<b>1</b>

\*() = Amostras insatisfatórias

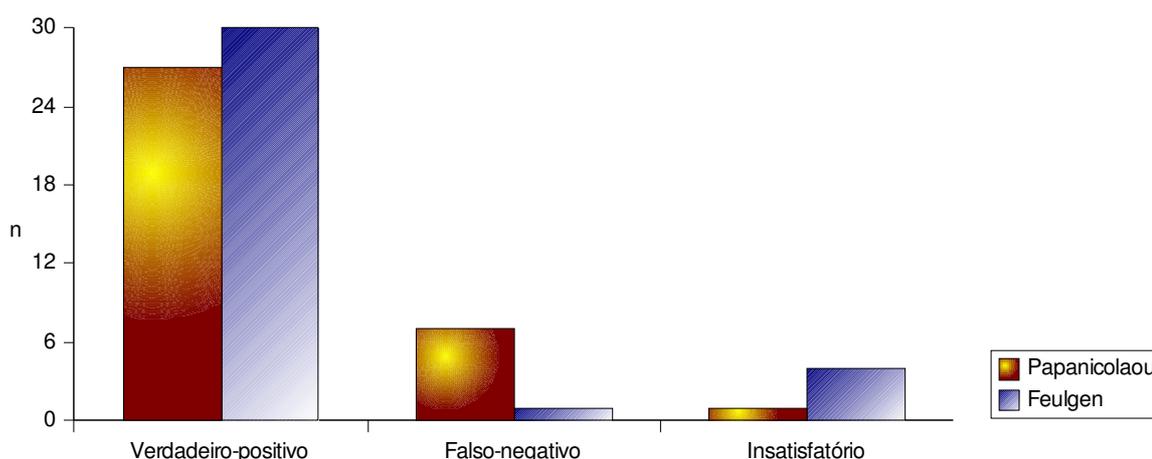


Figura 14 - Resultados verdadeiro-positivos, falso-negativos e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007

A tabela 5 e a figura 15 exibem os resultados verdadeiro-negativos e falso-positivos das amostras nos dois métodos. Ao analisarem-se as hiperplasias fibroepiteliais, verificaram-se 20 (90,90%) resultados verdadeiro-negativos, um (4,55%) falso-positivo e um (4,55%) insatisfatório com o emprego do método de Papanicolaou. No método de Feulgen, houve 13 (45,5%) resultados verdadeiro-negativos, cinco (22,7%) falso-positivos e quatro (18,18%) insatisfatórios.

Tabela 5 - Distribuição dos resultados citopatológicos verdadeiro-negativos, falso-positivos e insatisfatórios dos exames citopatológicos pelos métodos de Papanicolaou e Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico. Porto Alegre, 2007

Diagnóstico Histopatológico		Papanicolaou		Feulgen	
		Verdadeiro-negativo	Falso-positivo	Verdadeiro-negativo	Falso-positivo
Acantose-hiperceratose	(n= 5)	3	1(1)*	-	3(2)*
Fibroma	(n= 4)	4	-	3	1
Hiperceratose	(n= 4)	4	-	1	2(1)*
Hiperplasia fibroepitelial	(n=22)	20	1(1)*	13	5(4)*
Líquen plano	(n= 5)	4	1	-	4(1)*
<b>Total</b>		<b>35</b>	<b>3(2)*</b>	<b>17</b>	<b>15(8)*</b>

\*( ) = Amostras insatisfatórias

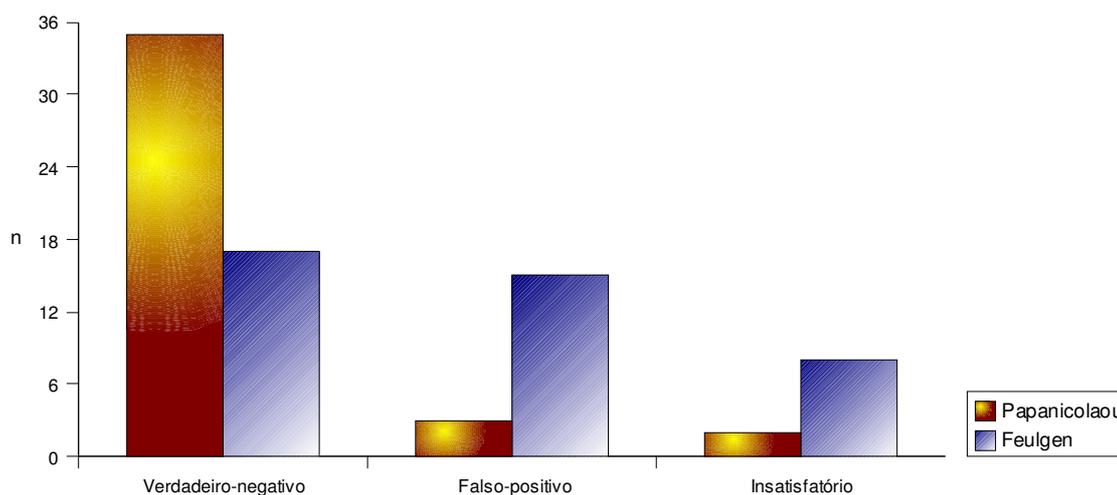


Figura 15 - Resultados verdadeiro-negativos, falso-positivos e insatisfatórios dos exames citopatológicos de Papanicolaou e Feulgen. Porto Alegre, 2007

### 5.2.2 Resultado Citopatológico X Presença/Ausência de Atipia Celular ao Exame Histopatológico Independentemente do Diagnóstico Histopatológico

As tabelas 6 e 7 exibem os resultados obtidos pelos métodos de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico, sem considerar-se o diagnóstico histopatológico da lesão. Na tabela 7 e na figura 16, são apresentados os índices de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. O

método de Feulgen teve sensibilidade ( $p=0,002$ ) e valor preditivo negativo ( $p=0,027$ ) significativamente maiores. Já o método de Papanicolaou teve maior especificidade ( $p=0,02$ ) e maior valor preditivo positivo ( $p=0,026$ ).

Tabela 6 - Distribuição das amostras de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007

Resultado Histopatológico	Resultado Citopatológico						Total (n)
	Positivo para atipia (n)		Negativo para atipia (n)		Insatisfatórios (n)		
	Papanicolaou	Feulgen	Papanicolaou	Feulgen	Papanicolaou	Feulgen	
Positivo para atipia (n=41)	29	35	10	-	2	6	82
Negativo para atipia (n=34)	1	10	32	18	1	6	68
Total	30	45	42	18	3	12	150

Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007

	Papanicolaou	Feulgen	p*
Sensibilidade	74,4%	100%	0,002
Especificidade	97,0%	64,3%	0,002
Valor preditivo positivo	96,7%	77,8%	0,026
Valor preditivo negativo	76,2%	100%	0,027
Acurácia	84,7%	84,1%	0,924

\*Teste *t* de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$

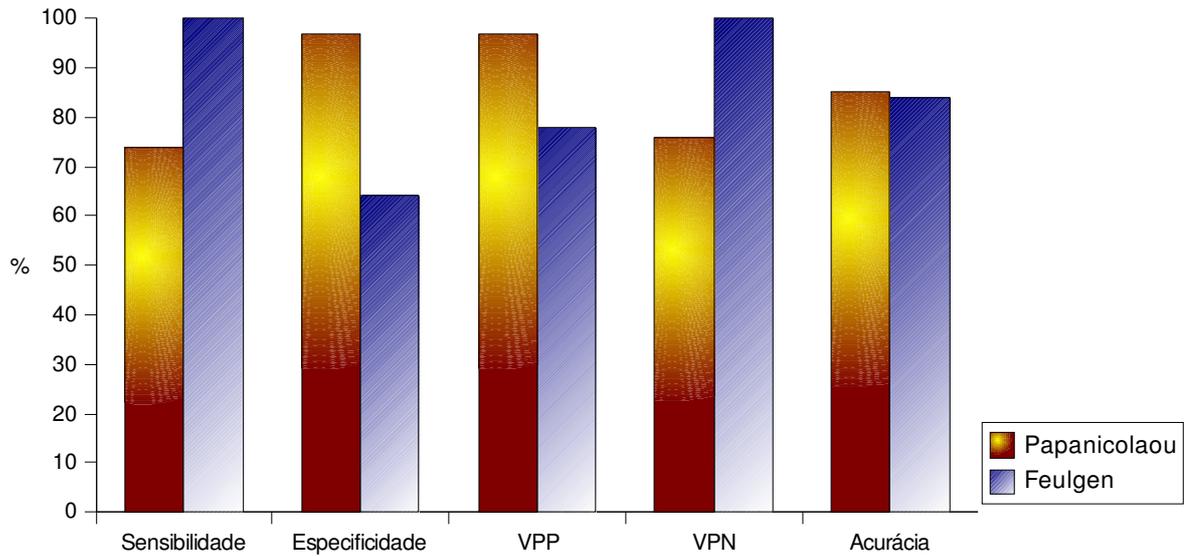


Figura 16 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen considerando-se o critério presença/ausência de atipia celular ao exame histopatológico. Porto Alegre, 2007

### 5.2.3 Resultados Citopatológicos Excluindo-se as Leucoplasias

A tabela 8 e a figura 17 exibem os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia excluindo-se as leucoplasias da análise. Ao excluirmos essas lesões, o método de Papanicolaou teve índices de especificidade ( $p=0,001$ ), valor preditivo positivo ( $p=0,017$ ) e acurácia ( $0,007$ ) significativamente superiores aos exibidos pelo método de Feulgen e, embora este método tenha apresentado 100% de sensibilidade, ao aplicar-se o teste estatístico, este índice não diferiu significativamente do apresentado pelo método de Papanicolaou (Teste t de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$ ).

Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se as leucoplasias. Porto Alegre, 2007

	Papanicolaou	Feulgen	p*
Sensibilidade	96,2%	100%	0,341
Especificidade	93,9%	57,1%	0,001
Valor preditivo positivo	92,6%	66,7%	0,017
Valor preditivo negativo	96,9%	100%	0,482
Acurácia	94,9%	76,9%	0,007

\*Teste t de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$

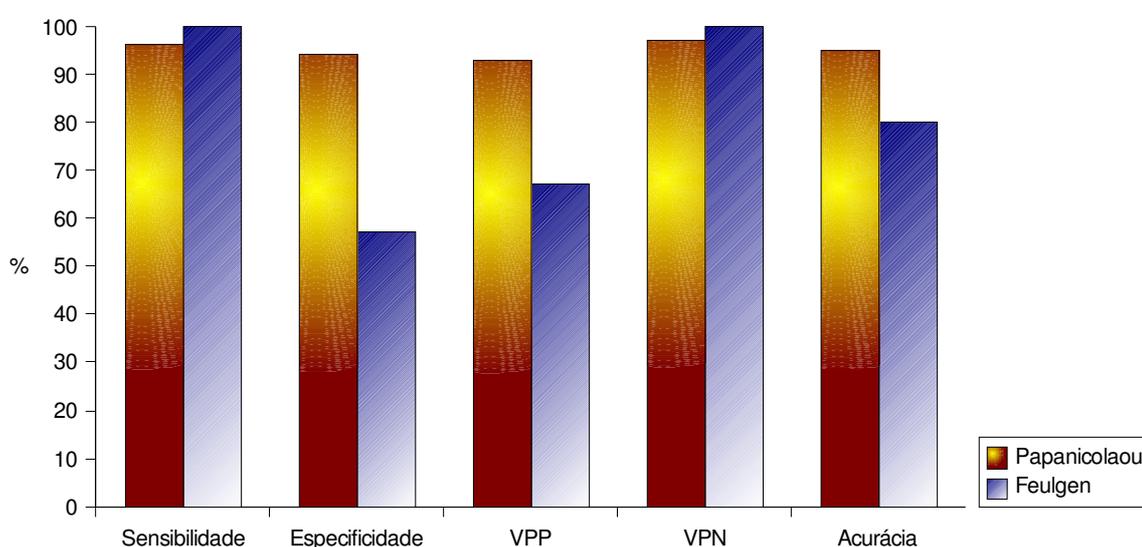


Figura 17 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se as leucoplasias. Porto Alegre, 2007

#### 5.2.4 Resultados Citopatológicos Excluindo-se Leucoplasia, Líquen Plano e Eritroplasia

A tabela 9 e a figura 18 exibem os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia excluindo-se leucoplasia, líquen plano e eritroplasia. Isto é, foram avaliadas as lesões com diagnóstico clínico de carcinoma, hiperplasia e fibroma. Nessa abordagem, ambos os métodos exibiram 100% de sensibilidade. Já a especificidade foi maior para o método de Papanicolaou ( $p=0,030$ ), o que lhe conferiu acurácia também superior ( $p=0,037$ ).

Tabela 9 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se leucoplasia, líquen plano e eritroplasia. Porto Alegre, 2007

	Papanicolaou	Feulgen	p*
Sensibilidade	100%	100%	1,000
Especificidade	96,0%	72,7%	0,030
Valor preditivo positivo	96,0%	78,6%	0,067
Valor preditivo negativo	100%	100%	1,000
Acurácia	98,0%	86,4%	0,037

\*Teste t de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$

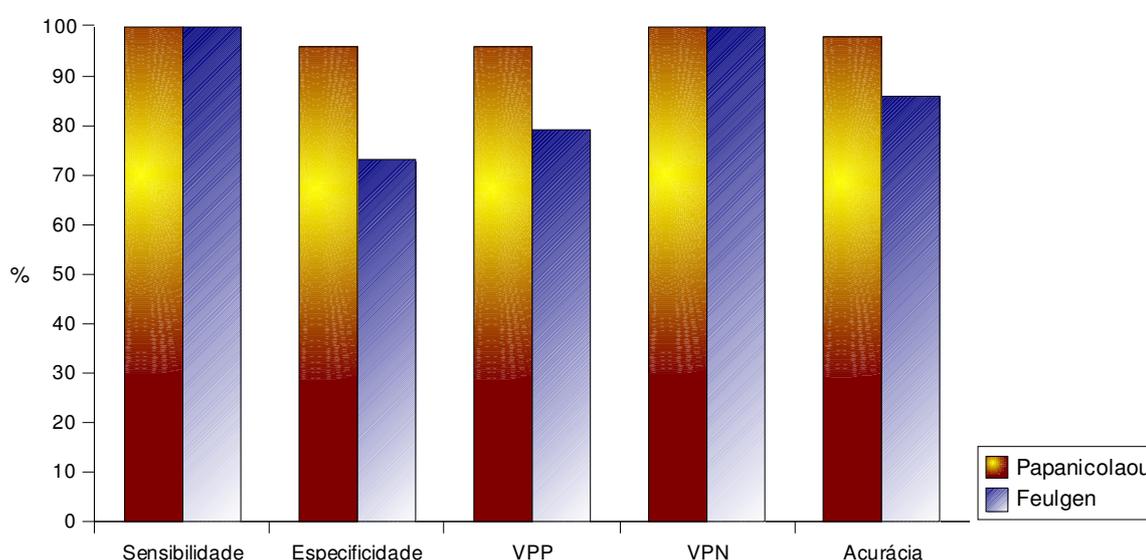


Figura 18 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se leucoplasia, líquen plano e eritroplasia. Porto Alegre, 2007

### 5.2.5 Resultados Citopatológicos Excluindo-se os Carcinomas

A tabela 10 e a figura 19 exibem os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, excluindo-se os carcinomas. A partir desta análise, verificou-se diferença significativa de sensibilidade entre os métodos de Feulgen e Papanicolaou (Teste t de Student para comparação de proporções,  $p=0,017$ ). Já a especificidade foi significativamente superior com o emprego do método de Papanicolaou ( $p<0,001$ ). Não foi observada diferença significativa para os valores preditivos positivo ( $p=0,728$ ) e negativo ( $p=0,252$ ) ou para a acurácia entre os métodos ( $p=0,061$ ).

Tabela 10 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se os carcinomas. Porto Alegre, 2007

	Papanicolaou	Feulgen	p*
Sensibilidade	22,2%	87,5%	0,017
Especificidade	92,1%	53,1%	<0,001
Valor preditivo positivo	40,0%	31,8%	0,728
Valor preditivo negativo	83,3%	94,4%	0,252
Acurácia	78,7%	60,0%	0,061

\*Teste *t* de Student para comparação de proporções,  $\alpha=5\%$

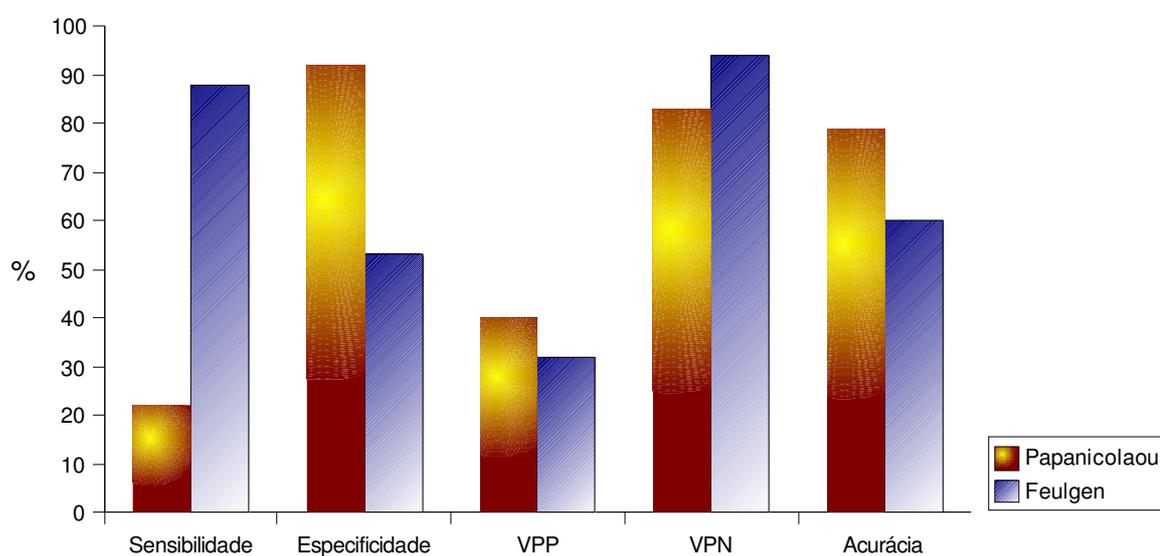


Figura 19 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos de Papanicolaou e Feulgen excluindo-se os carcinomas. Porto Alegre, 2007

### 5.2.6. *Concordância Entre os Métodos de Papanicolaou e Feulgen e o Exame Histopatológico (padrão-ouro)*

A tabela 11 exibe o índice de concordância Kappa entre os métodos de Papanicolaou e de Feulgen e o diagnóstico histopatológico.

Tabela 11 - Índice de concordância Kappa entre os métodos de Papanicolaou e de Feulgen e o exame histopatológico (padrão-ouro). Porto Alegre, 2007

Exame Histopatológico	Papanicolaou	Feulgen
Amostra completa	0,720	0,495
Exceto leucoplasias	0,897	0,552
Exceto cancerizáveis	0,959	0,727
Exceto carcinomas	0,173	0,245

### 5.2.7 *Área, Diâmetro e Densidade Ótica Integrada Nucleares*

A tabela 12 exibe as médias e os desvios-padrão obtidos na citometria digital por Feulgen para área, diâmetro e densidade ótica integrada nucleares. Os resultados obtidos para as variáveis são apresentados de acordo com o diagnóstico histopatológico das lesões.

Tabela 12: Média e desvio-padrão das variáveis citométricas nucleares pelo método de Feulgen, de acordo com o diagnóstico histopatológico das lesões. Porto Alegre, 2007

Diagnóstico Histopatológico	Variáveis Citométricas Nucleares		
	Área (pixels <sup>2</sup> )	Diâmetro (pixels)	DOI (pixels)
Acantose-Hiperkeratose	2784 ± 1164	58,58 ± 11,61	264,80 ± 140,10
Carcinoma espinocelular	3124 ± 1724	61,33 ± 15,05	353,72 ± 103,90
Displasia epitelial	2938 ± 1226	60,12 ± 12,12	313,56 ± 88,78
Fibroma	3003 ± 754	62,44 ± 9,19	239,56 ± 55,48
Hiperkeratose	2543 ± 813	56,41 ± 9,16	257,71 ± 43,15
Hiperplasia fibroepitelial	2301 ± 742,44	53,53 ± 9,32	235,16 ± 64,12
Líquen plano	3774 ± 1884	67,45 ± 17,28	331,60 ± 129,00

DOI = Densidade ótica integrada

A tabela 13 exibe os valores obtidos para área, diâmetro e densidade ótica integrada nucleares, segundo a positividade ou negatividade para atipia celular no exame histopatológico.

Tabela 13 – Área, diâmetro e densidade ótica integrada nucleares, segundo a positividade ou negatividade para atipia celular. Porto Alegre, 2007

Variáveis Citométricas Exame Citopatológico	Exame Histopatológico				p*
	Positivo para atipia		Negativo para atipia		
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
Área (pixels <sup>2</sup> )	2922,58	782,11	2367,41	844,09	0,009
Diâmetro (pixels)	59,49	8,14	53,99	9,01	0,014
DOI (pixels)	333,64	87,54	265,76	92,32	0,004

\*Teste *t* de Student,  $\alpha=5\%$

Por meio do teste *t* de Student, ao nível de significância de 5%, verificou-se que, entre os casos com positividade para atipia celular ao exame histopatológico, a área nuclear ( $p=0,009$ ), o diâmetro nuclear (0,014) e a densidade ótica integrada (0,004) são significativamente maiores do que nos casos negativos para atipia.

*DISCUSSÃO*

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, não houve diferença significativa de acurácia entre os métodos de Papanicolaou e de Feulgen, ao serem analisadas as lesões hiperplásicas, que representaram o padrão de benignidade, as cancerizáveis, o padrão de transição e os carcinomas, o padrão de malignidade. O resultado permite inferir que os dois métodos têm desempenho semelhante na detecção de atipias celulares. Por outro lado, a sensibilidade e a especificidade diferiram significativamente entre ambos. A sensibilidade foi significativamente maior no método de Feulgen (96,8%), enquanto a especificidade foi superior no método de Papanicolaou (92,1%). Tal achado indica que, embora tenham exibido acurácia semelhante, os métodos devem ser empregados de forma associada, processo em que o Feulgen faria o rastreamento e o Papanicolaou, a confirmação do resultado. Isto é, a positividade para atipia deveria ser observada nos dois exames simultaneamente para, então, definir-se o diagnóstico citopatológico.

A determinação do padrão-ouro considerou dois critérios de análise: (1) o diagnóstico histopatológico, que classificou displasia epitelial e carcinoma como positivos para atipia celular, e as demais lesões como negativas; (2) presença/ausência de atipia celular, independentemente do diagnóstico histopatológico. Este último foi aplicado para testar-se possível viés de aferição no resultado do exame histopatológico. Entretanto, mesmo alterando-se o critério de análise, os dois métodos citopatológicos mantiveram acurácia semelhante e sensibilidade e especificidade significativamente diferentes, assim como verificado por ocasião da determinação do padrão-ouro considerando-se como critério o diagnóstico histopatológico.

Remmerbach et al. (2004) empregaram o método de análise combinada das colorações de Papanicolaou por citomorfologia e Feulgen por citometria digital e obtiveram sensibilidade de 97,8% e especificidade de 100%. No presente estudo, os resultados de cada método foram interpretados de forma independente, fato que justifica as diferenças de sensibilidade e especificidade observadas.

Maraki et al. (2004), ao analisarem citologias de lesões orais com o emprego das técnicas de Papanicolaou e de Feulgen, obtiveram 100% de sensibilidade e 97,4% de especificidade. O índice elevado tanto para especificidade quanto para sensibilidade resultou da interpretação combinada dos resultados dos dois testes.

Isto é, nos casos em que houve dúvida diagnóstica no Papanicolaou, a citometria digital com o método de Feulgen foi aplicada para definir o diagnóstico. Entretanto, de acordo com os resultados do presente estudo, a análise combinada deveria empregar não o Feulgen, e sim o Papanicolaou para confirmação diagnóstica, já que este apresentou maior especificidade e aquele, maior sensibilidade. Os testes sensíveis devem ser empregados quando a penalidade por deixar de diagnosticar uma doença é grande, pois são úteis para excluir a presença de doença. Já os testes específicos são úteis para confirmar um diagnóstico sugerido por outros dados. Isso, porque raramente são positivos na ausência de doença, pois apresentam poucos resultados falso-positivos (FLETCHER et al., 2003). No presente estudo, o método de Papanicolaou exibiu três (4%) resultados falso-positivos, enquanto as amostras de Feulgen exibiram 15 (20%) resultados desta natureza. Entretanto, Maraki et al. (2004) aplicaram a citometria digital associada ao Feulgen para definir o diagnóstico nos casos em que o resultado do Papanicolaou foi duvidoso. Segundo Castro (2001), em estudos de acurácia, a comparação com o padrão-ouro deve ser independente e mascarada, critério que foi respeitado no presente estudo. Por outro lado, Maraki et al. (2004), embora tenham usado o exame histopatológico como padrão-ouro, não testaram os métodos citopatológicos de forma independente. Isto é, os autores não investigaram a sensibilidade e a especificidade do método de Feulgen em relação ao padrão-ouro, mas partiram do pressuposto de que os resultados deste método aplicam-se à confirmação diagnóstica do Papanicolaou. Ainda, os autores não especificam se sua análise foi cegada. Possivelmente, o embasamento para tais procedimentos foi o fato de o DNA aneuplóide ser aceito, internacionalmente, como marcador de transformação celular neoplásica (BÖCKING et al., 1985; HAROSKE et al., 2001; WIED et al., 1995).

Outro aspecto a ser considerado, é o fato de Maraki et al. (2004) terem classificado as displasias epiteliais leves e moderadas como negativas para atipia. Na presente pesquisa, todos os diagnósticos histopatológicos de displasia epitelial foram considerados positivos para atipia celular. A classificação de displasias epiteliais leves e moderadas como negativas para atipia pode ter contribuído para uma maior sensibilidade do Papanicolaou nos achados de Maraki et al. (2004), já que o maior índice de falso-negativos do método parece estar associado às displasias. Se, no presente estudo, as displasias tivessem sido consideradas negativas para atipia, a acurácia do Feulgen teria sido ainda menor, com valor de

65%, uma vez que seus índices de sensibilidade e especificidade seriam, respectivamente, 45% e 100%.

Navone et al. (2004) obtiveram sensibilidade de 86,5% e acurácia de 89,6% para o método de Papanicolaou. Os autores também empregaram o exame histopatológico como padrão-ouro e realização da biópsia logo após a coleta citológica. A amostra foi composta de lesões com diagnóstico clínico de eritroplasia, leucoplasia e líquen plano, sendo as displasias epiteliais classificadas como positivas para atipia celular. Entretanto, a pesquisa restringiu-se à avaliação do citopatológico corado por Papanicolaou, sem o uso de outras colorações.

Poate et al. (2004), em estudo que avaliou o desempenho diagnóstico do método *Oral Cdx*<sup>®</sup> (Papanicolaou) em lesões cancerizáveis, obtiveram sensibilidade de 71,4% e especificidade de 32%. Os autores relatam intervalos entre as coletas citopatológica e histopatológica que chegaram até 233 dias. No presente estudo, a biópsia foi realizada, em todos os casos, imediatamente após a coleta citopatológica. Tal procedimento teve por objetivo evitar o viés representado pela possível progressão das alterações epiteliais no lapso compreendido entre as duas coletas.

Devem-se considerar, ainda, as peculiaridades dos dois métodos em questão. A coloração de Papanicolaou associada à análise citomorfológica tem como principal característica a subjetividade, e o diagnóstico depende, entre outros fatores, da experiência do observador (CECCOTTI, 1991). A técnica de Feulgen associada à citometria digital tem a objetividade como atributo principal, porque os núcleos são selecionados, e as variáveis citométricas definidas por análise e cálculos realizados por programa de computador (WHEELESS, 1993; BAAK; JANSSEN, 2004). Ainda, na técnica de Feulgen, coram-se somente os núcleos, sítio onde o processo de carcinogênese inicia. Tais peculiaridades suscitam alguns questionamentos a respeito da diferença de sensibilidade e especificidade entre os dois métodos. O menor desempenho do Feulgen no quesito especificidade ocorreu pelo fato de que algumas lesões foram consideradas aneuplóides, a despeito do diagnóstico histopatológico de natureza benigna. Isto é evidenciado pelo índice de casos falso-positivos entre as hiperplasias fibroepiteliais: um (4,55%) falso-positivo com o emprego da técnica de Papanicolaou e cinco (22,7%) falso-positivos com a de Feulgen. Faz-se necessário, portanto, questionar se simplesmente o Feulgen fornece um índice maior de falso-positivos, isto é, acusa atipia celular onde ela não existe ou se ele detecta atipias precocemente, antes mesmo que os exames

citomorfológico (Papanicolaou) e histopatológico (HE) o façam. O teste dessa hipótese requer um estudo prospectivo que acompanhe a evolução das características histopatológicas das lesões em que o Feulgen acusou atipia e o exame histopatológico não. E, sendo procedente tal ilação, talvez o exame histopatológico do padrão-ouro devesse contemplar, além da coloração por HE, também a coloração por Feulgen. Tais argumentos parecem respaldar a aplicação, já relatada por Maraki et al. (2004), do Feulgen como teste confirmatório dos achados de Papanicolaou.

Pode-se, ainda, questionar a eleição do exame histopatológico por HE como padrão-ouro, uma vez que a subjetividade de interpretação não se restringe ao Papanicolaou, mas também é característica dos critérios de análise histopatológica na técnica de rotina (HE). É preciso considerar, entretanto, que, embora alguns dos critérios diagnósticos de malignidade aplicados à interpretação histopatológica possam ser observados em amostras citológicas, seu comparecimento é menos intenso em citologias orais, tanto convencionais quanto em meio líquido, uma vez que as mesmas exibem celularidade reduzida. Apesar da subjetividade inerente à sua interpretação, o exame histopatológico viabiliza amostras ricas em estruturas microscópicas e continua sendo o padrão-ouro no diagnóstico das lesões cancerizáveis e do câncer (ACHA et al., 2005; CAMPAGNOLI et al., 2005). O que precisa ser lembrado é que a histopatologia retrata as condições morfológicas do tecido no momento em que foi biopsiado, mas não há garantia de que as características se mantenham no decorrer do tempo.

Mollaoglu et al. (2001) relatam um caso com diagnóstico clínico de líquen plano cuja biópsia revelou quadro histopatológico de candidíase crônica hiperplásica com displasia epitelial leve. Ao ser submetido à análise citomorfométrica por Feulgen, o espécime histopatológico exibiu valores de área nuclear e densidade óptica integrada significativamente superiores aos da mucosa normal. Decorridas oito semanas do exame inicial, os autores procederam à nova biópsia da lesão, cujo diagnóstico histopatológico foi carcinoma espinocelular multifocal. O relato corrobora a idéia de que o Feulgen seja capaz de revelar o potencial de malignização de uma lesão e sugere que sua positividade seja indicativa da necessidade de excisão cirúrgica da mesma ou acompanhamento intensivo do paciente.

Por outro lado, a presença de aneuploidia em lesões benignas ou cancerizáveis não representa, fatalmente, sua evolução para uma neoplasia

maligna. Processos inflamatórios e outros processos reacionais podem manifestar atipias reversíveis. Há relatos, inclusive, de involução de displasias epiteliais. O papel de mecanismos de *checkpoint*, como a proteína p53, que induzem à reparação do dano do DNA e, este não ocorrendo, à apoptose, devem ser considerados (SHERR, 1996; STRAUSS, 1999; REIBEL, 2003). Estaria em questão, portanto, o significado clínico da aneuploidia, já que genes de supressão tumoral, que têm a capacidade de inibir a proliferação, regular a síntese do DNA e mediar seu reparo, podem impedir a transformação maligna.

Na determinação do padrão-ouro pelo critério do diagnóstico histopatológico, todos os casos de displasia epitelial foram considerados positivos para atipia celular. Os resultados obtidos para essa lesão nas amostras coradas por Papanicolaou exibiram índice significativamente maior de falso-negativo em relação às amostras coradas por Feulgen. Tal achado sugere que a capacidade da técnica de Feulgen em detectar alterações em lesões desta natureza seja superior à de Papanicolaou. Entre as nove displasias epiteliais, o método de Papanicolaou teve seis resultados falso-negativos, enquanto na técnica de Feulgen houve um falso-negativo. Convém ressaltar que, no presente estudo, oito das displasias epiteliais eram, ao exame físico, leucoplasias. Segundo Montgomery e Von Haam (1951a), os achados citológicos de leucoplasias são insuficientes para definir um diagnóstico, pois as características citológicas deste tipo de lesão não são capazes de sugerir alterações malignas. Ceccotti (1991) e Scheifele et al. (2004) também relatam desvantagens do emprego da citologia esfoliativa em leucoplasias. Tal fato parece ser a justificativa para o elevado índice de falso-negativos exibido pelo Papanicolaou quando analisadas as displasias.

Ao excluírem-se as leucoplasias da análise, o método de Papanicolaou manteve especificidade superior à do Feulgen ( $p=0,001$ ), mas não houve diferença entre os métodos no quesito sensibilidade. Ou seja, a sensibilidade do Papanicolaou sofreu incremento com a exclusão das lesões leucoplásicas, o que corrobora os relatos de Montgomery e Von Haam (1951a), Ceccotti (1991) e Scheifele et al. (2004) e permite inferir que a menor sensibilidade do Papanicolaou está associada às leucoplasias. Embora compatível com os critérios estabelecidos no presente estudo, a pouca celularidade que as amostras citológicas de leucoplasias coradas por Papanicolaou exibem à microscopia ótica pode ser um dos fatores responsáveis por esse achado.

Ao excluírem-se da análise as lesões cancerizáveis (leucoplasia, líquen plano e eritroplasia), ambos os métodos exibiram 100% de sensibilidade, enquanto a especificidade, o valor preditivo positivo e a acurácia foram significativamente superiores no método de Papanicolaou. Isso significa que a deficiência do Papanicolaou acontece nas lesões cancerizáveis, representadas, em sua maioria, no presente estudo, por leucoplasias. Mas, para detectar atipias em carcinomas, o método tem a mesma sensibilidade do Feulgen.

Ao serem excluídos os carcinomas da análise, a sensibilidade manteve-se significativamente superior para o método de Feulgen. Nas displasias, este identificou graus de ploidia compatíveis com atipia celular, enquanto a técnica de Papanicolaou não foi capaz de identificá-las. No quesito especificidade, o método de Papanicolaou manteve-se significativamente superior ao Feulgen, inclusive com aumento do valor preditivo positivo. Ou seja, a positividade do Papanicolaou nessas lesões é fortemente indicativa da presença de atipia (FLETCHER et al., 2003).

No estudo de Montgomery e Von Haam (1951a), os achados citopatológicos de leucoplasias não foram suficientes para definir o diagnóstico ou sugerir alterações malignas. No presente estudo, achados semelhantes foram observados por ocasião da análise dessas lesões pelo método de Papanicolaou. Entretanto, com o emprego do Feulgen, os resultados foram outros, pois das 14 leucoplasias, oito foram consideradas aneuplóides, sendo que, dessas oito, seis corresponderam a resultados verdadeiro-positivos. Ou seja, o método de Feulgen foi capaz de detectar atipias em leucoplasias. Os fatores já apontados como possíveis responsáveis pela menor capacidade de o Papanicolaou detectar atipia em lesões leucoplásicas foram a pouca celularidade que resulta das coletas citopatológicas dessas lesões e suas características histológicas de hiperqueratose e acantose, que resultam em amostras citológicas de células superficiais, não contemplando células epiteliais mais profundas (CECCOTTI, 1991). Entretanto, tais fatores ocorrem tanto nas amostras de Papanicolaou quanto nas amostras de Feulgen. Ao considerar-se que as células coletadas pela citologia esfoliativa são superficiais, deve-se atentar para a morfologia das mesmas. As células da camada superficial do epitélio não-queratinizado são ligeiramente achatadas, com filamentos dispersos, glicogênio e poucas organelas, mas o núcleo persiste. No epitélio queratinizado, as células mais superficiais são extremamente desidratadas, todas as organelas estão perdidas, persiste apenas material fibrilar comprimido e, quando esse epitélio é

paraceratinizado, os núcleos persistem (TEN CATE, 2001). Uma vez que a morfologia das células superficiais fica pobremente preservada, enquanto os núcleos persistem, e considerando-se que o Papanicolaou avaliou a morfologia celular, enquanto o Feulgen avaliou características nucleares, parece justificável a discrepância de desempenho entre os dois métodos por ocasião da análise das leucoplasias.

Sciubba (1999) obteve, com o método *Oral Cdx*<sup>®</sup>, 100% de sensibilidade, enquanto a especificidade foi de 92,9% e nenhum resultado insatisfatório. Os melhores resultados de sensibilidade e menor número de amostras insatisfatórias obtidos pelos autores podem ser explicados, em parte, pela manipulação da escova citológica. No método *Oral Cdx*<sup>®</sup>, a escova é rotada de cinco a dez vezes, enquanto, na presente pesquisa, a escova foi pressionada contra a área e rotada cinco vezes em sentido horário. A instrução do fabricante de se executarem cinco rotações é adequada a coletas cérvico-uterinas, que se caracterizam por maior celularidade do que as amostras orais. Talvez, maior celularidade e, conseqüentemente, menor índice de amostras insatisfatórias tivessem sido obtidos se a coleta tivesse sido realizada com um maior número de rotações da escova.

Goldsby e Staats (1963) sugeriram que área nuclear, área citoplasmática e relação núcleo-citoplasma são importantes fatores a serem considerados para avaliar normalidade celular em citologias esfoliativas da cavidade oral. Tucker et al. (1994), ao empregarem três métodos de análise citométrica em amostras coradas por Feulgen, conseguiram distinguir amostras de lesões malignas de amostras normais, mas não conseguiram distinguir lesões cancerizáveis de lesões malignas. A discriminação destas últimas pôde ser feita quando foram mensuradas as áreas citoplasmáticas nas amostras coradas por Papanicolaou. Ou seja, os autores aplicaram análise citomorfométrica às amostras de Papanicolaou. No presente estudo, foi verificada diferença estatisticamente significativa das variáveis citométricas avaliadas quando se empregou o critério dicotômico de análise. Ao compararem-se os resultados positivos e negativos para atipia no exame histopatológico, as amostras positivas exibiram, na citometria digital por Feulgen, área ( $p=0,009$ ) e diâmetro nucleares ( $p=0,014$ ) significativamente maiores que os verificados nas amostras negativas para atipia. Entretanto, a citometria só foi associada ao Feulgen, ao passo que a interpretação do Papanicolaou baseou-se em dados citomorfológicos. É possível que o emprego do método de Papanicolaou

associado à análise citométrica viesse a originar resultados diferentes dos obtidos. Talvez, o tipo de análise, a citomorfológica mais subjetiva e a citométrica mais objetiva, seja o maior responsável pelas diferenças verificadas entre os métodos e não a coloração em si.

Apesar de as amostras positivas para atipia terem exibido área e diâmetro nucleares significativamente maiores que as amostras negativas para atipia, a aplicação dessas variáveis citométricas como critério diagnóstico de alteração maligna requer cautela e novas investigações. Ao considerar-se o grupo dos fibromas, os valores obtidos para área e diâmetro nucleares foram próximos daqueles verificados para displasia e carcinoma. É possível que tal achado seja conseqüente ao reduzido tamanho da amostra de fibromas. Amostras maiores de cada um dos diferentes grupos de lesões devem ser analisadas a fim de definir-se se, além da distinção entre lesões positivas e negativas para atipia, as variáveis citométricas diferem significativamente entre as distintas lesões avaliadas.

O índice de amostras insatisfatórias foi maior para o método de Feulgen (16%) do que para o Papanicolaou (4%). A pouca celularidade e a presença de células epiteliais obscurecidas por material hemorrágico, purulento ou dessecado são fatores responsáveis por amostras insatisfatórias em ambos os métodos. Ainda, a reação de Feulgen exige rigor de técnica laboratorial e sofre influência das condições ambientais (BAAK; JANSSEN, 2004). Em função disso, todas as lâminas submetidas a essa reação foram coradas no mesmo dia e com a temperatura ambiente monitorada em 22°C. A coloração de Papanicolaou, por sua vez, parece estar menos sujeita a falhas técnicas.

De acordo com os resultados da presente pesquisa, os métodos de Papanicolaou por citomorfologia e de Feulgen por citometria digital não exibem diferença significativa de acurácia na detecção de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral. Entretanto, a sensibilidade significativamente superior do Feulgen e a especificidade significativamente superior do Papanicolaou indicam que a aplicação ótima dos métodos consiste em seu uso combinado. Por outro lado, em função de limitações técnicas e financeiras, o uso de ambos em rastreamentos populacionais pode ser inviável. No caso de serem aplicados isoladamente, deve-se considerar que a alta sensibilidade e o elevado valor preditivo negativo do Feulgen significam que seu resultado negativo constitui forte indicativa de ausência de atipia;

enquanto a alta especificidade e o elevado valor preditivo positivo do Papanicolaou significam que sua positividade é forte indicativa de presença de atipia. A limitação do Feulgen, portanto, consiste no risco de resultados falso-positivos e a do Papanicolaou, de falso-negativos. Ambos os métodos não se aplicam para estabelecer diagnósticos definitivos, mas fornecem indicação de necessidade ou não de biópsia para processamento histopatológico.

*CONCLUSÕES*

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- 7.1 O método de Feulgen associado à citometria digital e o método de Papanicolaou por citomorfologia exibem acurácia semelhante na detecção de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral.
- 7.2 Na detecção de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral, o método de Papanicolaou associado à análise citomorfológica tem valor preditivo positivo e especificidade superiores aos do Feulgen por citometria digital, enquanto este exibe maior sensibilidade. Os métodos não diferem significativamente no quesito valor preditivo negativo.
- 7.3 No método de Feulgen, as variáveis citométricas nucleares densidade ótica integrada, área e diâmetro são capazes de diferenciar lesões positivas e negativas para atipia em exames citopatológicos da mucosa oral.
- 7.4 As diferenças de sensibilidade e especificidade sugerem que ambos os métodos citopatológicos sejam aplicados de forma combinada.

## *REFERÊNCIAS*

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, M. et al. Prediction of malignant transformation in oral epithelial lesions by image cytometry. **Cancer**, New York, v. 62, n. 9, p.1981-1987, Nov. 1988.
- ACHA, A. et al. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, Valencia, v.10, n. 2, p.95-102, Mar-Apr. 2005.
- AUER, G.U.; CASPERSSON, T.O.; WALLGREN, A.S.; DNA content and survival in mammary carcinoma. **Anal Quant Cytol.**, St. Louis, v. 2, n.3, p. 161-165, 1980.
- AUER, G.U.; FALKMER, U.G.; ZETTERBERG, A.D. **Image cytometric nuclear DNA analysis in clinical tumour material.** In: BAAK J.P., **Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis.** Berlin: Springer-Verlag, 1991, p. 616.
- BAAK, J. P.; JANSSEN, E. DNA ploidy analysis in histopathology. Morphometry and DNA cytometry reproducibility conditions and clinical applications. **Histopathology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 603-614, Jun. 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**, Caxias do Sul, v. 10, n. 1, p. 17-23, 2001.
- BEVILACQUA, S. Considerações sobre a biópsia e o citodiagnóstico. **Rev Bras Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 136, p. 173-178, jul-ago. 1965.
- BÖCKING, A. et al. Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. **Cancer**, New York, v.56, n.7, p. 1600-1604, 1985.
- CAMPAGNOLI, E. B. et al. Citologia em base líquida - uma nova opção para o diagnóstico de lesões orais. **RBPO**, Natal, v. 4, n. 2, p. 119-127, 2005.
- CANÇADO, R. P.; YURGEL L. S.; FILHO, M.S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 446-454, Jul. 2001.
- CARVALHO G. **Citologia Oral.** Rio de Janeiro: Revinter 2002.
- CASTRO A.A. Planejamento da Pesquisa. Projeto de pesquisa (parte III – tipo de estudo). **AAC**, São Paulo, cap. 5 p. 1-16, 2001. Disponível em <http://www.evidencias.com/planejamento> <http://www.metodologia.org> Acessado em: 06-08-2007.
- CECCOTTI, E. L. Aplicacion de la citologia exfoliativa bucal al estudio de la leucoplasia. **Rev Asoc Odontol Argent.**, Buenos Aires, v. 79, n. 1, p. 41-42, ene-mar. 1991.

CHAUDHRY, A.P.; SCHMUTZ, J.A.; HANKS, C.T. Comparison of cytologic and histologic findings in induced carcinoma. **J Dent Res.**, Alexandria, v.46, n. 1, p. 253-256, Jan-Feb. 1967.

COHEN, L. Some observations on the use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v.21, n.4, p.458-464, Apr. 1966.

CORTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**. Porto, n. 71 p. 19-33, abr. 2002. Acessado em 1<sup>o</sup>-12-2006. Disponível em <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/71/pdf/citolanalitica.pdf>

EISEN, D.; FRIST, S. The relevance of the high positive predictive value of the oral brush biopsy. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 753-755, Aug. 2005.

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

FEMIANO, F.; SCULLY, C. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, Valencia, v. 10, Suppl/1, p. E9-14, Apr. 2005.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER S.W.; WAGNER, E.H. **Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas 2003.

FOLSOM, T.C. et al. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 33, n. 1, p. 61-64, Jan. 1972.

FREITAS, M.D. et al. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, Valencia, v. 9, n.4, p. 355-361, ago.-oct. 2004.

GIARDINA, C. et al. 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.

GOLDSBY, J.W., STAATS, O.J. Nuclear changes in intra-oral exfoliated cells of six patients with sickle cell disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 16, p. 1042-1048, 1963.

HARDIE, D.C.; GREGORY, T.R., HEBERT, P.D. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **J Histochem Cytochem.**, New York, v. 50, n. 6, p. 735-749, Jun. 2002.

HAROSKE, G. et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Anal Cell Pathol.**, Amsterdam, v. 23, n.2, p. 89-95, 2001.

HAYAMA, F.H. et al. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, Valencia, v. 10, n.2, p. 115-122, Mar.-Apr. 2005.

INGRAM, R.C. et al. Exfoliative cytology and the early diagnosis of oral cancer. **Cancer**, New York, v. 16, p. 160-165, Feb. 1963.

JOHNSON, P.L.; KLEIN, M.N. Application of Papanicolaou stain to paraffin sections. **Stain Technol.**, Baltimore, v. 31, n.5, p. 223-225, Sep. 1956.

JOHNSTON, D.G. Cytoplasmic:nuclear ratios in the cytological diagnosis of cancer. **Cancer**, New York, v. 5, n.5, p. 945-949, Sep. 1952.

JONES, A.C. et al. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 77, n. 1, p. 95-99, Jan. 1994.

KAHN, M.A. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and ThinPrep. **J Tenn Dent Assoc.**, Nashville, v. 81, n. 1, p. 17-20, 2001.

KIEHL, R. et al. Analysis of DNA ploidy heterogeneity in prostate cancer. **Braz J Urol.**, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, p.29-31, Jan-Feb. 2000.

KOMITOWSKI, D.D. et al. Subclinical human immunodeficiency virus-related changes in oral mucosa shown by image analysis of tongue smears. **Am J Clin Pathol.**, Philadelphia, v.100, n. 4, p. 433-438, Oct. 1993.

KUJAN, O. et al. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. **Cochrane Database Syst Rev.**, Chichester, v.3: CD004150. Review, Jul. 2006.

LUNDGREN, J. et al. Exfoliative cytology in laryngology: comparison of cytologic and histologic diagnoses in 350 microlaryngoscopic examinations - a prospective study. **Cancer**, New York, v. 47 n. 6, p. 1336-1343, Mar. 1981.

MARAKI, D. et al. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus. **J Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v.35, n. 4, p. 227-232, Apr. 2006.

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

MIGLIORATI, C.A.; JONES, A.C.; BAUGHMAN, P.A. Use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral hairy leukoplakia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v.76, n. 6, p. 704-710, Dec. 1993.

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.

MONTGOMERY, P.W. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. **J Dent Res.**, Chicago, v.30, n. 1, p. 12-18, Feb. 1951.

MONTGOMERY, P.W.; VON HAAM, E. A study of the exfoliative cytology of oral leucoplakia. **J Dent Res.**, Chicago, v. 30, n.2, p. 260-264, Apr. 1951a.

MONTGOMERY, P.W.; VON HAAM, E. A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa. **J Dent Res.**, Chicago, v.30, n. 3, p. 308-313, Jun. 1951b.

NAVONE, R. et al. Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. **Minerva Stomatol.**, Torino, v.53, n. 3, p. 77-86, Mar. 2004.

NEHER, A. et al. High-resolution image cytometry on smears of normal oral mucosa: a possible approach for the early detection of laryngopharyngeal cancers. **Head Neck.**, New York, v. 26, n. 8, p. 694-700, Aug. 2004.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.**, New York, v. 52, n.4, p. 195-215, Jul-Aug. 2002.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W. Evidence of field change in oral cancer. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, Edinburgh, v. 28, n. 6, p. 390-392, Dec. 1990.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; WIGHT, A.J. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. **J Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v. 26, n.5, p. 201-205, 1997.

PEKTAS, Z.Ö. et al. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. **J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v. 64, n.4, p. 628-635, 2006.

PEREIRA-PINTO, L. et al. **Biópsia e processamento laboratorial.** In: **Patologia Básica: Sinopse.** Natal: EDUFRN, p.19-35, 1997.

PEREIRA, S.M.M. et al. Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 35-39, 2003.

POATE, T.W. et al. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 829-834, Sep. 2004.

POTTER, T.J.; SUMMERLIN, D.J.; CAMPBELL, J.H. Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. **J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v. 61, n. 6, p. 674-677, Jun. 2003.

RADOS, P.V. et al. Citologia esfoliativa da cavidade oral. **Rev Fac Odontol.**, Porto Alegre, v. 40, n. 1, p. 52-56, set. 1999.

RAIMONDI, A.; CABRINI, R.; ITOIZ, M.E. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. **J Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 227-231, Apr. 2005.

RAMAESH, T. et al. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 83-86, Feb. 1998.

RAMAESH, T. et al. The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. **J Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v.28, n. 9, p. 385-388, Oct. 1999.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Med.**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

REMMERBACH, T.W. et al. Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. **Mund Kiefer Gesichtschir.**, Berlin, v. 8, n.4, p. 229-236, Jul. 2004.

ROSS, J.S. et al. DNA ploidy and cell cycle analysis in breast cancer. **Am J Clin Pathol.**, Chicago, v. 120, suppl:S72-84, Dec. 2003.

SANDLER, H.C. Cytological screening for early mouth cancer. **Cancer**, New York, v.15, n. 6, p. 1119-1124, Nov.-Dec. 1962.

SCHEIFELE, C. et al. The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. **Oral Oncol.**, Oxford, v.40, n. 8, p.824-828, Sep. 2004.

SCIUBBA, J.J. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v.130, n. 10, p. 1445-1457, Oct. 1999.

SCULLY, C.; PORTER, S. ABC of oral health. Oral cancer. **BMJ**, London, v. 321, n. 7253, p. 97-100, Jul. 2000.

SCULLY, C.; SÜDBO, 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.

SHAPIRO, B.; GORLIN, R. An analysis of oral cytodiagnosis. **Cancer**, New York, v. 17, n.11. p. 1477-1479, Nov. 1964.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, Washington, v.274, n. 5293, p. 1672-1677, 1996.

SHIRATA, N.K. et al. Nuclear DNA content analysis by static cytometry in cervical intraepithelial lesions using retrospective series of previously stained PAP smears. **Adv Clin Path.**, Udine, v. 5, n. 3, p. 87-91, Jul. 2001.

STEDMAN, T.L. **Dicionário médico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1017p.

STRAUSS, B.S. Frameshift mutation, microsatellites and mismatch repair. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 437, p. 195-203, Nov. 1999.

TAURINES, N.G. **Estudio del ADN nuclear mediante citometria de imagen en los tumores vesicales superficiales. Su valor predictivo con respecto a la recidiva tumoral.** 2002. 178p. TESI, Ciències de la Salut, Departament de Cirurgia, Universitat Autònoma de Barcelona, 2002.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal:** Desenvolvimento, Estrutura e Função. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2001. 439 p.

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.

WHEELESS, L.L. The clinical utility of DNA cytometry. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 677, p. 82-85, Mar. 1993.

WIED, G.L. et al. Compendium on quality assurance, proficiency testing and workload limitations in clinical cytology. **Tutorials of Cytology**, Chicago, p. 170-188, 1995.

WRUBEL, G.J.; SCOPP, I.W. A study of the exfoliative cytology of the hard palate and buccal mucosa following cessation of smoking in previous smokers. **J Dent Res.**, Chicago, v. 40, n. 2, p. 341-345, Mar-Apr. 1961.

ANEXOS

## ANEXO A

Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

**Porto Alegre 25 de novembro de 2005**

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0135/05

**Intitulado:** *Acurácia das técnicas de papanicolaou e feulgen no diagnóstico de atipias celulares em citologias esfoliativas de lesões da mucosa bucal*

**do(a) aluno(a):** *Alexandre Futterleib*

**Programa de:** *Estomatologia Clínica*

**do curso de:** *Estomatologia Clínica*

**Nível:** *Doutorado*

**Orientado pelo(a):** *Profa. Dra. Karen Cherubini, Co-orientador Prof. Vínicius Duval da Silva*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 25 de novembro de 2005.

**Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

## ANEXO B

## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 383/06-CEP

Porto Alegre, 10 de abril de 2006.

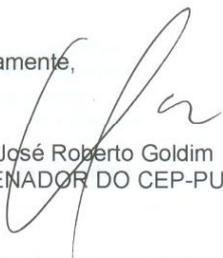
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou seu protocolo de pesquisa registro 06/03070, intitulado: "Acurácia das técnicas de papanicolau e feulgen no diagnóstico de atipias celulares em citologias esfoliativas de lesões da mucosa bucal".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Alexandre Futterleib  
N/Universidade

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **ACURÁCIA DAS TÉCNICAS DE PAPANICOLAOU POR CITOMORFOLOGIA E DE FEULGEN POR CITOMETRIA DIGITAL NO DIAGNÓSTICO DE ATÍPIAS EM EXAMES CITOPATOLÓGICOS DA MUCOSA ORAL**

O método mais utilizado para diagnóstico de lesões bucais é a biópsia, que é a remoção cirúrgica parcial ou total da lesão, entretanto há um método menos invasivo e menos traumático que pode auxiliar no diagnóstico de lesões bucais, este método é chamado de citologia esfoliativa. O objetivo deste trabalho é analisar as células descamadas da mucosa oral para identificar alterações.

Essa pesquisa nos ajudará na investigação de um exame mais fácil de realizar para detecção de possíveis alterações de comportamento nas células da cavidade oral.

O Sr.(a) é portador(a) de uma lesão oral que apresenta indicação de biópsia. Antes do procedimento cirúrgico será coletado material da sua boca por meio de uma escova macia, que será delicadamente friccionada contra a mucosa para obtenção de células descamadas, após o material será avaliado em laboratório.

Não há riscos, pois os procedimentos serão realizados de acordo com as normas de biossegurança.

Declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e obrigação, sobre os objetivos e justificativa da pesquisa bem como dos procedimentos a que serei submetido.

Fui igualmente informado (1) da garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; (2) da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu tratamento; (3) da segurança de que não serei identificado, e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade.

O pesquisador responsável por esse projeto é Alexandre Futterleib, tendo este documento sido revisado e aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 25/11/2005.

Para qualquer esclarecimento ou dúvidas, antes e durante a pesquisa, entre em contato com o pesquisador Alexandre Futterleib, nos telefones 51-30192866, 51-30284630, 51-96946590 ou e-mail [alex.futter@gmail.com.br](mailto:alex.futter@gmail.com.br)

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que, após ler as informações acima e estar suficientemente esclarecido(a) estou plenamente de acordo com a realização do estudo. Assim, garanto minha colaboração e autorizo a minha participação, sendo responsável por ela.

DATA:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ASSINATURA:

\_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

## Etapas para o processamento das lâminas de Papanicolaou

Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Água deionizada	10 imersões
Água deionizada	10 imersões
Hematoxilina	3 minutos
Água deionizada	20 imersões
Blueing bath	20 imersões
Água deionizada	20 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Orange G	1 minuto
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Eosina-65	5 minutos
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 95%	10 imersões
Etanol 100%	10 imersões
Etanol 100%	10 imersões
Etanol 100%	10 imersões
Xileno	10 imersões
Xileno	10 imersões
Montar lâmina e lamínula com Entellan®	

## APÊNDICE C

## Etapas para o processamento das lâminas de Feulgen

HCl (reativo 1)	50 minutos
Água destilada	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Reativo de Schiff (reativo 2) a temperatura ambiente	60 minutos
Solução de dissulfito de sódio	3 minutos
Solução de dissulfito de sódio	3 minutos
Água destilada	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Etanol 50%	1 minuto
Etanol 70%	1 minuto
Etanol 80%	1 minuto
Etanol 99%	1 minuto
Xileno	1 minuto

Montar lâmina e lamínula com Entellan<sup>®</sup>

Procedimento à temperatura ambiente de 22 °C(±0,5°C).

