FRANCISCO OCTÁVIO TEIXEIRA PACCA

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E DOS ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NA QUEILITE ACTÍNICA CRÔNICA

São Paulo

2007

Francisco Octávio Teixeira Pacca

Estudo da prevalência do papilomavirus humano e dos aspectos clínicos e histológicos na queilite actínica crônica

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Sub-área: Semiologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Marcucci

São Paulo

2007

Pacca FOT. Estudo da prevalência do papilomavírus humano e dos aspectos clínicos e histológicos na queilite actínica crônica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

BANCA EXAMINADORA

1) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____. Assinatura:_____

2) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____. Assinatura:_____

3) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____. Assinatura:_____

4) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____. Assinatura:_____

5) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____. Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco Antônio Amaral Pacca e Maria do Socorro Teixeira Pacca, como reconhecimento pela imensa dedicação, amor e atenção que recebi em todas as etapas da vida. Aproveito para registrar toda a minha gratidão pelo sacrifício e renúncia dispendidos por vocês em todos estes anos, zelando pela minha educação, crescimento e formação.

Ao meu irmão, Marcelo Teixeira Pacca,

com amor e muito orgulho por sua sensibilidade, inteligência e amadurecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Gilberto Marcucci**, agradeço pela oportunidade, atenção, compreensão e paciência, oferecidos desde os tempos de estagiário da disciplina de Semiologia.

Ao **Prof. Dr. Artur Cerri**, responsável pelo início e pela condução da minha carreira acadêmica, agradeço com muito entusiasmo todas as oportunidades, orientações, ensinamentos e atenção que este fraterno amigo sempre me proporcionou.

Ao amigo e irmão, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Xavier Ribeiro da Silva**, agradeço por toda a ajuda, paciência, generosidade, disponibilidade e cumplicidade dispendidas diariamente por você em todos estes anos de convivência.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, agradeço a oportunidade de utilizar o laboratório de biologia molecular da Faculdade de Odontologia como também toda sua atenção no esclarecimento e orientação durante a fase laboratorial deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Spinelli Silva**, meu orientador no mestrado e responsável pela minha iniciação no programa de pós-graduação, agradeço a amizade a confiança e todo o aprendizado adquirido nestes anos de convivência.

Ao **Prof. Dr. Paulo José Bordini**, Diretor do curso de Odontologia da UNISA, agradeço a amizade e a confiança depositada, proporcionando tranqüilidade para a conclusão deste doutoramento.

Aos Professores da Disciplina de Semiologia da UNISA e UCCB: **Prof. Dr. Artur Cerri, Prof. Dr. Paulo José Bordini, Prof. Dr. Carlos Eduardo Ribeiro da Silva, Prof. Henrique Prats, Profa. Daniela Marti** e **Prof. Luiz Fernando Rodrigues Innocencio,** por todo o suporte de trabalho oferecido nos momentos em que a minha atenção era solicitada pelas obrigações e afazeres do meu doutorado.

Ao **Prof. Plínio Santos**, agradeço por toda a sua atenção e paciência no esclarecimento de dúvidas e leitura de lâminas. Seu profundo conhecimento e generosidade no ensino foram muito importantes na finalização deste trabalho.

Aos Profs e colegas de pós-graduação **Lineu Perrone Júnior** e **Tatiana Libório**, agradeço toda a ajuda e orientação oferecida no laboratório de biologia molecular.

Aos estagiários da disciplina de Semiologia, **Cd. Rodrigo Cerri**, **Cd. Fábio MasuKo** e **Cd. Eleonora Scavassini**., agradeço pelo auxilio, colaboração na coleta de material, fotografias, orientações com pacientes, seleção de casos etc.

A minha secretária **Marta Campos** e minhas auxiliares **Luciana Meireles**, **Alessandra Lemes** e **Cristiane dos Anjos**, pela dedicação, fidelidade e apoio recebidos em todos os momentos.

A secretária da Disciplina de Semiologia **Iracema Mascarenhas Pires** e as técnicas **Maria Aparecida Israel** e **Aparecida Ferreira Andrade**, agradeço a atenção e a ajuda desde o meu ingresso no programa de pós-graduação.

A bibliotecária **Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro**, agradeço pela solidariedade, critério, boa vontade e agilidade na revisão bibliográfica desta tese.

Pacca FOT. Estudo da Prevalência do papilomavírus humano e dos aspectos clínicos e histológicos na queilite actínica crônica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Os papilomavírus humanos (HPVs) oncogênicos são importantes agentes na etiologia do câncer ginecológico e atualmente tem sido relacionados também a algumas lesões cancerizáveis e a alguns tipos de cânceres de boca. Com o objetivo de avaliar a relação entre os HPVs e um tipo de lesão cancerizável de boca que acomete os lábios chamada queilite actínica crônica (QAC), foram avaliados e considerados aptos para a pesquisa 29 pacientes portadores de QAC. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi utilizada para detectar a presença do HPV em amostras de tecido fresco, provenientes de lábios doentes onde todos os casos apresentaram resultados negativos. A QAC ocorreu em 100% nos indivíduos da raça branca, em 19 homens e 10 mulheres e na idade média de 56,14 anos. Foram avaliados também os aspectos clínicos e histológicos da QAC sendo encontrados 14 casos de atipia epitelial discreta (48,27%), 10 casos de atipia epitelial moderada (34,49%) e 5 casos de atipia epitelial severa (17,24%). Através de análise estatística concluímos que clinicamente a presença de áreas leucoplásicas e o tempo de evolução da lesão superior a 5 anos estão diretamente relacionados aos casos de atipias epiteliais mais graves. O hábito de fumar e de beber parecem contribuir, mas não obtiveram resultados estatisticamente significativos ao aparecimento da QAC.

Palavras-chave: queilite - papiloma - reação em cadeia da polimerase - vírus oncogênicos.

Pacca FOT. Study on the prevalence of human papillomavirus and clinical and histological aspects in chronic actinic cheilitis [PhD thesis]. Sao Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The oncogenic human papillomaviruses (HPVs) are important agents in the etiology of gynecological cancer and have been recently related to some premalignant lesions and to some types of mouth cancer. In order to evaluate the relation between HPVs and one type of precancerous lesion that affects the lips called chronic actinic cheilitis (CAC), 29 CAC patients were assessed and considered eligible for the study. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of HPV in fresh tissue samples of affected lips. All results were negative. All CAC patients were Caucasian, 19 males and 10 women, mean age of 56.14 years. The clinical and histological aspects of CAC were also assessed - there were 14 cases of discreet (48.27%), 10 cases of moderate (34.49%) and 5 cases of severe epithelial atypia (17.24%). By statistical analysis we concluded that, clinically, the presence of leukoplastic areas and progression of the lesion for over five years are directly related to more severe epithelial atypia. Smoking and drinking habits seem to contribute to the condition but achieved no statistical significance regarding onset of CAC.

Key-words: cheilitis - papilloma - polymerase chain reaction - oncogenic virus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 8

2 REVISÃO DA LITERATURA..... 11

2.1 Queilite Actínica Crônica..... 11

2.2 QAC e o Câncer de lábio..... 12

2.3 HPV..... 15

3 PROPOSIÇÃO..... 22

4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS..... 23

4.1 Casuística..... 23

4.2 Métodos..... 23

5 RESULTADOS..... 35

5.1 Aspectos epidemiológicos..... 35

5.2 Aspectos clínicos..... 39

5.3 Aspectos histológicos..... 42

5.4 Análise estatística dos resultados (clínicos, histológicos e epidemiológicos)..... 45

5.5 Exame de PCR..... 50

6 DISCUSSÃO..... 52

7 CONCLUSÕES..... 58

REFERÊNCIAS..... 59

APÊNDICE..... 68

ANEXOS..... 72

1 INTRODUÇÃO

O papilomavirus humano (HPV) é um vírus do gênero Papillomavirus, pertencente a família Papillomaviridae, com mais de 120 tipos identificados, alguns deles responsáveis por verrugas vulgares, anogenitais e ainda papilomas da cavidade bucal e da nasofaringe (SILVA, 2006).

Sua principal via de transmissão é a sexual, tanto em homens quanto em mulheres, mas existe ainda a possibilidade de transmissão por outras vias como a sanguínea, pelo canal do parto, pelo beijo e por objetos contaminados.

Estima-se que de 10 a 40% da população sexualmente ativa, são infectados por um ou mais tipos de HPV, sendo que a maior parte destas lesões é transitória. A sua presença na gênese do câncer cervico-uterino está bem estabelecida e demonstrada pelos inúmeros trabalhos de pesquisa publicados (DUNNE; MARKOWITZ, 2006).

Na mucosa bucal o HPV está associado principalmente ao papiloma e mais raramente a presença de verrugas vulgares e condiloma acuminado. Alguns autores tem associado a presença de HPV, particularmente os subtipos 16 e 18 como fatores contribuintes para o aparecimento do carcinoma espino-celular (CEC) de boca (KOPPIKAR, VILLIERS; MULHERKAR, 2005).

Contudo, o HPV não atua isoladamente na oncogênese, outros fatores, tais como: estado imunológico do hospedeiro, estado nutricional, predisposição genética, exposição solar, uso de fumo e álcool atuam em conjunto, favorecendo

a instalação da neoplasia. É importante salientar que a associação destes fatores com os subtipos de HPV denominados “alto risco” é de extrema importância na gênese das neoplasias malignas.

O estudo das lesões cancerizáveis, do câncer de boca e seus fatores desencadeantes, vem sendo cada vez mais discutidos, sabemos que no Brasil, o tipo de câncer de boca mais freqüente é o CEC de lábio (BRASIL, 2001) e a sua relação com a Queilite Actínica Crônica (QAC) já esta plenamente comprovada. (HUBER; TEREZHALMY, 2006)

Clinicamente, a QAC ocorre predominantemente em indivíduos acima de quarenta anos, leucodermas, do sexo masculino e que se expõe continuamente aos raios solares, como agricultores, marinheiros, pescadores, guardadores de carro, operários de construção e outros. A sua localização mais freqüente é o lábio inferior, pois este está anatomicamente mais exposto à ação maléfica dos raios solares (PICASCIA; ROBINSON, 1987).

Clinicamente o lábio com QAC pode apresentar as seguintes alterações: descamações, ressecamento, fissuras, adelgaçamento do vermelhão, eritemas, edema, áreas esbranquiçadas, falta dos limites na linha de transição entre vermelhão e pele, crostas, perda da elasticidade, ulcerações e sangramento (DUFRESNE Jr.; CURLIN, 1997).

A radiação solar é o agente etiológico da QAC e do câncer de lábio, muito embora se saiba que a probabilidade de malignização pode ser mais elevada, quando associada a outros fatores carcinogênicos, entre os quais o álcool e o fumo, nas suas mais variadas formas (DOUGLAS; GAMMON, 1984).

Lindqvist, Pukkala e Teppo (1979) e Lindqvist, Teppo e Pukkala (1981), descrevem o câncer de lábio e classificam os fatores de risco em endógenos (xeroderma pigmentoso, avitaminose e imunossupressão) e fatores exógenos (radiação solar, tabaco, clima seco, álcool, infecção herpética recorrente, infecções por HPV e traumas). Alguns estudos tentam relacionar a ação dos oncovírus ao câncer de lábio (PARK, 1985). Scully (1993) não exclui a necessidade de estudos mais sofisticados através da biologia molecular no que diz respeito ao câncer de lábio e o HPV. Observou-se que a literatura científica carece de trabalhos que esclareçam mais detalhadamente uma eventual relação do HPV com as lesões cancerizáveis e especialmente com a QAC, tais fatos nos subsidiam pesquisar a associação do HPV e a QAC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queilite Actínica Crônica

A queilite actínica crônica foi descrita e considerada como uma lesão cancerizável pela primeira vez, em 1886 por Dubrevil, durante o III Congresso Internacional de Dermatologia, realizado em Londres (SCHWARTZ; STOLL, 1993). Posteriormente, Ayres Jr. (1923), relacionou a etiologia da QAC com a exposição solar. Neste trabalho, foram examinados cinco pacientes provenientes de regiões quentes e secas da Califórnia e que desenvolviam atividades sob o sol constante, foram observadas as características clínicas das lesões bem como a prevenção de possível malignização.

Como já comentado no capítulo anterior, Dufresne Jr. e Curlin (1997), descreveram as possíveis alterações clínicas para a QAC: edema, eritema, ressecamento, fissuras, descamações, falta de evidências dos limites entre vermelhão e pele, ulcerações, sangramentos, áreas leucoplásicas, crostas, adelgaçamento de vermelhão e perda da elasticidade labial. Neste mesmo trabalho, Dufresne Jr. e Curlin (1997), estudaram os estágios clínicos da QAC descrevendo o eritema e o edema como as primeiras manifestações, enquanto nos estágios mais avançados foram observadas a presença de áreas leucoplásicas e as ulcerações.

A QAC pode apresentar as seguintes alterações histológicas: polaridade nuclear alterada, relação núcleo citoplasma aumentada, hiperplasia das células basais, núcleos hipercromáticos, mitoses anormais, ortoqueratose, paraqueratose, maturação epitelial alterada, coesão celular reduzida, degeneração do colágeno (elastose), infiltrado inflamatório, ulceração, vasodilatação, acantose, e atrofia epitelial (CAVALCANTE, 2000).

2.2 QAC e o câncer de lábio

O primeiro trabalho científico a relacionar o aspecto clínico com o quadro histológico da QAC e do câncer de lábio foi realizado por Nicolau e Ballus (1964). Os autores estudaram 542 pacientes com QAC e 76 pacientes com câncer de lábio, chegando a conclusão que a imensa maioria dos cânceres de lábio, é precedida de queilite actínica crônica; daí a classificação proposta por Cataldo e Doku (1981), como sendo a QAC uma lesão com alto potencial de transformação maligna.

Alguns trabalhos na literatura tentam quantificar o percentual de malignização da QAC para o CEC, estes resultados variam de 12% a 20% (KOOPMANN Jr.; COULTHARD, 1982; SCHWARTZ; STOLL, 1993; STANLEY; ROENIGK, 1988; WARNOCK; FULLER JR.; PELLEU JR, 1981; WURMAN; ADAMS; MEYERHOFF, 1975). De qualquer forma o percentual é preocupante e coloca o diagnóstico precoce como fundamental. Huber e Terezhalmy (2006) descrevem que o potencial de malignação pode inclusive ultrapassar os 20% e enfatiza a importância de biopsiar todos os casos de QAC.

Outra característica do CEC de lábio é que seu aparecimento acomete principalmente indivíduos leucodermas acima da quinta década de vida (ANDERSON, 1971; BAKER; KRAUSE, 1980; LORÉ JR. et al., 1979; MOLNÀR; RÓNAY; TAPOLCSÁNYI, 1974; WURMAN; ADAMS; MEYERHOFF, 1975), submetidos a fatores desencadeantes.

A radiação solar é considerada o principal fator desencadeante do CEC de lábio inferior (ANDERSON, 1971). Os danos induzidos pela radiação ultravioleta B (UVB) se devem a sua intensa absorção pelos ácidos nucleicos. A maior parte dos

danos é causada por alterações que impedem a transcrição da informação genética para o ácido ribonucleico mensageiro (RNA m) e bloqueiam o mecanismo de duplicação do ácido desoxirribonucleico (DNA). De forma bastante simplificada, as reações fotoquímicas que alteram o DNA podem ocorrer na estrutura primária dos nucleotídeos ou no rompimento de hélices e pontes de hidrogênio. Estas alterações comumente provocam a geração de produtos que podem bloquear, ainda que parcialmente, as enzimas de separação dos ácidos nucleicos (SCULLY, 1995).

Outros agentes desencadeantes do câncer de lábio inferior são citados na literatura há bastante tempo, dentre eles o tabaco e o álcool (BAKER; KRAUSE, 1980; MOLNÀR; RÓNAY; TAPOLCSÁNYI, 1974;).

Castro et al. (1999), desenvolveram um estudo estatístico do CEC de lábio inferior, onde foi concluído que 72,6% dos pacientes eram tabagistas e/ou etilistas.

No tabaco e na fumaça que deles se desprende, podem ser identificadas cerca de 4.700 substâncias tóxicas. Dentre estas, 60 apresentam ação carcinogênica conhecida, destacando-se os hidrocarbonetos policíclicos e as nitrosaminas específicas do tabaco. Outras substâncias carcinogênicas também são detectadas no tabaco e na sua fumaça, dentre elas, elementos radioativos como o carbono 14 e o polônio 210, como também resíduos de agrotóxicos utilizados na lavoura do tabaco como o diclorodifeniltricloretano (DDT) e outros (BRASIL, 2001).

Além da ação maléfica das substâncias cancerígenas, a exposição contínua ao calor desprendido pela combustão do fumo potencializa as agressões sobre a mucosa e semimucosa, pois sabemos que a temperatura na ponta do cigarro varia de 835 a 884ºC (BRENNAN; BOYLE; KOCK, 1995).

Sabe-se que o álcool se apresenta como agente promotor do câncer, interferindo principalmente na velocidade e na quantidade de reparação dos defeitos do DNA, induzidos pelos carcinógenos verdadeiros como o tabaco e a radiação.

Segundo estudos do Ministério da Saúde em 1996, o álcool pode agir no desenvolvimento do câncer das seguintes formas:

- Aumento de permeabilidade das células da mucosa e semimucosa aos agentes carcinogênicos, devido ao efeito solubilizante do álcool.
- Agressão celular produzida pelos metabólitos do etanol, os chamados aldeídos.
- Deficiências nutricionais secundárias ao consumo crônico do próprio álcool.
- Diminuição dos mecanismos locais de defesa.

Segundo o manual de "Detecção de lesões suspeitas de câncer de boca", Instituto Nacional do Câncer (INCA), quando o alcoolismo e o tabagismo se associam, o risco relativo de câncer bucal é potencializado drasticamente, sendo 141,6 vezes maior do que em pacientes que não fumam e não bebem (BRASIL, 1996).

Outro importante fator a ser considerado ao aparecimento do câncer, são as deficiências nutricionais e dietas inadequadas, ricas em fontes formadoras de radicais livres, pois estes também são responsáveis por alterações no DNA.

Sabe-se hoje que uma alimentação rica em proteínas A, E, C e B2 e alguns minerais como o cálcio, zinco e selênio, são considerados antagonistas de radicais livres, chamados de antioxidantes (WINN, 1995).

Para Lindqvist, Teppo e Pukkala (1981), a dieta nutricional pobre em betacaroteno (precursor da vitamina A) associada à exposição solar e ao fumo, também representa um importante fator a ser considerado.

Garewal (1993) verificou um baixo risco de desenvolvimento de câncer de boca entre indivíduos que consumiam altos índices de frutas cítricas e vegetais ricos em beta-caroteno. Por estes motivos, é incentivado cada vez mais o hábito do consumo de frutas e vegetais (AGUILAR et al., 2006).

2.3 HPV

O HPV é composto por um genoma de 8000 pares de bases de DNA de cadeia em dupla fita, envolvido por um capsídeo externo protéico não envelopado de 55 nanômetros (nm) de diâmetro (Figura 2.1).

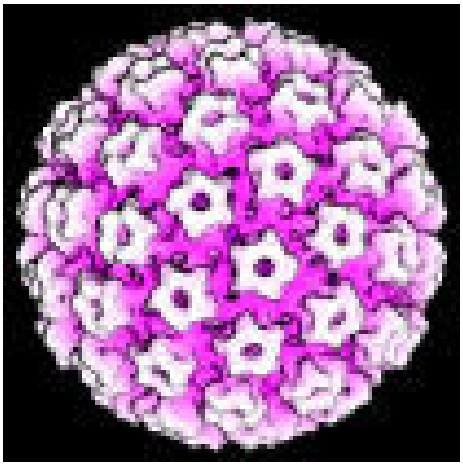

Figura 2.1 - Ilustração demonstrando a morfologia do HPV (observar as irregularidades de relevo da cápsula protéica do HPV). Fonte: www.cdcpin.org/images/hpv.jpg

O genoma do HPV é dividido em três regiões: E (*early*) e L (*late*) e LCR (*long control region*). O segmento E representa 45% do genoma, o segmento L representa 40% do genoma e entre os segmentos E e L existe a região LCR que representa 15% do genoma e contêm elementos regulatórios (Figura 2.2). (SYRJANEN et al., 1983).

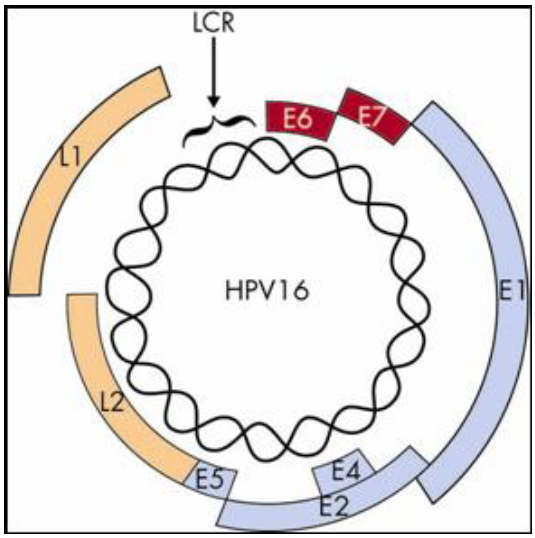

Figura 2.2 - Ilustração demonstrando o genoma do HPV 16 (observar o posicionamento dos genes E1,E2,E4,E5,E6,E7, L1, L2 e LCR).
Fonte: http://www.merckmedicus.com/ppdocs/us/hcp/diseasemodules/hpvd/images

A região E1 e E2 contêm genes envolvidos na replicação viral, E4 na maturação e liberação de partículas virais, E6 e E7 na imortalização. As regiões L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo.

O potencial oncogênico do HPV está relacionado principalmente aos produtos dos genes E6 e E7, pois estes interagem e inativam proteínas celulares derivadas dos genes supressores de tumor p53 e pRb, além de promover a degradação destes genes, bloqueando a sua função (SONNEX, 1998). O resultado da penetração do vírus é a imortalização das células em que o HPV foi integrado. Estas células exibem morfologicamente figuras de mitoses anormais, pleomorfismo nuclear e alteração arquitetural dos cromossomos (SONNEX, 1998; SYRJANEN et al., 1983).

Estas células só passam a ser geradoras de tumor quando os genes transformados E6 e E7 são expostos a oncogenes celulares ativados. O HPV não atua isoladamente na oncogênese; outros fatores tais como estado imunológico do hospedeiro, deficiência nutricional, radiações solares, uso de fumo e álcool atuam em conjunto, favorecendo a instalação da neoplasia maligna.

A infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente na população adulta, sendo inegável sua íntima relação com o aparecimento das neoplasias malignas uterinas, pois segundo alguns autores, podem estar presentes em até 100% das pacientes portadoras de câncer de colo de útero (zur HAUSEN, 2000).

Tider, Parsons e Bimbi (2005) analisaram os hábitos sexuais e a prevalência do HPV em casais e concluiu a possibilidade de infecção pelo HPV através do sexo oral.

Está sendo introduzida no mercado terapêutico internacional a vacina para o HPV, já aprovada pelo *US Food and Drug Administration* (FDA). Esta vacina tem o objetivo de proteger o paciente principalmente dos HPVs 16 e 18 (DUNNE; MARKOWITZ, 2006).

Infelizmente a literatura ainda é pobre em relação ao HPV e a iniciação e progressão das neoplasias bucais, além de seus resultados serem muitas vezes conflitantes.

Tal discrepância pode ser atribuída principalmente a variedade de metodologias aplicadas nas pesquisas e na diversidade dos grupos epidemiológicos examinados.

O diagnóstico da presença do HPV nos tecidos pode ser feito de diversas formas: captura híbrida, hibridização *in situ* e reação em cadeia pela polimerase (PCR), sendo este último método o mais indicado, pois além de ser o mais sensível, é capaz de identificar o subtipo do vírus e conseqüentemente o seu risco, além de ter a capacidade de amplificar quantidades reduzidas de DNA viral. Bastam apenas 10 cópias do vírus para que o processo de PCR possa amplificá-las e permitir sua detecção (SILVA, 2006).

Niedobitek, Pitteroff e Herbst (1990) examinaram 28 pacientes com CEC nas tonsilas palatinas e determinaram a presença de HPV em 21,4% dos casos. O método utilizado foi a reação em cadeia pela polimerase (PCR), especificamente para pesquisa do sub-tipo 16.

Nielsen, Norrild e Vedofte (1996) avaliaram através do PCR para o HPV em tecidos parafinados 49 casos de pacientes com lesões cancerizáveis em mucosa oral, sendo 10 casos de eritroplasias, 11 casos de leucoplasias homogêneas, 16 casos de leucoplasias nodulares e 12 casos de eritroleucoplasias, onde concluíram que: o HPV foi encontrado em 62,5% das leucoplasias nodulares, em 50% das eritroplasias, em 45,5% das leucoplasias homogêneas e em 33,5% das eritroleucoplasias. Neste mesmo trabalho, os autores pesquisaram o HPV em mucosa normal de 20 pacientes, e não detectaram a presença do vírus em nenhum caso.

Bouda et al. (2000), examinaram 69 pacientes, sendo 16 pacientes normais (sem a presença de lesões bucais) e os 53 restantes apresentando CEC. Todas as amostras foram submetidas ao método de PCR em tecido fresco, os resultados demonstraram que nenhum dos casos de mucosa bucal normal apresentavam HPV e que 91% dos casos com lesões possuía pelo menos um sub-tipo de HPV considerado de alto risco como o 16/18 ou 33.

Miller e Johnstone (2001), fizeram uma análise retrospectiva de 4680 amostras de tecidos parafinados e frescos, onde obtiveram a ocorrência de HPV em 10% dos casos de mucosa bucal normal, 22,2% nos casos de leucoplasia, 26,2% nos carcinomas intra-epiteliais (CEC *in situ*), 29,5% nos carcinomas verrucosos e finalmente 46,5% nos casos de CEC. Estimaram também a probabilidade de detecção do HPV em lesões leucoplásicas entre duas a três vezes maior que na mucosa normal, enquanto que para o CEC, esta possibilidade aumentaria para aproximadamente 4,7 vezes. Concluindo seu estudo, afirmaram que a presença de HPV, particularmente os subtipos chamados de "alto risco" como o 16, 31, 33, 35, 39, 45 e 52 são fatores importantes a serem considerados na gênese do câncer bucal.

Jimenez et al. (2001) avaliaram um total de 60 pacientes onde 40 possuíam lesões epiteliais benignas (papilomas, condilomas, verrugas vulgares e hiperplasias epiteliais focais) e 20 possuíam as mucosas bucais dentro do padrão de normalidade, todos foram submetidos ao exame de PCR para tecido fresco, onde obtiveram os seguintes resultados: A mucosa normal apresentou ocorrência de HPV em 10% dos pacientes, sendo os subtipos encontrados o 6 e o 16, enquanto que nas amostras dos pacientes com lesão, este percentual chegou a 55% dos casos, encontrando-se além destes sub-tipos o 13 e o 32.

Summersgill et al. (2000), examinaram 333 pacientes normais e encontraram uma prevalência de HPV de 11,1% na mucosa bucal, enquanto que no exame de 202 pacientes com CEC, este percentual chegou a 28,7%. Os subtipos encontrados foram o 16, 18, 31, 33 e 58. Todos os diagnósticos se valeram do exame de PCR em tecidos parafinados.

Lopez-Lizarraza et al. (2000) pesquisaram o HPV em 16 pacientes com CEC na tonsila palatina ou nasofaringe, utilizando para esse fim o exame de PCR em tecido fresco. Como resultado, observaram a presença do HPV em 81,3% dos casos sendo que o sub-tipo 31 estava presente em 84,6% destes casos.

Cao, Zhang ZY e Zhang YX (2000), utilizando o exame PCR em tecido fresco, examinaram a mucosa de 20 pacientes sem nenhuma lesão bucal, onde não foi detectada a presença do HPV em nenhum dos casos. Porém ao analisarem a mucosa bucal de 40 pacientes portadores de CEC, observaram a presença de HPV em 72,5% dos casos, em especial dos subtipos 16 e 18.

Zhang et al. (2004) pesquisaram através de PCR em tecidos parafinados de 73 pacientes portadores de CEC bucal e detectaram a presença do HPV em 74% dos casos. Avaliaram ainda o tecido adjacente ao tumor em 40 pacientes encontrando o vírus em 55% das amostras.

Ibieta et al. (2005) avaliaram amostras de CEC bucal oriundas de blocos de parafina encontrando o HPV em 42% dos casos, com predominância do subtipo 16 (66,6%).

No Japão, Mitsuishi et al. (2005), efetuaram uma pesquisa utilizando a técnica de PCR para o HPV de tecido fresco em pacientes portadores de carcinomas verrucosos de lábio encontrando positividade em 74,8% dos casos. No entanto, Shimizu et al. (2004), investigaram também por PCR para tecido fresco, a presença do HPV em 27 pacientes com CEC de lábio e em 30 pacientes normais, encontrando positividade para o HPV em 18% (cinco casos) dos pacientes com CEC e 33% (10 casos) dos pacientes com lábio normal.

Em um estudo bastante semelhante ao nosso, desenvolvido no Instituto Pasteur em Paris, Makoto et al. (1990), identificaram a presença do HPV pelo exame de PCR em tecido fresco em dois casos de 40 pacientes com QAC (5%) e em um caso de 25 pacientes com CEC de lábio (4%).

Lu, Syrjanen e Havu (1995), pesquisaram o vírus HPV através do PCR em tecidos parafinados em 100 casos de QAC da Universidade de Turku na Finlândia e obtiveram como resultados todos os casos negativos.

Em um interessante estudo na Alemanha, Ostwald et al. (2003), pesquisaram também pela técnica de PCR em tecido fresco a presença do HPV 16 e 18 em 118 casos de CEC, 72 leucoplasias, 12 queilites actínicas crônicas e 65 líquens - plano. Foi verificada a presença dos grupos virais em 43,2% dos CEC, 22,2% das leucoplasias, 25,0% das queilites e 15,4% dos líquens - plano.

É importante ressaltar neste momento, que as infecções por HPV isoladamente não são capazes, por si só, de induzir progressão para neoplasia maligna. De fato, acredita-se hoje que existe a necessidade de outros eventos moleculares para o surgimento do fenótipo invasivo. Assim acreditamos que através da metodologia de biologia molecular muitas dessas questões poderão ser solucionadas.

3 PROPOSIÇÃO

Diante dos diversos estudos que relacionam o HPV ao câncer de boca e sabendo que a QAC se trata de uma lesão cancerizável pouquíssimo estudada no que diz respeito a associação com o HPV, nos motivamos a desenvolver o presente estudo e determinar as seguintes correlações:

- A presença do HPV na QAC e na semi-mucosa labial normal.
- Os graus de atipia celular da QAC com e sem a presença do HPV.
- Os aspectos clínicos da QAC com e sem a presença do HPV.
- Os aspectos epidemiológicos da QAC.

4 CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODO

4.1 Casuística

Foram selecionados para o presente estudo 60 pacientes assim distribuídos:

A. Grupo controle: 30 pacientes sem nenhuma evidência de lesão labial inferior com indicação de tratamento cirúrgico cruento de rotina.

B. Grupo doente: 30 pacientes portadores de QAC no lábio inferior.

Os grupos foram pareados de acordo com gênero, idade e raça.

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação clínica

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico completo e ordenado, composto por anamnese, exame físico extra e intra-bucal realizados pelo autor da pesquisa. Os dados coletados foram passados para a ficha clínica 1, especialmente desenvolvida para esta pesquisa (Apêndice A). Para os casos de paciente com lesão, também era preenchida a ficha clínica 2, aonde eram anotadas todas as características clínicas da lesão (Apêndice B).

Foi apresentada aos pacientes uma ficha de consentimento livre e esclarecido (Apêndice C) com orientações sobre a realização do trabalho. Todos os pacientes tiveram acesso aos resultados e mesmo os que não tiveram interesse em participar desta pesquisa, em nenhuma hipótese foram prejudicados em seus atendimentos de rotina.

O exame clínico e o atendimento dos pacientes foram realizados na clínica de Semiologia da FOUSP e no ambulatório da Disciplina de Semiologia da Universidade Camilo Castelo Branco – UCCB. Aprovado pelos respectivos Comitês de Ética (Anexos A e B).

4.2.2 Critérios adotados para a interpretação da ficha clínica

São considerados fumantes os indivíduos que fumaram regularmente durante alguma época da vida (pelo menos por cinco anos). Mesmo aqueles que abandonaram o vício de fumar. A classificação é feita de acordo com a quantidade de tabaco consumida diariamente, usando-se para tal, o sinal de +, onde cada + equivale a 10 cigarros industrializados de papel, dois cigarros manufaturados de palha, dois charutos ou dois cachimbos fumados. Esta classificação varia de + a ++++ (KOWALSKI, 1989).

O etilista em qualquer época da vida (pelo menos por cinco anos) também foi classificado de + a ++++, relativa a quantidade diária consumida de bebida alcoólica, obedecendo ao seguinte critério: + para cada dose de bebida destilada (50 – 100 ml), ou uma garrafa de cerveja (600 ml), ou meia garrafa de vinho (350 - 375 ml) (KOWALSKI, 1989).

Foram considerados praticantes de sexo oral, os pacientes que responderam positivamente a pergunta e que no item de freqüência relataram no mínimo uma vez por ano. Pois inúmeros trabalhos concluem que o HPV pode permanecer latente nos tecidos epiteliais por períodos indeterminados (WALKER et al., 2005).

4.2.3 Coleta do material

Os pacientes tanto do grupo doente quanto do grupo controle, foram submetidos a anestesia infiltrativa em lábio inferior (região de fundo de sulco vestibular de incisivos inferiores) com lidocaína 2% com vasoconstrictor, a fim de se conseguir anestesia no vermelhão de lábio (semi-mucosa labial). Desta área foi removido de cada paciente um pequeno fragmento de tecido utilizando-se para esse fim um punch número 3 (diâmetro aproximado de 3 mm). O local foi suturado com fio absorvível categute 4-0, para evitar-se a necessidade de remoção da sutura.

O paciente foi orientado quanto à higiene local com clorexidina a 0,12% e uso de analgésicos, caso ocorresse sintomatologia dolorosa no pós-operatório.

O material colhido foi dividido em dois fragmentos, sendo um acondicionado em formol a 10% para realização do exame histopatológico com coloração em hematoxilina e eosina (HE) e o outro num tubo de centrifugação de 1,5 ml (tubo eppendorf) com 10 µl de proteinase K tamponada na concentração 500µg/ml para a realização do exame de PCR.

4.2.4 Exame histopatológico

Os fragmentos de tecido fixados em formol a 10%, foram incluídos em blocos de parafina para confecção de lâminas histológicas coradas pela técnica da hematoxilina e eosina.

4.2.5 Critérios adotados para a interpretação das lâminas histológicas

Os aspectos histológicos das QAC foram interpretados seguindo a classificação de displasia epitelial de Van Der Waal (1986), que analisa os seguintes achados histológicos: 1- relação núcleo citoplasma aumentada, 2 - polaridade nuclear alterada, 3 - hiperplasia das células basais, 4 - núcleos hipercromáticos, 5 - mitoses anormais, 6 - maturação epitelial alterada, 7 - coesão celular reduzida, 8 - queratinização alterada, 9 – nucléolos aumentados e a graduação da atipia sugerida por Bánóczy e Csiba (1976) e oficializada pela *World Health Organization* (WHO, 1978) que classificaram como leve, quando dois achados histológicos estavam presentes; moderada, quando três ou quatro desses achados histológicos eram notados e, severa, quando cinco ou mais achados histológicos estavam presentes. Outros aspectos histológicos estão presentes nos casos de QAC, como: degeneração do colágeno (elastose), infiltrado inflamatório, vasodilatação, acantose e atrofia, mas estas características não são levadas em consideração por Van Der Waal (1986) em sua classificação.

No que diz respeito a avaliação de possíveis infecções virais pelo HPV, em nossos pacientes, foi observada com muita atenção a morfologia celular do

epitélio analisando os aspectos de possíveis coilocitoses (vacúolos citoplasmáticos com núcleos picnóticos e extensos halos claros, displasias nucleares, binucleação e imaturação atípica) (DUDDING; SUTTON; LANE, 1996).

4.2.6 Digestão protéica e extração do DNA

Os tubos de centrifugação de 1,5 ml contendo 10 µl de proteinase K tamponada foram submetidos a 55º C em "banho Maria" e constante movimentação por 24 horas em equipamento apropriado. Durante três dias, foram acrescentadas mais 10 µl de proteinase K (numa concentração de 250 µg/ml) de 24 em 24 horas, até a total digestão da peça. A inativação da proteinase K foi efetuada no quinto dia levando os frascos a temperatura de 95ºC por 10 minutos.

A extração do DNA foi obtida adicionando-se 200 µl de acetato de amônio 3M para a precipitação da proteína. O tubo foi agitado em equipamento vibratório Vortex por 20 segundos, posteriormente incubado em gelo durante 5 minutos e centrifugado a 15.000 rpm por 3 minutos. A proteína precipitada era observada como um corpo no fundo do tubo, o sobrenadante contendo DNA era transferido para outro tubo eppendorf de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600 µl de isopropanol e 1 µl de glicogênio em cada tubo que depois de homogeneizado era centrifugado a 15.000 rpm (rotações por minuto) por cinco minutos. Desprezado o sobrenadante, o corpo de fundo do DNA era lavado com 600µl de etanol 70% e centrifugado a 16.000 rpm por um minuto. Desprezado também o sobrenadante e após a evaporação do etanol 70% a temperatura ambiente, o corpo de fundo (DNA) era dissolvido em 30µl de tampão de re-suspensão e mantido a -20°C até a quantificação e utilização para o PCR.

4.2.7 Reação de PCR para o HPV

Utilizamos para detecção do HPV um Kit pré-fabricado da empresa Biotools chamado Biopap que além de detectar a presença do vírus, determina pelo peso molecular se o HPV em questão é do grupo oncogênico (subtipos virais que possuem 250 pares de base (pb), HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58) ou não oncogênico (subtipos virais que possuem 450 pares de base (pb), HPV 6, 11, 13, 30, 32, 34, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 e 69).

Todos os passos a seguir são recomendados pelo fabricante para utilização do Kit.

Descongelamos o DNA e os reagentes do Kit por 10 minutos a temperatura ambiente e em outro eppendorf colocamos:

0,5µl de Taq DNA polimerase

18,75 µl de HPV *reation mixture*

0,75 µl de MgCl2

3,0 µl de H2O bidestilada (água Mili-Q)

Nestas proporções, chegamos a 23 µl em cada frasco, com o objetivo de totalizarmos 25 µl em cada frasco e finalizar a preparação do material, foram efetuados os seguintes procedimentos: para o controle positivo, acrescentamos 2µl do controle do Kit; para o controle negativo, acrescentamos 2µl de água Mili-Q e para as amostras testadas, acrescentamos 2µl de DNA das amostras. Colocamos os eppendorfs na cicladora, respeitando os seguintes ciclos:

Primeiro ciclo: 94°C por 5 minutos

Trinta e cinco ciclos: 94°C por 30 segundos

55°C por 1 minuto

72° C por 1 minuto

Último ciclo: 72°C por 10 minutos

Manutenção: 4°C até a retirada dos tubos

Para submeter as amostras na cuba de eletroforese efetuamos os seguintes preparativos: preparação do gel de agarose 2% utilizando para cada 80ml de tampão eletrolítico (TBE), 1,6 g de agarose. Aquecemos a mistura por 1 minuto em forno de microondas na temperatura máxima e posteriormente acrescentamos 3,0µ de brometo de etídio. Esta solução era então colocada na cuba de eletroforese com os pentes posicionados de tal maneira que decorridos 30 minutos o gel estava preparado e com os devidos casulos (marcações) estabelecidos pelos pentes.

Com o gel preparado, retirou-se os pentes, reposicionando de maneira apropriada na cuba de eletroforese e cobrindo com TBE (tampão eletrolítico).

Cada amostra analisada pelo exame de PCR continha 10µl de DNA que eram acrescidos 1µl de azul de bromoferol. Estas soluções eram colocadas nos respectivos casulos (marcações) do gel de agarose e submetidas a eletroforese por 30 minutos a 90 volts e posterior análise dos resultados em transluminador com lâmpada ultra-violeta.

4.2.8 Critérios adotados para a interpretação dos resultados do PCR para o HPV

Através da leitura das bandas iluminadas pelo transluminador com lâmpada ultravioleta, foi possível determinar a amplificação ou não do DNA do vírus HPV nas amostras. Usamos como referência um marcador de peso molecular (*Low DNA Mass Ladder, Invitrogen*), um controle positivo que mostrava as bandas iluminadas na região de 250pb para o grupo oncogênico e 450 pb para o grupo não oncogênico como também um controle negativo (Figura 4.1).

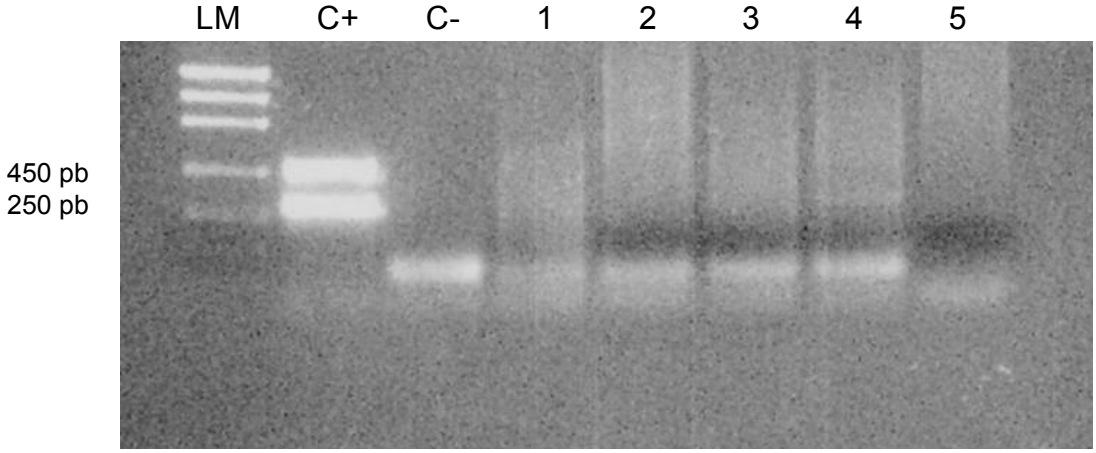

Figura 4.1 - Gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação por PCR do DNA do HPV mostrando da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular (LM), o controle positivo (C+) com as bandas iluminadas para 250 e 450 pares de base, o controle negativo (C-) e exemplos de 5 casos negativos (1-5)

4.2.9 Comprovação da integridade do DNA em estudo

Com o objetivo de se comprovar a integridade do DNA em estudo, submetemos todas as amostras negativas no exame de PCR para o HPV a outro exame de PCR, para avaliação da presença de um gene de desenvolvimento chamado HOXB1.

O HOXB1 é um gene com seqüência presente no DNA de todas as células, portanto a positividade deste PCR para o HOXB1, garante que o DNA em estudo está integro e viável para a pesquisa (LEWIS, 1978; LEWIS et al., 2003).

Para a reação de PCR para o HOXB1, utilizamos um Kit de *primers* e reagentes descritos por Lewis et al. (2003).

Em nosso trabalho, só foram utilizados para estudo os casos que mostraram amplificação por PCR do HOXB1.

4.2.10 Reação de PCR para o HOXB1

Descongelamos o DNA das amostras e o kit de *primers* e reagentes para o HOXB1 por 10 minutos a temperatura ambiente e em outro eppendorf colocamos:

- 0,5µl de Taq DNA polimerase
- 1,3µl de bases de DNA
- 2µl de *primers* para o HOXB1
- 1,5µl de Mg Cl2
- 2,5µl de tampão
- 15,2 µl de H2o bidestilada (água Mili-Q)

Nestas proporções, chegamos a 23µl em cada frasco, com o objetivo de totalizarmos 25µl em cada frasco e finalizar a preparação do material, foram efetuados os seguintes procedimentos: para o controle positivo acrescentamos 2µl do controle do kit; para o controle negativo, acrescentamos 2µl de água de Mili-Q e para as amostras testadas, acrescentamos 2µl de DNA das amostras.

Colocamos os eppendorfs na cicladora, respeitando os seguintes ciclos:

Primeiro ciclo	94ºC por 3 minutos
Trinta e seis ciclos	94ºC por 1 minuto
	61ºC por 45 segundos
	72ºC por 1 minuto
Último ciclo	72ºC por 7 minutos
Manutenção	4ºC até a retirada dos tubos

Em cada amostra foram acrescentadas 1µl de azul de bromoferol e submetidas a cuba de eletroforese em gel de agarose 1% (para cada 80ml de tampão eletrolítico (TBE) 0,8 g de agarose) e tampão eletrolítico por 30 minutos a 90 volts (seguindo o mesmo protocolo que foi utilizado no exame de PCR para o HPV). Os resultados foram avaliados em transiluminador com luz ultravioleta.

4.2.11 Critérios adotados para a interpretação dos resultados do PCR para o HOXB1

Através da leitura das bandas iluminadas pelo transiluminador com luz ultravioleta, foi possível observar a amplificação do gene HOXB1 nas amostras, o que comprovou a integridade do DNA em estudo. Usamos como referência um marcador de peso molecular, um controle positivo que mostrava a banda iluminada na região de 576 pb e um controle negativo.

4.2.12 Análise estatística

Para avaliar se o hábito de fumar, o consumo de álcool e a prática de sexo oral poderiam ser fatores de risco para a doença, foram utilizadas técnicas de regressão logística, para isso foram estimadas *odds ratios* e seus respectivos intervalos de confiança (com coeficiente de confiança de 95%). Inicialmente foi realizada uma análise univariada, ou seja, foi avaliada a contribuição individual de cada fator para explicar a presença da doença, sem levar em conta os demais fatores ou outras variáveis de confusão. Uma vez que nenhum dos fatores estudados foi significante para explicar a presença de doença, nenhum tipo de análise multivariada foi realizado.

Considerando apenas os pacientes com a doença, desejou-se avaliar se a idade, o tempo de doença e os fatores clínicos estavam associados com o grau de atipia da doença. Uma vez que poucos pacientes apresentaram um grau de atipia severo, decidiu-se agrupar as categorias “moderado” e “severo”, a fim de aumentar o número de pacientes em cada categoria, além de possibilitar o uso de modelos de regressão logística, que são relativamente simples de ajustar e oferecem resultados de fácil interpretação.

Assim, a variável resposta nos modelos foi o grau de atipia (discreto ou moderado/severo). As variáveis explicativas foram a idade, o tempo de doença e os fatores clínicos. A idade e o tempo de doença foram categorizadas com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados. Optou-se por utilizar 3 faixas etárias, estabelecidas de modo a acomodar mais ou menos o mesmo número de pacientes em cada faixa. Para a variável tempo de doença, procurou-se gerar categorias de tal forma que houvesse pelo menos um paciente com atipia moderada ou severa em cada categoria.

Inicialmente, foi realizada a análise univariada, onde foi calculado o número e a porcentagem de pacientes que apresentaram atipia moderada ou severa nas categorias de cada uma das variáveis explicativas. Para cada variável explicativa foi ajustado um modelo de regressão logística univariada, a partir do qual obtivemos a estimativa da *odds ratio* e do seu respectivo intervalo de confiança (com coeficiente de confiança de 95%).

A seguir, foi realizada a análise de regressão logística múltipla. Dado o grande número de variáveis explicativas, decidimos utilizar o método *stepwise forward* (HOSMER JR; LEMESHOW, 1989). As variáveis explicativas foram introduzidas uma a uma no modelo, da mais importante para a menos importante. A ordem de "importância" das variáveis foi definida segundo o logaritmo da verossimilhança do modelo univariado (quanto menor o valor de "–2 x logaritmo da verossimilhança", mais importante a variável em questão). A cada passo desta abordagem, uma nova variável era introduzida ou retirada do modelo.

Utilizamos como critérios para decidir se uma determinada variável deveria permanecer ou não no modelo o fato de o seu coeficiente ser significante ou marginalmente significante (nível descritivo do teste de Wald ≤ 0.10).

Após estas análises, foram testadas todas as interações possíveis entre essas variáveis que permaneceram no modelo, duas a duas, permanecendo apenas as que foram significantes. Após esse procedimento, foi definido o modelo final e estimados os seus parâmetros.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos epidemiológicos

Na avaliação da ficha clínica dos pacientes envolvidos na pesquisa, observamos que dos 29 pacientes com queilite actínica crônica, 19 são homens e 10 são mulheres. Com o objetivo de parear o nosso grupo controle, incluímos para o estudo também 29 pacientes, sendo também 19 homens e 10 mulheres, com média etária semelhante ao do grupo com QAC.

No quadro 5.1, verificamos os resultados epidemiológicos da nossa pesquisa.

	QAC	**Lábio Normal**
Raça branca	100%	100%
homens	19	19
mulheres	10	10
Idade média	56,14anos	55,21 anos
Fumantes	48,28%	34,48%
Não fumantes	51,72%	65,52%
Etilistas	10,34%	3,44%
Não etilistas	89,66%	96,56%
Fumantes e etilistas	10,34%	3,44%
Praticam sexo oral	72,41%	75.86%
Não praticam sexo oral	27,59%	24,14%
Praticam sexo oral com mais de 1 parceiro	0%	0%

Quadro 5.1 - Aspectos epidemiológicos dos pacientes portadores de QAC e com lábio normal

O quadro 5.2 contém algumas medidas descritivas para as variáveis de pareamento.

	QAC	**Lábio Normal**
Raça branca	n=29 (100%)	n=29 (100%)
Homens	n=19 (66%)	n=19 (65%)
Mulheres	n=10 (34%)	n=10 (34%)
Idade	média = 56,14 anos mínimo = 43 anos máximo = 72 anos	média =55,21 anos mínimo =52 anos máximo = 60 anos

Quadro 5.2 - Medidas descritivas para as variáveis de pareamento

O quadro 5.3 analisa a presença da QAC com relação ao fumo, ao álcool e a prática de sexo oral.

	N	**QAC**	**% de QAC**	**OR**	**IC (OR, 95%)**	**p**
Fumo						
não	34	15	44			
sim	24	14	58	1,77	0,54 a 5,85	0,29
Álcool						
não	54	26	48			
sim	4	3	75	3,23	0,24 a 175,53	0,30
Sexo oral						
não	15	8	53			
sim	43	21	49	0,84	0,22 a 3,18	0,76

Quadro 5.3 - Análise univariada (variável resposta – QAC: presente ou ausente)

Os resultados no quadro 5.3 sugerem que indivíduos que fumam têm mais chance de ter QAC do que indivíduo que não fumam, entretanto, este resultado não é estatisticamente significante. A chance de ter a doença entre os pacientes que fumam é 1,77 vezes a chance daqueles que não fumam (quase o dobro), entretanto o intervalo de confiança para a *odds ratio* contém o valor 1 (IC = 0,54 a 5,85; p=0,29).

Analogamente, a chance dos indivíduos que consomem álcool terem a doença é 3.23 vezes a chance dos que não consomem, mas este resultado não é estatisticamente significante (p=0.30)

No que diz respeito a prática de sexo oral e o aparecimento da doença, os resultados não se mostraram significativos (p=0.76).

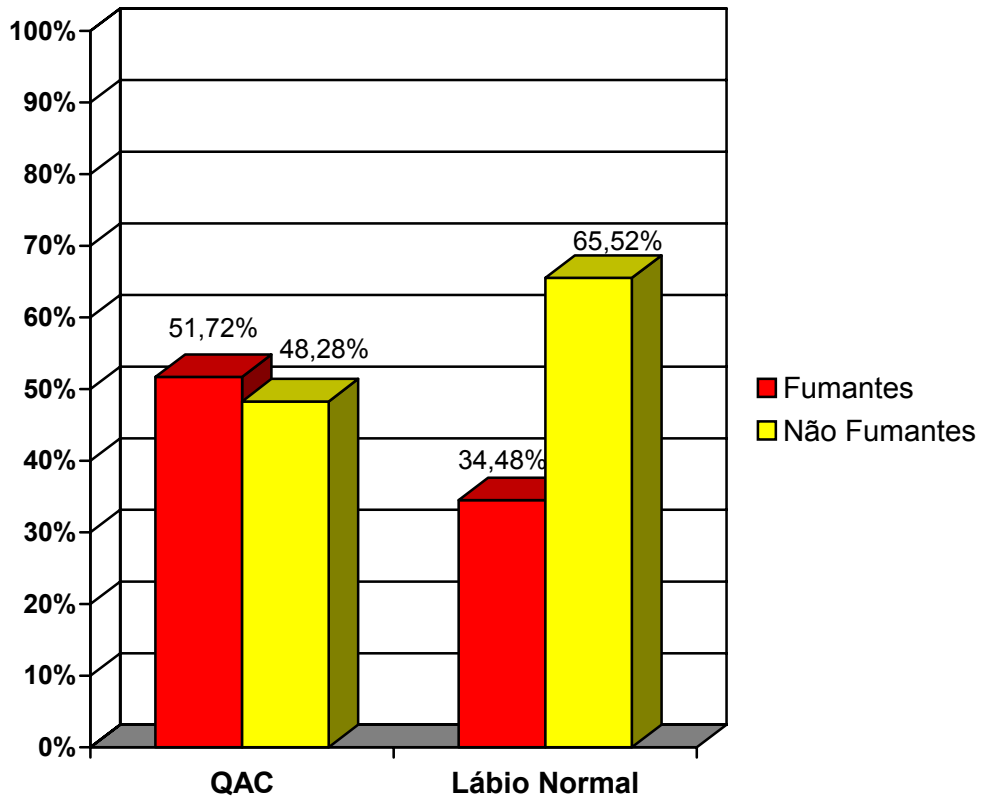

Figura 5.1 - Aspectos epidemiológicos dos pacientes portadores de QAC e com lábio normal em relação ao tabagismo

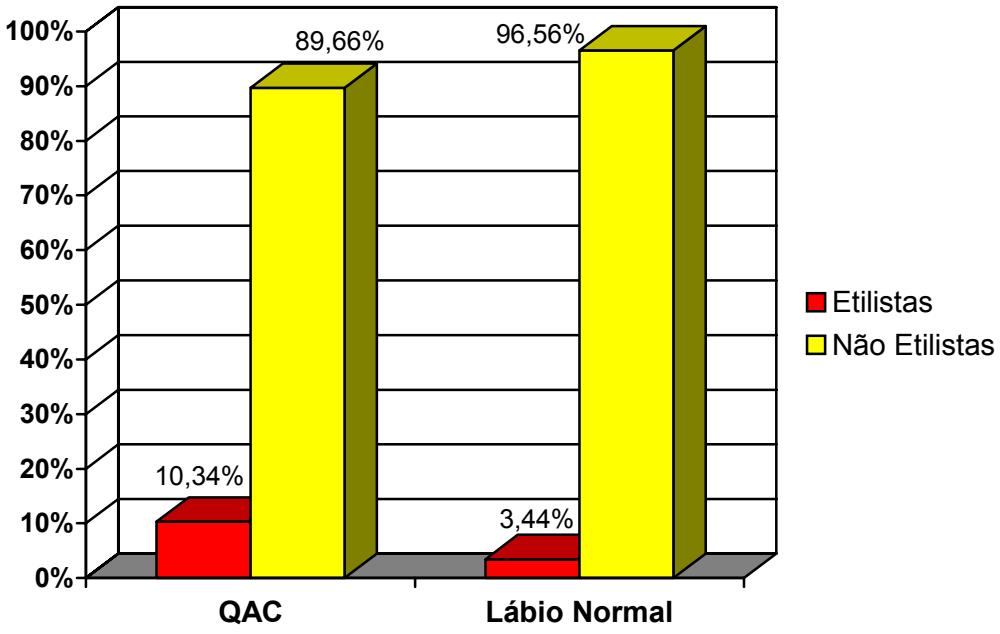

Figura 5.2 - Aspectos epidemiológicos dos pacientes portadores de QAC e com lábio normal em relação ao etilismo

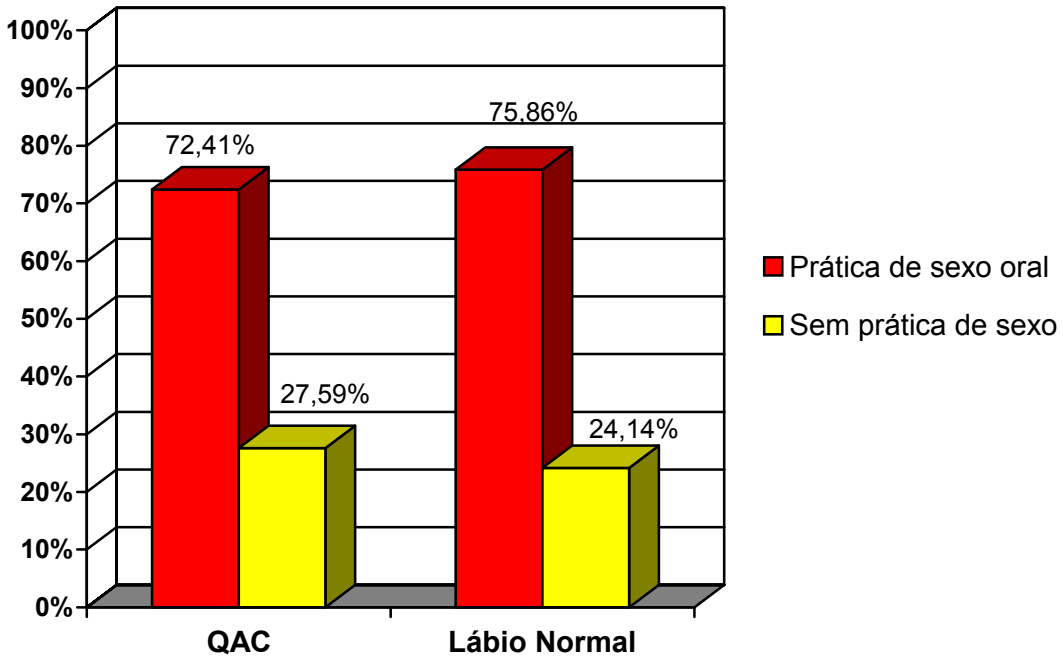

Figura 5.3 - Aspectos epidemiológicos dos pacientes portadores de QAC e com lábio normal em relação à prática de sexo oral

5.2 Aspectos clínicos

Todos os pacientes com QAC foram avaliados clinicamente e analisados criteriosamente os seguintes sinais e sintomas clínicos: ressecamento, descamação, fissuras, adelgaçamento do vermelhão, eritemas, edema, sangramento, áreas leucoplásicas, alteração na linha de transição entre vermelhão e pele, crostas, perda da elasticidade labial (elastose), sintomatologia (dor, ardências etc) e ulcerações.

Os seguintes resultados foram observados (Figura 5.4):

- Ressecamento - 29 casos (100% dos casos)
- Alteração na linha de transição – 27 casos (93,10% dos casos)
- Descamação – 23 casos (79,31% dos casos)
- Eritemas – 23 casos (79,31% dos casos)
- Adelgaçamento do vermelhão – 22 casos (75,86% dos casos)
- Áreas leucoplásicas – 18 casos (62,06% dos casos)
- Fissuras – 16 casos (55,17% dos casos)
- Elastose labial – 16 casos (55,17% dos casos)
- Crostas – 9 casos (31,03% dos casos)
- Ulcerações – 7 casos (24,13% dos casos)
- Edema – 3 casos (10,34% dos casos)
- Sintomatologia – 2 casos (6,89% dos casos)
- Sangramento – 1 caso (3,44% dos casos)

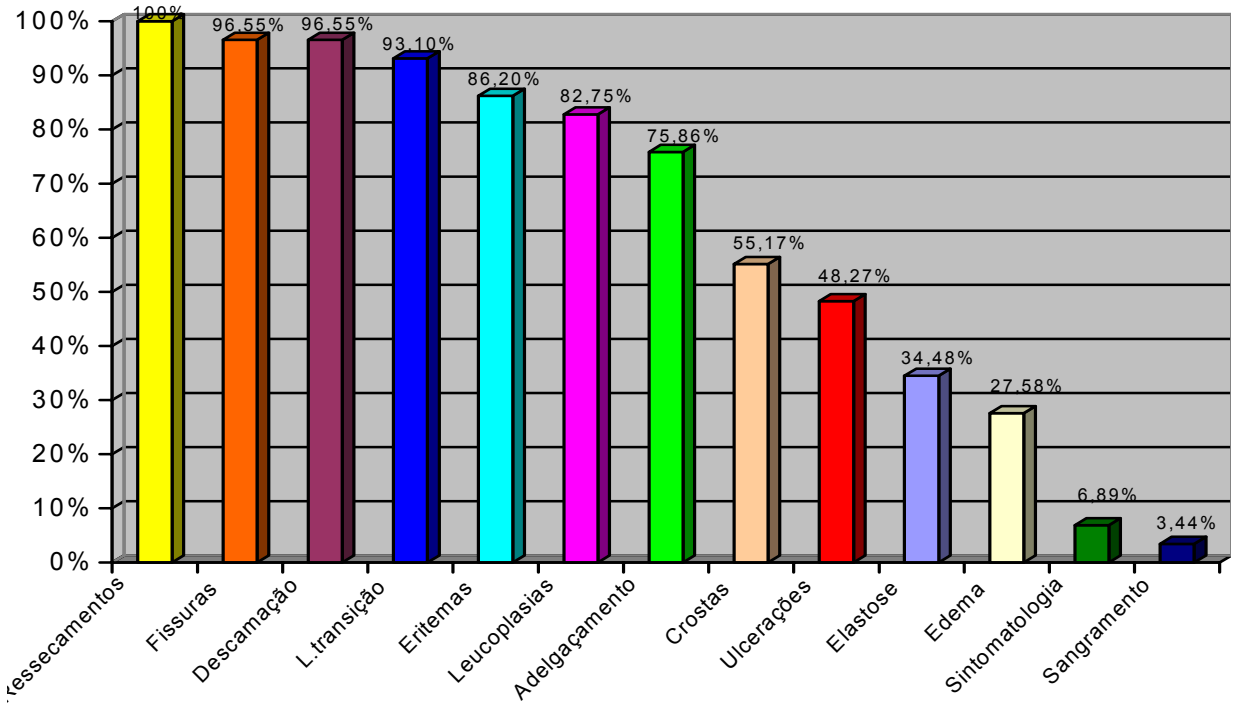

Figura 5.4 - Aspectos clínicos observados nos 29 casos de QAC

Alguns exemplos de nossos casos podem ser visualizados nas figuras 5.5, 5.6 e 5.7:

Figura 5.5 - Exemplo de QAC de nosso estudo (caso 22) demonstrando ressecamento labial, alteração na linha de transição entre vermelhão e pele, edema e elastose labial, crostas, áreas eritematosas, ulceração, adelgaçamento do vermelhão e algumas áreas leucoplásicas

Figura 5.6 - Exemplo de Queilite Actínica Crônica de nosso estudo (caso 5) demonstrando ressecamento, área leucoplásica extensa, alteração na linha de transição entre vermelhão e pele, área eritematosa e adelgaçamento do vermelhão

Figura 5.7 - Exemplo de Queilite Actínica Crônica de nosso estudo (caso 18) demonstrando ressecamento, área leucoplásica extensa, alteração na linha de transição entre vermelhão e pele, áreas eritematosas e descamação

5.3 Aspectos histológicos

No que diz respeito as biópsias executadas, todas as lâminas histológicas foram analisadas e confirmados os diagnósticos de QAC, sendo estes resultados classificados como QAC discreta, moderada e severa, na dependência dos níveis de atipia epitelial encontrados.

Dos 29 casos biopsiados, tabulamos os seguintes resultados (Figura 5.8):

- 14 casos de QAC com atipia epitelial discreta (48,27% dos casos)
- 10 casos de QAC com atipia epitelial moderada (34,49% dos casos)
- 5 casos de QAC com atipia epitelial severa (17,24% dos casos)

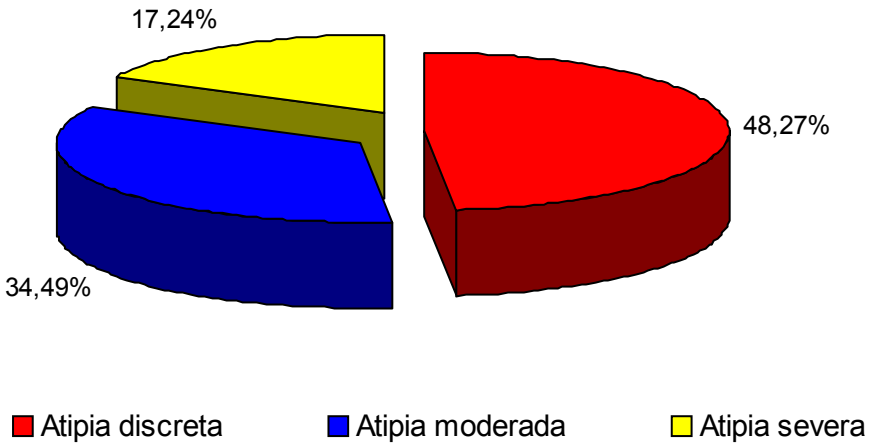

Figura 5.8 - Graus de atipia celular observados nos 29 casos de QAC

Durante a avaliação histológica, demos também atenção a possibilidade de encontrarmos características celulares que indicassem possíveis inclusões virais (coilocitoses), fato que não ocorreu, pois em todas as lâminas avaliadas não foram detectadas nenhuma alteração celular que nos fizessem suspeitar de infecção viral.

Alguns exemplos de nossos casos podem ser visualizados nas figuras 5.9, 5.10 e 5.11.

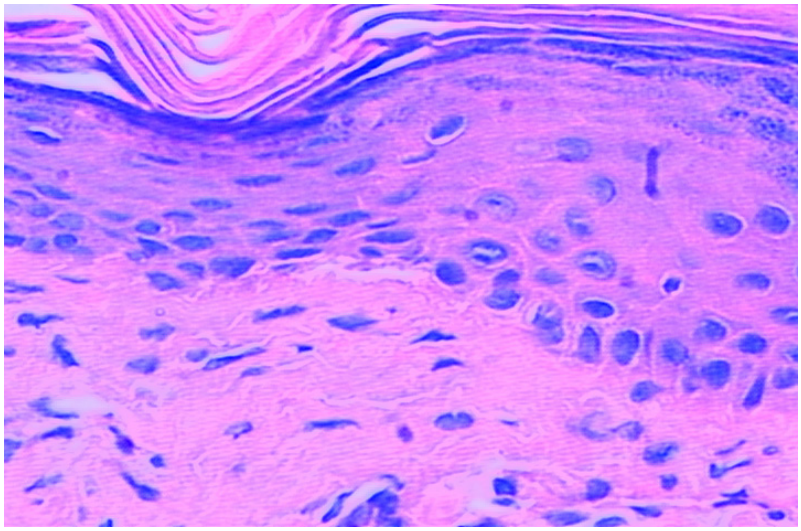

Figura 5.9 - Exemplo de QAC de nosso estudo com atipia epitelial discreta (caso 18), verificamos principalmente polaridade celular alterada, queratinização alterada e atrofia epitelial (aumento de 400 x)

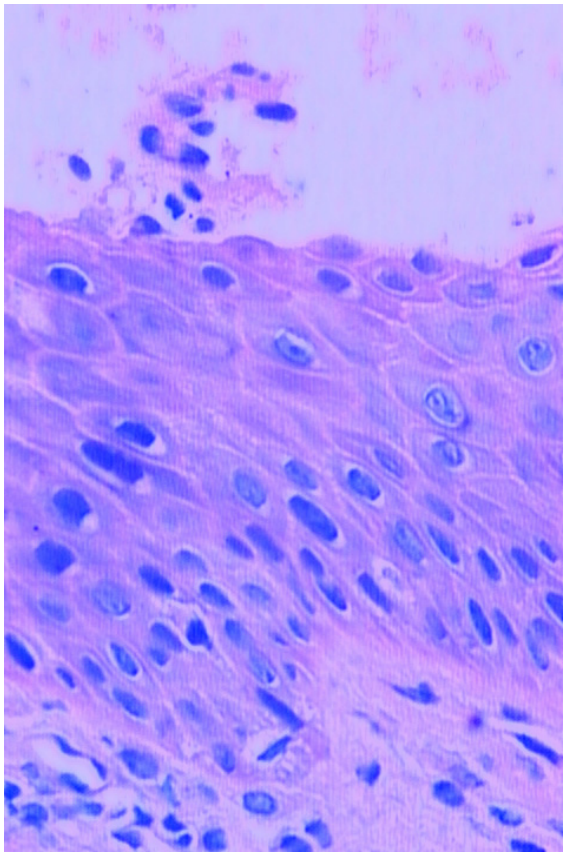

Figura 5.10 - Exemplo de QAC de nosso estudo com atipia epitelial moderada (caso 5), verificamos principalmente polaridade e maturação epitelial alteradas, hiperplasia das células basais, relação núcleo citoplasma aumentada e alteração na queratinização (aumento de 400 x)

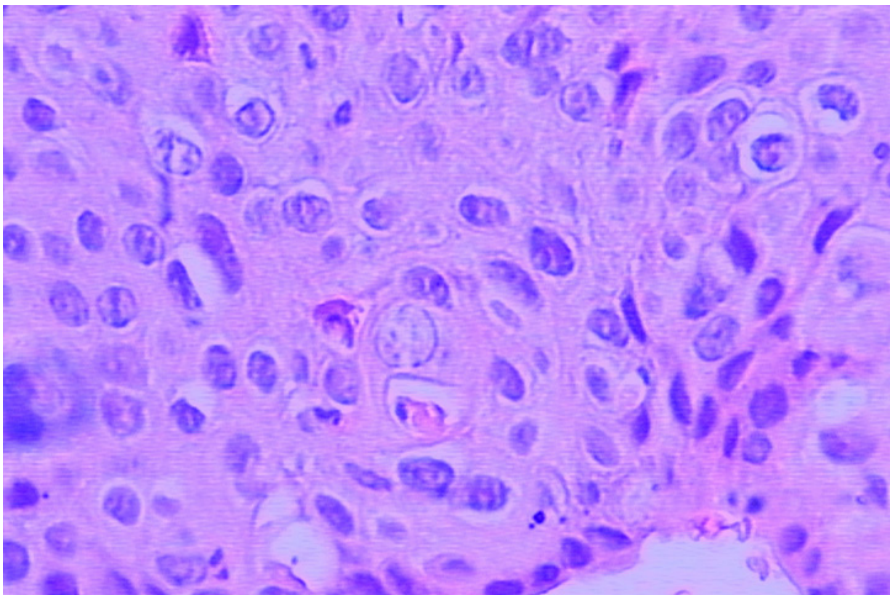

Figura 5.11 - Exemplo de QAC de nosso estudo com atipia severa (caso 22), verificamos, relação núcleo citoplasma aumentada, núcleos hipercromáticos, maturação epitelial alterada (pleomorfismo da camada espinhosa), polaridade celular alterada, cromatina com distribuição irregular e nucléolos aumentados (aumento de 400 x)

5.4 Análise estatística dos resultados (clínicos, histológicos e epidemiológicos)

Confeccionamos um quadro para estudo relacionando idade, duração da lesão, sexo, hábito de fumar, características clínicas com os graus de atipia (apresentados na avaliação histológica dos nossos casos) (Quadro 5.4).

		Atipia Moderada / Severa						
	N	**n**	**%**	**OR**		**IC(OR, 95%)**	**-2logλ**	**Ordem**
Idade (anos)								
43 a 52	10	5	50.0	1.0				
53 a 59	9	7	77.8	3.5		0.5 a 25.9		
60 a 72	10	3	30.0	0.4		0.1 a 2.7	36.6	7
Duração (anos)								
5 ou menos	14	3	21.4					
mais de 5	15	12	80.0	14.7	**	2.4 a 88.5	29.6	2
Sexo								
homens	19	12	63.2	1.0				
mulheres	10	3	30.0	0.3		0.0 a 1.3	37.2	8
Fumo								
não	15	5	33.3	1.0				
sim	14	10	71.4	5.0	*	1.0 a 24.3	35.8	6
Álcool								
não	26	12	46.2	1.0				
sim	3	3	100.0	1.9E+09		0.0 + ∝.	35.9	---
Alt. linha trans.								
não	2	1	50.0	1.0				
sim	27	14	51.9	1.1		0.1 a 19.0	40.2	13
Descamação								
não	6	2	33.3	1.0				
sim	23	13	56.5	2.6		0.4 a 17.2	39.1	9
Eritema								
não	6	2	33.3	1.0				
sim	23	13	56.5	2.6		0.4 a 17.2	39.1	10
Adelgaçamento								
não	7	1	14.3	1.0				
sim	22	14	63.6	10.5	*	1.1 a 103.5	34.6	5

Continua..

Continuação...

	Atipia Moderada / Severa							
	N	**n**	**%**	**OR**		**IC(OR, 95%)**	**-2log(**	**Ordem**
Leucoplasia								
não	11	1	9.1	1.0				
sim	18	14	77.8	35.0	**	3.4 a 362.2	25.8	1
Fissuras								
não	13	10	76.9	1.0				
sim	16	5	31.3	0.1	*	0.0 a 0.7	33.9	4
Elastose								
não	13	3	23.1	1.0				
sim	16	12	75.0	10.0	**	1.8 a 55.6	32.0	3
Crosta								
não	22	8	36.4	1.0				
sim	7	7	100.0	0.7		0.1 a 3.2	39.9	11
Ulceração								
não	22	8	36.4	1.0				
sim	7	7	100.0	2.8E+09		0.0 a + ∝	28.8	---
Edema								
não	26	12	46.2	1.0				
sim	3	3	100.0	1.9E+09		0.0 a + ∝.	35.9	---
Sintomatologia								
não	27	14	51.9	1.0				
sim	2	1	50.0	0.9		0.1 a 16.4	40.2	12
Sangramento								
não	28	15	53.6	1.0				
sim	1	0	0.0	0.0		0.0 + ∝	38.7	---

* p<0.05**p<0.01

Quadro 5.4 - Análise univariada (variável resposta - Grau de Atipia: discreto ou moderado/severo)

O Quadro 5.4 apresenta os resultados da análise univariada. A variável resposta nos modelos foi o grau de atipia (discreto ou moderado/severo). As variáveis explicativas foram a faixa etária, o tempo de doença e os fatores clínicos. O grau de atipia não parece estar associado com a faixa etária, o sexo, a presença de alteração na linha de transição entre pele e vermelhão, descamação, eritema, crosta e sintomatologia. As variáveis álcool, ulceração e edema parecem

estar associadas ao grau de atipia, já que os todos pacientes com a presença de algumas dessas características apresentam atipia modedada/severa. Entretanto, o número de pacientes nessas circunstâncias é muito pequeno (3, 7 e 3), o que não permite a estimação de intervalos de confiança robustos para a *odds ratio*. Em geral, os intervalos variam de 0 até infinito, impossibilitando maiores conclusões. É possível que um estudo com mais pacientes possa confirmar a sugestão de que álcool, ulceração e edema são características muito relacionadas as atipias histológicas mais graves.

Na análise das variáveis duração da doença, hábito de fumar, adelgaçamento, leucoplasias, fissuras e elastose verificamos que estas mostram-se realmente associadas ao grau de displasias epiteliais. Em geral, pacientes com a presença dessas características (exceto fissuras) parecem apresentar maior chance de ter atipia moderada/grave do que pacientes sem essas características. Já para a variável fissuras ocorre o oposto, isto é, pacientes com fissuras parecem ter menos chance de ter atipia moderada/grave do que pacientes com essa característica.

Para avaliar a contribuição de cada variável para o grau de atipia, controlando para a presença das demais variáveis, ajustamos modelos de regressão logística múltipla, utilizando um método *stepwise forward*. As variáveis foram inseridas uma a uma, da menos importante para a mais importante. O Quadro 5.5 apresenta as estimativas da *odds ratio* para os 6 primeiros modelos de regressão logística múltipla.

Variável explicativa	Modelo 1	2	3	4	5	6
Leucoplasia						
não	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
sim	35.0**	19.6**	12.6*	17.1*	16.6**	12.4*
Duração (anos)						
5 ou menos		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
mais de 5		7.1*	7.2*	5.6	5.5	11.2*
Elastose						
não			1.0			
sim			3.4			
Fissuras						
não				1.0		
sim				0.4		
Adelgaçamento						
não					1.0	
sim					2.6	
Fumo						
não						1.0
sim						5.9

* p<0.10**p<0.05

Quadro 5.5 - *Odds ratio* estimadas para os 6 primeiros modelos de regressão logística múltipla, através do método *stepwise forward*

No passo 1 inserimos a variável leucoplasia, que foi estatisticamente significativa ($p<0.05$) e permaneceu no modelo. No passo 2 acrescentamos a variável duração da doença. Esta variável foi marginalmente significativa ($p<0.10$) e por isto também permaneceu no modelo. Note que a estimativa da OR da variável leucoplasia diminuiu do modelo 1 para o modelo 2, sugerindo que uma parte do efeito da variável leucoplasia observado no modelo 1 era devido, de fato, ao tempo de doença.

No passo 3 acrescentamos a variável elastose, entretanto esta variável não foi significativa e não permaneceu no modelo.

Nos passos seguintes inserimos as demais variáveis, mas nenhuma delas permaneceu no modelo. Assim, dentre as variáveis estudadas, “leucoplasia” e “duração da doença” são suficientes para explicar o grau de atipia.

O quadro 5.6 apresenta as estimativas do modelo final (modelo 2), que contém apenas as variáveis leucoplasia e duração da doença. Segundo esse modelo, pacientes com leucoplasia têm mais chance de ter atipia moderada/severa do que pacientes sem leucoplasia. Analogamente, pacientes com mais de 5 anos de doença têm mais chance de ter atipia moderada/severa do que pacientes com 5 anos de doença ou menos.

Variável explicativa	**OR**	**IC(OR, 95%)**	**p**
Leucoplasia			
não			
sim	19.6	1.7 a 233.0	.02
Duração (anos)			
5 ou menos			
mais de 5	7.1	0.9 a 59.1	.07

Quadro 5.6 - Estimativas do modelo final de regressão logística

Finalmente, é extremamente importante ressaltar que conclusões sobre estas análises devem ser interpretadas com cautela. Devemos considerar que os resultados da análise de regressão logística múltipla poderiam ter sido diferentes se os modelos tivessem contemplado as variáveis álcool, ulceração e edema (que foram excluídas devido ao pequeno número de pacientes). Além disso, nota-se que não fizemos grandes afirmações sobre a força das associações ou a magnitude do efeito de cada variável sobre o grau de atipia (representado pelo valor da *odds ratio*), mas apenas sobre a presença ou ausência de associação,

determinado pelo fato de a *odds ratio* ser significantemente maior do que 1, do ponto de vista estatístico. Isto ocorreu porque o evento sob estudo (presença de atipia moderada/severa) é um evento freqüente entre pacientes com QAC. Lembramos que a *odds ratio* pode ser utilizada como estimativa da magnitude do risco de ocorrência do evento apenas quando trata-se de um evento raro. Entretanto, os modelos fornecem estimativas confiáveis sobre a presença ou ausência de associação.

5.5 Exame de PCR

Dos 60 casos estudados, todos se mostraram negativos no exame de PCR para o HPV.

Como já foi explicado no capítulo de casuística e métodos, submetemos todas as amostras de nosso estudo a outro exame de PCR, para avaliação da presença de um gene de desenvolvimento chamado HOXB1.

O HOXB1 é um gene presente em todo o DNA, portanto a positividade deste exame de PCR para o HOXB1, garante que o DNA em estudo está integro e viável para a pesquisa.

Em nosso trabalho, só foram considerados os resultados que se mostraram positivos para o PCR do HOXB1 (Figura 5.12).

Analisando os 60 casos estudados (30 com queilite e 30 lábios normais), 58 se mostraram positivos para o PCR do HOXB1, e dois casos se mostraram negativos, sendo um de cada grupo, desta maneira nosso estudo teve

uma amostra viável para pesquisa de 29 casos para a queilite e 29 casos para lábio normal, onde todos estes 58 casos tiveram resultados negativos no exame de PCR para o HPV (Figura 5.13).

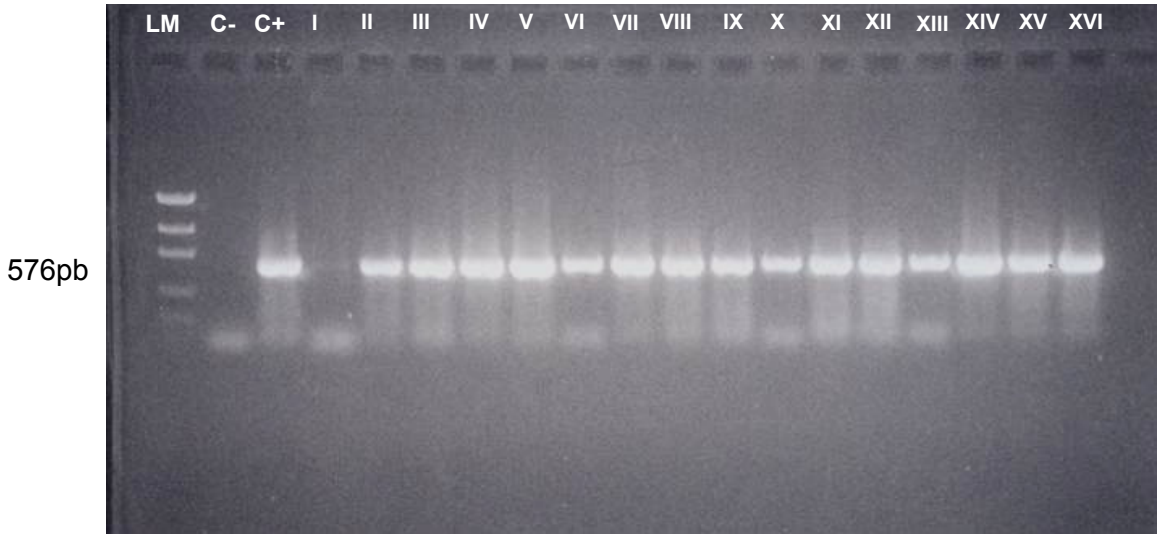

Figura 5.12 - imagem do PCR para o HOXB1, mostrando resultado da amplificação por PCR do HOXB1. Observa da esquerda pra direita o marcador de peso molecular (LM), o controle negativo (C-), o controle positivo (C+) com as bandas iluminadas para 576 pares de bases e exemplos de 16 casos (I-XVI) sendo o primeiro (I), uns dos casos que negativou

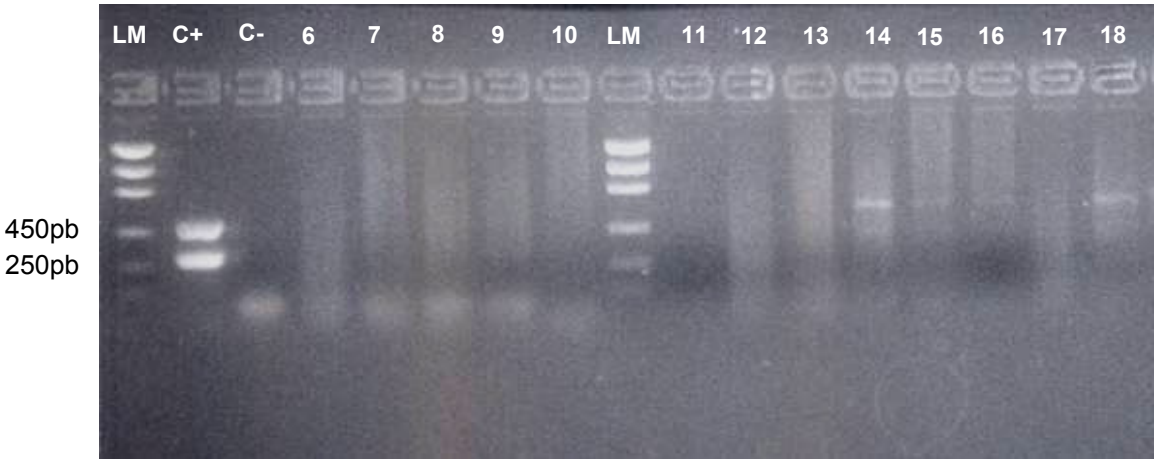

Figura 5.13 - imagem do PCR para o HPV mostrando negatividade em todos os casos (6-18). Observar os marcadores de peso molecular (LM) (primeira e nona coluna), o controle positivo (segunda coluna) e o controle negativo (terceira coluna)

6 DISCUSSÃO

A QAC é considerada uma lesão cancerizável (MAIN; PAVONE, 1994) e tem como agente etiológico bem definido a radiação solar (PACCA et al., 1999; REGEZI; SCIUBBA, 1991; SAMPAIO; RIVITTI, 1998). Dardanoni (1984) consideraram as características étnicas de pele clara um dos mais poderosos fatores de risco para a QAC e o câncer de lábio. Em nosso trabalho, verificamos que 100% dos pacientes com QAC eram da raça branca.

Recentes trabalhos descrevem a prevalência da QAC como acometendo principalmente pacientes acima da quinta década de vida (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004), estes dados foram confirmados em nossa pesquisa, pois observamos uma média de idade em nossos pacientes portadores de QAC de 56,14 anos.

Inúmeros trabalhos científicos no decorrer dos anos (CATALDO; DOKU, 1981; FLAMMINGHI, 1984; KAUGARS, 1999; KOTEN; VERHAGEN; FRANK, 1981; MAINO; RAMSEYER; MARMOL, 1973; NICOLAU; BALUS, 1964; PICASCIA; ROBINSON, 1987; ROBINSON, 1989; STANLEY; ROENIGK, 1988; TEREZHALMY; NAYLOR, 1993), descrevem as formas clínicas e histológicas da QAC, mas nenhum deles apresentou esses dados de forma percentual.

Aguiar (1995) foi a primeira a analisar alguns aspectos clínicos da QAC de forma mais detalhada. Em seu estudo foram avaliados 69 pacientes com QAC chegando aos seguintes resultados: eritema em 71,01% (em nosso estudo encontramos 79,31%), descamação em 69,56% (em nosso estudo 79,31%), ulceração em 15,94% (em nosso estudo 24,13%), infiltração ou elastose em

40,57% (em nosso estudo 55,17%), crosta em 13,04% (em nosso estudo 31,03%), atrofia ou adelgaçamento do vermelhão em 71,01% (em nosso estudo 75,86%), áreas leucoplásicas em 37,68% (em nosso estudo 62,06%), alteração na linha de transição entre pele e vermelhão em 88,40% (em nosso estudo 93,10%). Percebemos que de maneira geral, em nossos pacientes as alterações clínicas encontradas foram mais freqüentes.

Em sua tese de doutorado, Cavalcanti (2000) analisou também 29 pacientes com QAC verificando os graus de atipias celulares encontradas, todos os casos apresentaram atipia epitelial nas seguintes proporções: atipia moderada em 10,35%, atipia moderada em 27,59% e atipia severa em 62,06% dos casos. Interessante compararmos estes resultados, pois eles são absolutamente antagônicos aos de nosso estudo, pois em nossos pacientes encontramos 48,27% de atipias discretas, 34,49% de atipias moderadas e 17,24% de atipias severas. Esta variação pode ser justificada quando avaliamos o perfil dos pacientes do trabalho de Cavalcanti (2000), pois na sua grande maioria eram pacientes lavradores que trabalham por períodos prolongados e por vários anos sob a ação maléfica dos raios solares. Já em nosso estudo, o padrão de atividades profissionais de nossos pacientes é mais variado e até mesmo pelo fato dos participantes da pesquisa residirem em áreas urbanas.

Em nosso estudo, fizemos uma avaliação estatística detalhada, correlacionando os aspectos clínicos da QAC e o hábito de fumar e beber com a incidência de atipias moderadas e severas. Na análise dos resultados, o grau de atipia não se mostrou associado a faixa etária, ao sexo, a presença de alteração na linha de transição, descamação, eritema, crosta e sintomatologia. Como já foi comentado no capítulo de resultados, as variáveis álcool. ulceração e edema

parecem estar associadas ao grau de atipia, pois todos os pacientes com a presença dessas características apresentam atipia moderada/severa. Entretanto, o número de pacientes com estas características é muito pequeno (3, 7 e 3 respectivamente), o que não permitiu conclusões estatisticamente significativas para que o hábito de consumir bebida alcoólica, a presença de ulceração e edema estivessem associados ao grau de atipia.

Também foi citado no capítulo anterior que as variáveis: duração da doença, hábito de fumar, adelgaçamento de vermelhão, leucoplasias, elastose e fissuras, mostraram-se associadas ao grau de displasias epiteliais. Em geral, pacientes com a presença dessas características (exceto fissuras) parecem apresentar maior chance de ter atipia moderada/severa do que pacientes sem essas características. Já para a variável fissuras ocorreu o oposto, isto é, pacientes com fissuras parecem ter menos chance de ter atipia moderada/severa do que pacientes com essa característica.

As variáveis duração da lesão e leucoplasia foram as únicas que estatisticamente podem ser consideradas como conclusivamente associadas ao grau de displasia epitelial.

É importante ressaltar que em nos nossos casos que foram classificados como atipia epitelial severa no resultado das biópsias, os pacientes foram submetidos a vermelhectomia e nos casos de atipia moderada e discreta os pacientes foram orientados para controles periódicos em nosso ambulatório.

Sem dúvida, a QAC está relacionada ao câncer de lábio e ambos relacionados diretamente à exposição solar embora a literatura também descreva o fumo como um fator importante a ser considerado (DOLL, 1991; DOUGLAS; GAMOM, 1984; LEVI, 1993; PACCA, 1999; PRESTON-MARTIN; HENDERSON;

PIKE, 1982; STANLEY; ROENIGK, 1988). De Visscher e Van Der Waal (1998), descrevem enfaticamente que não podemos ficar limitados somente a um fator de risco. Esta correlação foi também percebida em nossos resultados, pois encontramos 48,28% de fumantes com QAC enquanto que pacientes com lábio normal, 34,48% tinham o hábito de fumar, apesar desta diferença, em nossa análise estatística estes valores não podem ser considerados conclusivos.

Lindqvist, Teppo e Pukkala (1981) concluíram em seu estudo na Finlândia que a baixa de resistência da semi-mucosa labial causada pelo trabalho ao ar livre e o consumo de bebida alcoólica levam a um aumento na susceptibilidade aos agentes carcinogênicos do tabaco. Em nosso estudo foi verificada uma tendência maior ao aparecimento da QAC em pacientes etilistas muito embora como o número dos etilistas foi pequeno tanto no grupo doente (3 pacientes) como no grupo controle (1 paciente), este resultado não foi estatisticamente significante.

Boyd e Reade (1988) e Decker e Goldstein (1982), chamavam a atenção para o hábito de fumar cachimbo como sendo ainda mais preocupante pois neste caso a irritação térmica do lábio é mais acentuada que em outros tipos de fumo.

Nielsen, Norrild e Vedofte (1996), avaliaram através do PCR em tecido fresco a mucosa labial de 20 pacientes normais e não detectaram a presença do HPV em nenhum caso. Mais recentemente, Sand et al. (2000), analisaram também por PCR em tecido fresco, a mucosa labial de 12 pacientes normais e não detectaram a presença do HPV em nenhum caso. Estes resultados compartilham com os de nosso estudo, pois dos 29 casos de lábio normal avaliados, não encontramos o HPV em nenhum deles.

As infecções pelo HPV nas genitálias são consideradas como doenças sexualmente transmissíveis (DST) e atualmente alguns autores descrevem as possibilidades de infecções em cavidade bucal adquiridas pelo sexo oral (TIDER; PARSONS; BIMBI, 2005). A partir destas informações, nos motivamos a pesquisar o hábito da pratica de sexo oral dos nossos pacientes, onde os percentuais encontrados, foram de 72,41% de praticantes com QAC e de 75,86% para praticantes com lábio normal. Na análise estatística destes resultados não verificamos diferenças significativas entre os dois grupos como também não podemos correlacionar a prática de sexo oral com o HPV no lábio pois não encontramos nenhum caso positivo para o HPV em nosso estudo.

Ainda comentando sobre os agentes carcinogênicos conhecidos, sabemos que o HPV é classificado atualmente como um oncovírus (KANSKY et al., 2003) e diversos autores têm demonstrado a relação do HPV com o câncer bucal e com as lesões cancerizáveis de boca.

Ostwald et al. (2003), pesquisaram pelo exame de PCR em tecido fresco, a presença de HPVs oncogênicos em 118 casos de CEC, 72 casos de leucoplasias, 12 casos de queilites actínicas e 65 casos de liquens-plano. Foi detectada a presença do HPV em 43,2% dos CEC, 22,2% das leucoplasias, 25,0% das queilites actínicas e 15,4% dos liquens-plano.

Outro trabalho já citado em nossa revisão bibliográfica, foi o trabalho de Makoto et al. (1990), investigaram a ocorrência do HPV em QAC pelo método de PCR em tecido fresco chegando a um percentual de detecção do HPV em 5% dos casos.

Em nosso estudo, contrariando os resultados de Makoto et al. (1990) e Ostwalt et al. (2003) não encontramos o HPV em nenhum dos nossos casos de QAC. É importante lembrar que Lu, Syrjanen e Havu, em 1995, pesquisando o HPV utilizando a técnica do PCR em um grupo de 100 pacientes, também não encontraram positividade em seus casos. Interessante registrar que no trabalho supra mencionado, o material analisado era proveniente de blocos de parafina como também não foi executado nenhum outro exame para a confirmação da integridade do DNA, não sendo possível afirmar que o resultado negativo seja fidedigno, diferentemente de nosso estudo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio das metodologias por nós utilizadas, nos permitem concluir que:

- Não foi detectada a presença do HPV tanto no grupo doente (QAC) como no grupo controle (pacientes normais).
- A QAC ocorreu em 100% nos indivíduos da raça branca, mais no gênero masculino (19 homens e 10 mulheres) e na idade média de 56,14 anos.
- Dos aspectos clínicos da QAC analisados, o ressecamento labial foi o único que se mostrou presente em 100% dos casos.
- Pacientes com QAC que apresentam clinicamente áreas leucoplásicas tem estatisticamente mais chance de apresentar atipias epiteliais moderadas e severas.
- O fumo isoladamente como também a sua associação com o álcool , não foram estatisticamente significantes na contribuição para o aparecimento da QAC.
- Os aspectos histológicos da QAC mostram que das 29 lâminas analisadas, encontramos atipia discreta em 14 casos, moderada em 10 e severa em 5.
- Pacientes com QAC por mais de 5 anos têm estatisticamente mais chance de apresentar atipias epiteliais moderadas e severas.

REFERÊNCIAS[1]

Aguiar SM. Contribuição ao estudo da queilite actínica: correlação anatomo-clínica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1995.

Aguilar LT, Antunes JLF, Lehn CN, Marcucci G.Prótese, higiene, escolaridade e renda no risco do carcinoma epidermóide bucal: estudo caso-controle. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2006;60(1): 25-8

Anderson DL. Cause and prevention of lip cancer. J Can Dent Assoc 1971;37(4):138-42.

Ayres Jr. S. Chronic actinic cheilitis. J Am Med Assoc 1923;81(14):1183-5.

Baker SR, Krause CJ. Carcinoma of the lip. Laryngoscope 1980;90(1):19-27.

Bánóczy J, Csiba A. Occurrence of epitelial dysplasia in oral leucoplakia: analysis and follow – up study of 12 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1976;42(6):766-74.

Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Kyroudi A, Laskaris G, et al. “High risk” HPV types are frequently detected in potentially malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. Mod Pathol 2000;13(6):644-53.

Boyd NM, Reade PC. Factors associated with the development of neoplasias. J Oral Pathol 1988;17(5):202-7.

[1] De acordo estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer (Pro-Onco). Câncer de boca. Manual de detecção de lesões suspeitas. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA / Pro-Onco; 1996. p.47.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer (Pro - Onco). Câncer de boca. Rio de Janeiro: INCA; 2001.

Brennan JA, Boyle JO, Kock WM. Association between cigarette smoking and mutation of the p 53 gene in squamous – cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 1995;332(11):712-27.

Cao J, Zhang ZY, Zhang YX. Human papillomavirus infection and p 53 alteration in oral squamous cell carcinoma. Chin Dent Res 2000;3(3):44-9.

Castro JFL, Arcoverde L, Silva AAR, Godoy GP. Carcinoma epidermóide de lábio inferior: estudo de 135 casos registrados no Hospital de Câncer de Pernambuco no período compreendido entre 1992 e 1997. Rev Odontol Univ Santo Amaro 1999;4(1):43-9.

Cataldo E, Doku C. Solar cheilitis. J Dermatol Surg Oncol 1981;7(12):989-95.

Cavalcante ASR. Queilite actínica: estudo clínico e histológico [Tese de Livre-Docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da UNESP; 2000.

Dardanoni L. A case-control study on lip câncer risk factors in Ragusa (Sicily). Int J Cancer 1984;34(3):335-7.

De Visscher JGAM, Van Der Wall L. Etiology of cancer of the lip: a review. Int J Maxillofac Surg 1998;27(3):199-203.

Decker J, Goldstein JC. Risk factors in head and neck cancer. N Engl J Med 1982;306(19):1151-5.

Doll R. Urban and rural factors in the aetiology of cancer. Int J Cancer 1991;47:803-10.

Douglas CW, Gammon MD. Reassessing the epidemiology of lip cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1984;57(6):631-42.

Dudding N, Sutton J, Lane S. Koilocytosis; an indication for conservative management. Cytopathology 1996;7:32-7.

Dufresne Jr. RG, Curlin MU. Actinic cheilits: a treatment review. Dermatol Surg 1997;23(1):15-21.

Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. Clin Infect Dis 2006;43(5):624-9.

Flamminghi L. Considerazioni cliniche, etiopatogenetiche ed anatomopatologiche. Acta Biomed Ateneo Parmense 1984;55:181-8.

Garewal HS. Response of oral leukoplakia to betacaroteno. J Clin Oncol 1993;8(10):1715-20.

Hosmer Jr DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons; 1989.

Huber MA, Terezhalmy GT. The patient with actinic cheilosis. Gen Dent 2006;54(4):274-82.

Ibieta BR, Lizano M, Frans-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, et al. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;9(3):311-5.

Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epthelial lesions in Venezuela. J Oral Pathol Med 2001;30(7):385-8.

Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B, et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. Acta Virol 2003; 47(1):11-6.

Kaugars GE. Actinic cheilits: a review of 152 cases. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999;88(2):181-6.

Koopmann Jr. CF, Coulthard SW. The oral cavity and aging. Otolaryngol Clin North Am 1982;15(2):293-312.

Koppikar P, Villiers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. Int J Cancer 2005;113(6):946-50.

Koten JW, Verhagen ARHB, Frank GL. Histopathology of actinic cheilitis. Dermatologia 1981;135(6):465-71.

Kowalski LP. Fatores prognósticos em carcinomas da laringe tratados por cirurgia: análise multifatorial de variáveis demográficas, clínicas, anatomopatológicas e terapêuticas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP; 1989.

Levi F. Trends in lip cancer incidence in Vaud, Switzerland. Br J Cancer 1993;68(5):1012-3.

Lewis BE, Pfeiffer BD, Mathog D, Celniker SE. The homeobox gene. Current Biol 2003;13(15):587-8.

Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature 1978;276:565-70.

Lindqvist C, Pukkala E, Teppo L. Second primary cancers in patients with carcinoma of the lip. Community Dent Oral Epidemiol 1979;7(4):238-48.

Lindqvist C, Teppo L, Pukkala E. Occupations with low risk of lip cancer show high risk cancer of the head. Community Dent Oral Epidemiol 1981;9:247-50.

Lopez-Lizarraza E, Sanchez-Corona J, Montoya-Fuentes H, Bravo-Cuellar A, Campollo-Rivas O, Lopez-Demerutis E, et al. Human papillomavirus in tonsilar and nasopharyngeal carcinoma: isolation of hpv subtipe 31. Ear Nose Throat J 2000;79(12):942-4.

Loré Jr. JM, Kaufman S, Grabau JC, Popovic DN. Surgical management and epidemiology of lip cancer. Otalaryngol Clin North Am 1979;12(1):81-95.

Lu S, Syrjanen K, Havu VK. No evidence of human papillomavirus DNA in actinic cheilitis. Arch Dermatol Res 1995;287(7):449-51

Main JHP; Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. J Can Dent Assoc 1994;60(2):113-6.

Maino FOR, Ramseyer RM, Marmol JJ. Importancia del tratamiento precoz de las queilitis cronicas. Rev Assoc Odontol Argent 1973;61:223-6.

Makoto K, Favre M, Obalek S, Jablonska S, Orth G. Premalignant lesions and câncer of the skin in the general population: evaluation of the role of human papillomaviruses. J Invest Dermatol 1990;95(5):537-42.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. Oral Dis 2004;10(4):212-6.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91(6):622-35.

Mitsuishi T, Ohara K, Kawashima M, Kobayashi S, Kawana S. Prevalence of human papillomavirus DNA sequences in verrucous carcinoma of the lip: genomic and therapeutic approoaches. Cancer Lett 2005;26;222(2):139-43.

Molnàr L, Rónay P, Tapolcsányi L. Carcinoma of the lip. Analysis of the Material of twenty five years. Oncology 1974;29(2):101-21.

Nicolau SG, Balus L. Chronic cheilitis and cancer of the lower lip. Br J Dermatol 1964;76(2):278-89.

Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst H. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsils. J Clin Pathol 1990;(43):918-21.

Nielsen H, Norrild B, Vedofte P. Human Papilomavirus in oral premalignant lesions. Eur J Cancer Oral Oncol 1996;(32):267-70.

Ostwald C, Rutsatz K, Scheweder J, Schmidt W, Gundlach K, Barten M. Human papillomavirus 6 / 11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. Med Microbiol Immunol (Berl) 2003;192(3):145-8.

Pacca FOT, Cerri A, Silva CEXSR, Silva SS. Queilite actínica: relato de caso clínico e tratamento com ácido tricloroacético. Rev Bras Cir Cabeça Pesc 1999;23(3):103-6.

Pacca FOT. Queilite actínica: revisão da literatura e estado atual da questão. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

Park NH. Combined effect of herpes simplex virus and tabacco on the histopathologic changes in lips of mice. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985;59(2):154-8.

Picascia DD, Robinson K. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis and treatment. J Am Acad Dermatol 1987;17(2):255-64.

Preston-Martin S, Henderson BE, Pike MC. Descriptive epidemiology of cancers of the upper respiratory tract in Los Angeles. Cancer 1982;49:2201-7.

Regezi FA, Sciubba JJ. Patologia bucal. Correlações clínico – patológicas. Rio de Janeiro: Guanabara / Koogan; 1991. 390 p.

Robinson JK. Actinic cheilitis (A prospective study comparing four treatment methods). Arch Otoloryngol Head Neck Surg 1989;115:848-52.

Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia. São Paulo: Artes Médicas; 1998. 1116p.

Sand L, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. Anticancer Res 2000;20(2B):1183-8.

Schwartz RA, Stoll HL. Epithelial precancerous lesions. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in general medicine. 4.ed. New York: McGraw-Hill; 1993.

Scully C. Oncogens, tumor supressors and virusis in oral squamous carcinoma. Oral Pathol Med 1993;22:337-47.

Scully C. Oral precancer: preventive and medical approaches to management. Oral Oncol 1995;31(1):16-26.

Shimizu M, Adachi A, Zheng S, Matsunaga J, Kusakari Y, Tagami H, et al. Detection of various types of human papillomavirus DNA, mainly belonging to the cutaneous-group, more frequently in normal tissue than in squamous cell carcinomas of the lip. J Dermatol Sci 2004;36(1):33-9.

Silva CEXSR. Prevalência do genoma do papilomavírus humano no carcinoma espino-celular da língua. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. J Clin Pathol 1998;51:643-8.

Stanley RJ, Roenigk RK. Actinic cheilitis: treatment with the carbon dioxide laser. Mayo Clin Proc 1988;63(3):230-5.

Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP. P 53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity and oral cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000;90(3):334-9.

Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg 1983;12(6):418-24.

Terezhalmy GT, Naylor GD. Actinic cheilitis. J Indian Dent Assoc 1993;72(4):12-5.

Tider DS, Parsons JT, Bimbi DS. Knowledge of human papillomavirus and effects on sexual behaviour of gay/bisexual men: a brief report. Int J AIDS 2005;16(10):707-8.

Van Der Waal S. Diagnostic and therapeutic problems of oral precancerous lesions. Int J Oral Maxillofac Surg 1986;15:790-8.

Walker F, Adle-Biassette H, Madelenat P, Hénin D, Lehy T. Increased apoptosis in cervical intraepithelial neoplasia associated with HPV infection: implication of oncogenic human papillomavirus, caspases and Langerhans cells. Clin Cancer Res 2005;11(7):2451-8.

Warnock GR, Fuller Jr. RP, Pelleu Jr. GB. Evaluation of 5- fluorouracil in the treatment of actinic keratosis of the lip. Oral Surg 1981;52(5):501-5.

WHO. Colaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leucoplakia and related lesions; an aid to studies on oral precancer. Oral Surg 1978;46(4):518-39.

Winn DM. Diet and nutricion in the etiology of oral câncer. Am J Clin Nutr 1995;61(2):4375-455.

Wurman LH, Adams GL, Meyerhoff WL. Carcinoma of the lip. Am J Surg 1975;130(4):470-4.

Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg 2004;33(1):71-4.

zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host – cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000;92(9):690-8.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Ficha clínica 1

(PROTOCOLO HPV / QUEILITE E LÁBIO NORMAL)

NOME:_____
NASC.____/____/____ SEXO: _____ RAÇA: _____
ENDEREÇO: _____N° _____COMPL_____
CEP:_____-____ FONE:_____ CELULAR:_____

PROFISSÃO:_____
FUMANTE Sim □ Não □ Tempo de uso _____
Quantidade diária _____ Marca comercial _____

ETILISTA Sim □ Não □ Tempo de uso _____
Quantidade diária _____ Tipo de bebida _____

Pratica sexo oral Sim □ Não □
Freqüência _____
Possue dois ou mais parceiros sexuais Sim □ Não □

HISTÓRIA MÉDICA
_____
_____

HISTÓRIA ESTOMATOLÓGICA
_____
_____

ANTECEDENTES FAMILIARES
_____
_____

DESCRIÇÃO DA LESÃO
_____
_____
Tempo de evolução:_____

ENCAMINHADO AP ____/____/____ RESULTADO AP _____

CONTROLE N° _____ RESULTADO PCR _____

APÊNDICE B – Ficha clínica 2

(PROTOCOLO HPV / QUEILITE E LÁBIO NORMAL)
Pacientes com QAC

NOME:_____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA LESÃO:

Ressecamento Sim □ Não □

Descamação Sim □ Não □

Fissuras Sim □ Não □

Adelgaçamento do vermelhão Sim □ Não □

Eritemas Sim □ Não □

Sangramento Sim □ Não □

Áreas Leucoplásicas Sim □ Não □

Alteração da linha de transição vermelhão e pele Sim □ Não □

Crostas Sim □ Não □

Perda da elasticidade labial Sim □ Não □

Ulcerações Sim □ Não □

Sintomatologia Sim □ Não □

APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisa

Termo de consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisa:

Estudo comparativo da prevalência do papilomavirus humano (HPV) na queilite actínica crônica e na semi-mucosa labial normal.

O HPV é um vírus que possui mais de 100 subtipos diferentes e que pode provocar inúmeras doenças, como por exemplo: as verrugas vulgares e o condiloma ("crista de galo") e sabidamente é um dos fatores importantes para o aparecimento do câncer de colo de útero nas mulheres, trabalhos atuais tentam correlaciona-lo com o desenvolvimento do câncer bucal.

O objetivo deste trabalho é determinar se existe relação entre este vírus e a queilite actínica crônica, pois esta doença possui potencial de transformação maligna e desta forma, você estará contribuindo para o estudo, o conhecimento e a prevenção desta doença.

Para que o Sr. possa participar desta pesquisa, no momento em que será submetido ao tratamento cirúrgico que lhe for indicado, iremos remover uma pequena amostra da mucosa normal que recobre o seu lábio. Para os pacientes portadores de lesão, o fragmento retirado será dividido para ser utilizado tanto para o diagnóstico através do exame anátomo-patológico, quanto para a pesquisa. Para retirar as amostras de tecido, iremos anestesiar a região pelo mesmo método usado nos tratamentos dentários e após a remoção do fragmento, iremos dar um ponto com fio de sutura que não requer sua remoção posterior.

O procedimento de remoção do fragmento não apresenta maior risco para a sua saúde. Se você tiver qualquer problema ou dúvida durante a sua participação na pesquisa poderá comunicar-se pelo telefone (11) 5571-1736 ou (11) 9930-1530 e procurar o Dr. Francisco Octávio Teixeira Pacca.

A participação na pesquisa não é obrigatória e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo no seu tratamento de rotina. As consultas serão gratuitas e não haverá compensação em dinheiro pela sua participação.

Com os dados obtidos nessa pesquisa, você estará ajudando imensamente outras pessoas, na medida em que, poderemos compreender melhor como essa doença aparece e como poderemos tratá-la da melhor forma.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o Estudo comparativo da prevalência do papilomavirus humano (HPV) na queilite actínica crônico e no lábio normal.

Eu, _____ discuti com o Dr. Francisco Octávio Teixeira Pacca sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data / /

Assinatura do Paciente

_____

Assinatura da testemunha Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data / /

Francisco Octávio Teixeira Pacca

Tel: 5571-1736 ou 9930-1530

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER nº 09/03
Protocolo 07/03

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "***Estudo da prevalência do papilomavírus humano na queilite actínica crônica e na semi-mucosa labial normal***" de responsabilidade do pesquisador **Francisco Octávio Teixeira Pacca**, sob orientação do Professor Doutor **Gilberto Marcucci.**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 31 de julho de 2003 e em 31 de janeiro de 2004. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 31 de janeiro de 2003.

Profª Drª **Célia Regina Martins Delgado Rodrigues**
Coordenador da CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso na S.O.O.

ANEXO B – Parecer sobre Projetos de Pesquisa da Unicastelo

Rua Carolina Fonseca, 584
Itaquera (08230.030) SP
fone: 11 6170-0000
www.unicastelo.br

Unicastelo
Universidade Camilo Castelo Branco

CENTRO DE PESQUISA UNICASTELO
Parecer sobre os Projetos de Pesquisa encaminhados

Número do Registro: 969/04 **Data de entrada:** 20/09/2004

Faculdade: Ciências da Saúde.
Curso: Odontologia.
Professor Responsável: Prof. Francisco Octávio T. Pacca.
Outros envolvidos: Prof. Francisco Octávio T. Pacca, Prof. Gilberto Marcucci.
Título do Projeto de Pesquisa: *Estudo da prevalência do papilomavírus humano na queilite actínica crônica e na semi - mucosa labial normal.*
Objetivo: Pesquisar a prevalência do HPV nas Queilites Actínicas crônicas e na semi – mucosa labial normal.
Cronograma de desenvolvimento: Janeiro de 2004 a dezembro de 2005.
Recursos Necessários: Não requer recursos.

Parecer: (X) Aprovado ( ) Não aprovado

Profa. Mônica Ferreira Nunes
Reitora

São Paulo, 24 / 11 / 2004.

Parecer Financeiro (Quando necessário):

ANEXO C - Grupo doente

Número	idade	Sexo	Profissão	Fumo	Álcool	Duração	Atipia
	55	M	Pedreiro	Sim	Sim	5 anos	severa
2	57	F	Aux. limpeza	Sim	Não	5 anos	severa
3	48	M	Metalúrgico	Não	Não	3 anos	discreta
4	47	M	Motorista	Sim	Não	10 anos	severa
5	53	F	Feirante	Não	Não	10 anos	moderada
6	50	F	Do lar	Não	Não	6 meses	discreta
7	48	M	Vigia de autos	Sim	Sim	15 anos	moderada
8	60	M	Lavrador	Não	Não	10 anos	moderada
9	52	M	Pintor	Sim	Não	5 anos	discreta
10	43	F	Do lar	Não	Não	1 ano	discreta
11	58	M	Lavrador	Sim	Não	20 anos	severa
12	62	M	Pedreiro	Sim	Não	5 anos	discreta
13	64	F	Do lar	Não	Não	10 anos	discreta
14	63	M	Marmoreiro	Não	Não	10 anos	moderada
15	55	M	Jardineiro	Não	Não	5 anos	moderada
16	67	M	Operário	Sim	Não	2 anos	discreta
17	62	F	Do lar	Não	Não	2 anos	discreta
18	52	F	Aux. limpeza	Não	Não	5 anos	discreta
19	48	M	Camelô	Sim	Sim	8 anos	moderada
20	57	M	Pedreiro	Não	Não	5 anos	discreta
21	53	F	Lavradora	Não	Não	10 anos	moderada
22	52	M	Camelô	Sim	Não	15anos	severa
23	49	M	Pescador	Sim	Não	10 anos	moderada
24	68	F	Costureira	Não	Não	3 anos	discreta
25	60	M	Feirante	Não	Não	8 anos	discreta
26	53	M	Pedreiro	Sim	Não	5 anos	discreta
27	59	M	Lavrador	Sim	Não	20 anos	moderada
28	61	F	Do lar	Não	Não	10anos	discreta
29	72	M	Motorista	Sim	Não	20 anos	moderada

ANEXO D - Grupo doente

	Ressec.	L. trans.	Descam.	Erit.	Adelg.	Leuco.	Fiss.	Elasto.	Crosta	Ulce.	Edema	Sint.	Sang.
1	+	+	+	+	+	+	Não	+	+	Não	Não	Não	Não
2	+	+	+	+	+	+	+	+	Não	+	+	Não	Não
3	+	Não	+	Não	Não	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não
4	+	+	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
5	+	+	Não	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
6	+	+	+	+	+	Não	+	Não	+	Não	Não	+	+
7	+	+	+	+	+	+	Não	+	Não	+	+	Não	Não
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não
9	+	Não	Não	+	+	Não	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10	+	+	Não	Não	+	Não	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não
11	+	+	+	+	+	+	Não	+	Não	+	Não	Não	Não
12	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
13	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
14	+	+	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
15	+	+	+	Não	Não	Não	+	+	Não	Não	Não	+	Não
16	+	+	+	+	Não	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não
17	+	+	+	Não	+	Não	+	Não	+	Não	Não	Não	Não
18	+	+	Não	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
19	+	+	+	Não	+	+	+	+	Não	+	Não	Não	Não
20	+	+	+	+	+	Não	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não
21	+	+	Não	+	+	+	Não	+	Não	Não	Não	Não	Não
22	+	+	+	+	+	+	Não	+	+	+	+	Não	Não
23	+	+	+	+	+	+	Não	+	+	Não	Não	Não	Não
24	+	+	Não	+	Não	Não	+	Não	+	Não	Não	Não	Não
25	+	+	+	+	+	Não	+	+	Não	Não	Não	Não	Não
26	+	+	+	+	Não	Não	+	Não	Não	Não	Não	Não	Não
27	+	+	+	+	+	+	Não	+	Não	+	Não	Não	Não
28	+	+	+	Não	+	+	+	+	Não	Não	Não	Não	Não
29	+	+	+	+	+	+	+	+	Não	+	Não	Não	Não

ANEXO E - Grupo controle

Número	Idade	Sexo	Profissão	Fumo	Álcool
1	59	M	Porteiro	Sim	Não
2	56	M	Segurança	Não	Não
3	58	F	Do lar	Não	Não
4	54	F	Costureira	Não	Não
5	52	M	Militar	Não	Não
6	55	M	Operário	Sim	Não
7	52	F	Faxineira	Sim	Não
8	58	M	Operário	Não	Não
9	53	M	Vendedor	Sim	Não
10	52	F	Vendedora	Não	Não
11	56	F	Do lar	Não	Não
12	59	M	Mecânico	Não	Não
13	55	M	Pedreiro	Sim	Sim
14	52	M	Vendedor	Não	Não
15	58	M	Aux. Adm.	Não	Não
16	57	F	Cabeleireira	Não	Não
17	54	M	Azulegista	Sim	Não
18	52	M	Borracheiro	Sim	Não
19	58	M	Engenheiro	Não	Não
20	52	F	Aux. enf.	Não	Não
21	53	M	Garçom	Sim	Não
22	54	M	Motorista	Sim	Não
23	53	F	Vendedora	Não	Não
24	60	F	Do lar	Não	Não
25	59	M	Cobrador	Não	Não
26	57	F	Faxineira	Não	Não
27	52	M	Advogado	Não	Não
28	55	M	Aux. Cont.	Sim	Não
29	56	M	Vendedor	Não	Não