

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA**

MAGNA CARVALHO DE MENEZES THIELE

**ESTUDO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES EM CITOLOGIA
EXFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS USUÁRIOS DE *CRACK***

CURITIBA

2009

MAGNA CARVALHO DE MENEZES THIELE

**ESTUDO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES EM CITOLOGIA
EXFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES USUÁRIOS DE *CRACK***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Adilson Soares
de Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ângela Naval
Machado

CURITIBA

2009



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO

MAGNA CARVALHO DE MENEZES THIELE

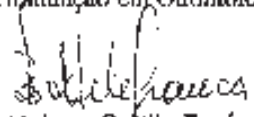
ESTUDO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES EM CITOLOGIA EXFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS USUÁRIOS DE CRACK

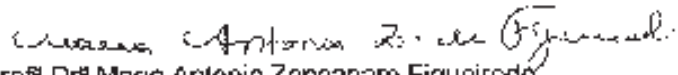
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do **Título de Doutor em Odontologia** Área de Concentração em **Estomatologia**.

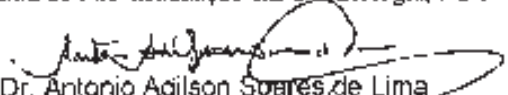
Orientador(a):


Profª Drª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Ana Maria Trindade Gregio
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Beatriz Helena Sottile Fraiça
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Maria Antonia Zancanaro Figueiredo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS


Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 04 de setembro de 2009.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Edilson, companheiro, amigo e amor da minha vida, por seu apoio, compreensão e incentivo.

Aos meus pais, Ivan e Edelweiss, farol de amor, porto seguro nos momentos difíceis, força que me guia na realização de mais um sonho.

Aos meus filhos, Luis Fernando e André Luis, presentes especiais de Deus, que trouxeram o verdadeiro significado para a minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por ser presença infinita em minha vida.

Aos meus irmãos Adriana e Alexandre por serem elos indispensáveis na minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, por seu incentivo, paciência e exemplo de dedicação. Obrigada por partilhar seus conhecimentos e me deixar fazer parte da sua linha de pesquisa que admiro tanto.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado, pela força, apoio e sábias palavras que me fizeram persistir na realização de mais um sonho.

A todos os pacientes do IPTA (Instituto Paranaense de Tratamento do Alcoolismo) por aceitarem participar deste trabalho e verdadeiros vencedores pela coragem de travarem a luta contra o vício.

AGRADECIMENTOS

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR, Prof. Dr. Sérgio Vieira, pela disponibilidade e atenção dispensada sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Westphalen, pela pronta disposição em nos atender e em especial por ter me incentivado a seguir adiante.

Ao coordenador do curso de Estomatologia, Prof. Dr. Paulo Henrique Couto, pela sua competência seriedade e atenção.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, exemplo de paciência, dedicação e eficiência. Sempre pronto a nos auxiliar nos árduos caminhos da estatística.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR, pelo conhecimento e disponibilidade de nos auxiliar sempre quando preciso.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Antonio Rosa, com quem aprendi a dar os primeiros passos na pesquisa acadêmica.

A todos os meus colegas de turma, parte mais preciosa deste Doutorado obrigada pela amizade e por fazerem parte da minha vida.

À secretária Neide Reis Borges, sempre disposta a nos ajudar e a resolver nossos problemas.

Às funcionárias Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR pela valiosa colaboração na realização das lâminas.

Aos colegas Luciana Grochocki, Iverson Woyceichoski, Elcy Pinto Arruda, Lisiane Cândido, companheiros de jornada até o IPTA, pela ajuda e amizade.

A todos os funcionários do IPTA pela acolhida e valiosa colaboração.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	04
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	05
AGRADECIMENTOS.....	06
ARTIGO EM PORTUGUÊS	07
ARTIGO EM INGLÊS.....	23
GUIDELINES OF JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY.....	39
ANEXOS.....	52

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Estudo das Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNORs) em Citologia exfoliativa na mucosa bucal de indivíduos usuários de *Crack*

MCM Thiele, AAS Lima, MAN Machado

Endereço para correspondência:

Departamento de Estomatologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP- 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil, Fone: (41)
3271-1637- Fax: (41) 3271-1405
e-mail: magnacm@terra.com.br

Palavras-chave: Regiões organizadoras nucleolares, citologia, mucosa bucal, cocaína,
crack.

RESUMO

O consumo de drogas ilícitas tem aumentado nos últimos anos. Este fato tem sido considerado um problema de saúde pública. O *crack*, forma fumável e economicamente viável da cocaína, tornou-se uma droga popular e consumida em todos os meios sociais. Esta droga é capaz de aumentar o risco ao desenvolvimento do câncer na mucosa brônquica e também provocar lesões ulceradas e queimaduras na mucosa bucal. O objetivo deste trabalho foi analisar as regiões organizadoras nucleolares (NORs) por meio da técnica de impregnação por prata (AgNORs) em células epiteliais da mucosa bucal em função do uso crônico de *crack*. A amostra foi composta por 60 indivíduos do sexo masculino divididos em dois grupos; grupo *crack* - 30 indivíduos usuários de *crack*; e grupo controle - 30 indivíduos saudáveis e que não faziam uso de qualquer droga ilícita. Amostras de células epiteliais da mucosa bucal foram obtidas de cada participante por meio da citologia exfoliativa em base líquida. Os esfregaços foram processados em laboratório e corados pela técnica do AgNOR. As NORs foram aleatoriamente contadas em 100 núcleos celulares por esfregaço usando a microscopia de luz. O teste *t de Student* foi aplicado e a média de NORs para os grupos *crack* e controle foram $7,1 \pm 2,7$ e $3,8 \pm 1,7$, respectivamente. A diferença entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$). Como as NORs estão diretamente relacionadas com a síntese protéica, este número elevado nas células do grupo *crack* reforça a hipótese de que a mucosa bucal dos indivíduos usuários de *crack* apresenta uma maior atividade proliferativa quando comparada a dos indivíduos não usuários.

Palavras-chave: Regiões organizadoras nucleolares, citologia, mucosa bucal, cocaína, *crack*.

INTRODUÇÃO

A cocaína é conhecida desde as mais antigas civilizações e muitas tribos indígenas a usavam como um agente estimulante. Esta droga foi introduzida na Medicina e Odontologia no final do século XIX por Köller devido as suas propriedades anestesiológicas¹⁻⁵. Farmacologicamente, a cocaína é classificada como um estimulante do sistema nervoso central. Os seus efeitos produzem euforia, júbilo, energia e aumento na sensação de confiança, seguidos de sensações de ansiedade, depressão e fadiga. Quando utilizada em doses elevadas, a cocaína é capaz de provocar estados psicóticos e alucinações^{2,6}.

Esta droga pode ser usada por via endovenosa, inalada ou fumada. A cocaína na forma fumável é denominada de *crack*². O seu uso tornou-se mais frequente principalmente a partir da década de 80 por ser economicamente mais viável. Várias alterações histopatológicas já foram identificadas no epitélio da mucosa traqueobronquial dos usuários, entre elas: hiperplasia de células basais, metaplasia escamosa, figuras de mitose, variação na morfologia nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma, espessamento da membrana basal e inflamação submucosa⁵.

Antes de atingir os pulmões, a fumaça do *crack* entra em contato com a mucosa bucal, no entanto, os estudos a respeito dos efeitos dessa droga sobre a boca ainda são escassos. Há registro de lesões da boca, orofaringe e laringofaringe associadas com as diferentes formas da cocaína, entre eles: erosões no esmalte dentário causadas pelo hidrócloro de cocaína aplicada intraoralmente; as lesões necróticas da língua e epiglote relacionadas ao fumo da cocaína pura e as queimaduras da mucosa da laringe ocasionadas pelo uso do *crack*⁷.

A toxicidade e a dependência são maiores nos usuários de *crack* que fazem uso também do álcool e outras drogas, e por usar o calor para o aquecimento das pedras de *crack* tem o seu potencial carcinogênico aumentado⁸⁻¹².

Por meio da utilização da técnica de pigmentação pela prata AgNOR, um grupo de proteínas nucleolares argirofílicas, conhecidas como as Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são marcadas seletivamente. As NORs são constituídas de

segmentos de DNA que contêm os genes para a produção de RNAr e podem ser visualizadas por meio da microscopia de luz como pontos pretos localizados no interior do núcleo celular. A histomarcagem pela prata das NORs segundo vários pesquisadores, constitui-se num método de mensuração da proliferação celular, e de diagnóstico precoce para o câncer bucal¹³⁻¹⁸.

LIMA *et al.* (2007)⁸ demonstraram que ocorrem alterações de natureza inflamatória na mucosa bucal de usuários de *crack*. Estruturalmente, as células epiteliais sofrem uma redução na área nuclear e na relação núcleo/citoplasma associadas a um aumento na área do citoplasma. Estes achados levantam a hipótese de que o *crack* seja capaz de aumentar a proliferação celular da mucosa bucal^{8,12}. Portanto, o presente trabalho visa analisar se há diferença entre o número de NORs em função do uso crônico de *crack* por meio da citologia exfoliativa em base líquida e pela quantificação de AgNORs nas células da mucosa bucal.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo teve o seu projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR (Processo N^o. 1422/08, Anexo I). Todos os participantes desta pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de participação na pesquisa (Anexo II).

AMOSTRA

A amostra empregada neste trabalho foi composta de 60 indivíduos adultos, do sexo masculino, pareados em idade e divididos em dois grupos: a) grupo *crack* composto por 30 indivíduos usuários de *crack* do Instituto Paranaense de Tratamento de Alcoólatras (IPTA) e b) grupo controle - 30 indivíduos saudáveis da Clínica

Odontológica da PUCPR e que não faziam uso de droga ilícita, álcool e tabaco. O critério de inclusão foi ausência de lesões na mucosa bucal para ambos os grupos e em relação ao grupo experimental, de que fossem somente usuários de *crack*.

Coleta das amostras

Inicialmente, os participantes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água para remover possíveis restos alimentares. Em seguida, foram realizados esfregaços na região posterior e superior da mucosa bucal próxima ao fundo de vestibulo por meio da técnica da citologia exfoliativa em base líquida. A coleta de células epiteliais foi realizada com um *kit* do sistema DNA-CITOLIQ[®] (Digene, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (UCM). Esta técnica executa a aplicação da escova de cerdas de nylon de forma suave e com movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas). Em seguida, a parte da escova que apresenta as cerdas foi mergulhada no interior do frasco contendo o UCM. O frasco tampado foi agitado por um período mínimo de 30 segundos para permitir que as células colhidas ficassem imersas no meio líquido. Ao término da coleta, as amostras foram levadas ao laboratório de Estomatologia da PUCPR para processamento.

PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Lâminas histológicas *Lamigene*[®] (Digene, Brasil) foram adaptadas numa prensa metálica *Prepgene*[®] (Digene, Brasil) juntamente com um filtro especial contendo uma membrana de policarbonato *Filtrogene*[®] (Digene, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 200µL foi transferida do interior do frasco para a superfície dos discos de filtro com o auxílio de uma micropipeta monocal. O *Prepgene* foi fechado para realizar a filtragem do esfregaço e promover a adesão das células sobre a lâmina.

Coloração

Para a realização da coloração das NORs, as lâminas foram fixadas em etanol a 95% durante doze horas. Em seguida, procedeu-se a técnica histoquímica de impregnação pela prata por 30min a 45°C em câmara escura, de acordo com a técnica preconizada por PLOTON *et al.* (1986)¹³.

Avaliação Histológica

A análise quantitativa das AgNORs foi executada por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX50 (Olympus, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus, Japão) e objetivas PLAN 100X/0,25 (Olympus, Japão), reguladas com objetiva de imersão (1000X). Previamente a leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para se evitar viés. O parâmetro utilizado para contagem foi definido como pontos enegrecidos bem definidos no interior dos nucléolos, conforme os critérios estabelecidos por CROCKER (1989)¹⁴. O processo de contagem das AgNORs foi realizado duas vezes pelo mesmo observador. O número de pontos escuros corados pela prata foi avaliado em 100 núcleos celulares para cada esfregaço. Núcleos com ausência de AgNORs não foram incluídos na contagem. Os nucléolos corados por prata semelhantes a um anel foram contados como se fosse um. Quando a agregação de pontos corados não podia ser visualizada como NORs individuais, também eram considerados como se fosse um só, conforme recomendado por Crocker (1989)¹⁴ e Trerè (2000)¹⁵.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Visando comparar se havia diferença estatisticamente significativa nos valores médios de AgNORs por núcleo entre os dois grupos de estudo, os dados foram submetidos ao teste t de *Student* para amostras independentes, com n = 30 em cada

grupo. A homogeneidade foi testada usando-se o teste de variância de Lévene e o nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

A média de idade dos participantes foi de 28,4 anos e o tempo médio de uso de *crack* pelos indivíduos do grupo experimental foi de 7 (\pm 1,9) anos. A figura 1 apresenta a distribuição da idade dos indivíduos do grupo *crack*.

As AgNORs estavam localizadas no interior do núcleo e eram visualizadas como pequenas estruturas com morfologia predominantemente arredondada, de coloração variando de castanho claro ao negro, em número e tamanhos variáveis (Figuras 2 e 3). Conforme ilustra a figura 4, o número de AgNORs foi significativamente mais elevado nas células da mucosa bucal dos indivíduos usuários de *crack* quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$). Os valores da média e os respectivos desvios-padrão são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Estatística descritiva do número médio de AgNORs por núcleo segundo os grupos

Grupos	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p
Grupo <i>crack</i>	30	7,1667	7,6500	2,7510	
Grupo controle	30	3,8867	3,4500	1,7055	< 0,001*

Fonte: Dados da pesquisa * Teste *t de Student* $p=0,0000012$

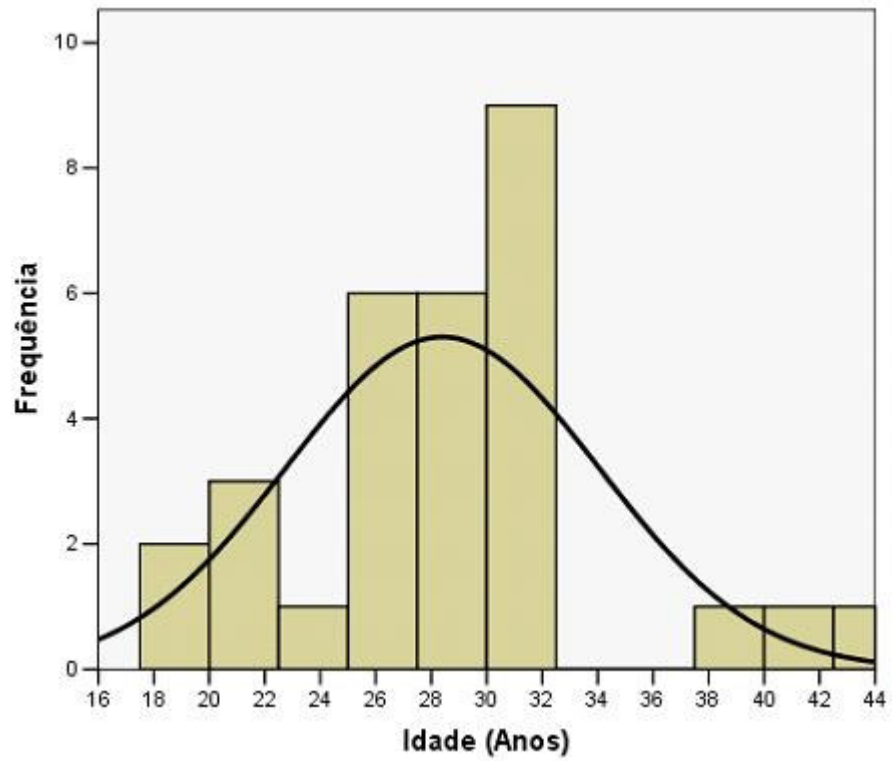


Figura 1 - Distribuição de idade dos indivíduos

Fonte: Autor



Figura 2 - Numerosos AgNORs (setas) em esfregaço de células da mucosa bucal de usuários de *crack* (AgNORs 1000X)

Fonte: O autor

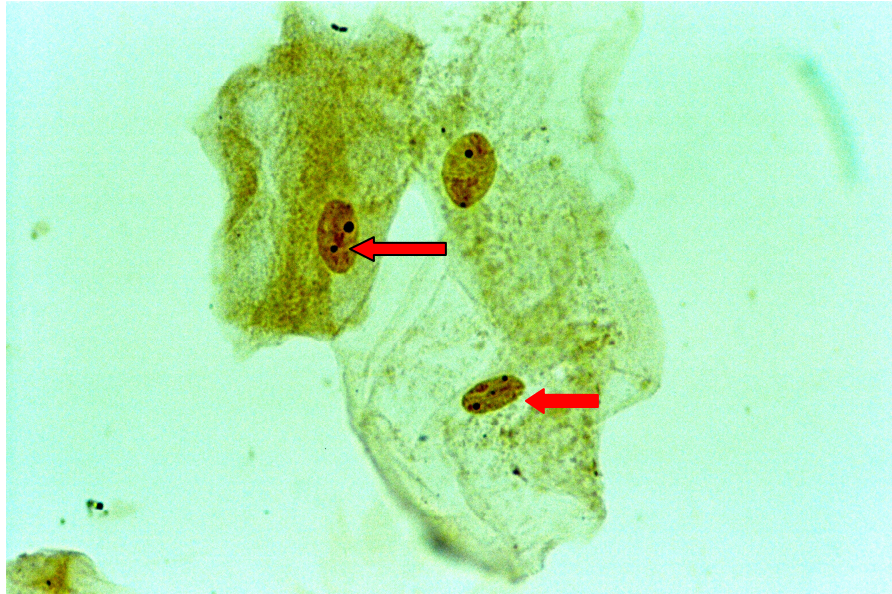


Figura 3 – Núcleos contendo reduzido número de AgNORs (setas) em células da mucosa bucal de indivíduos do grupo controle (AgNOR, 1000X).

Fonte: o autor

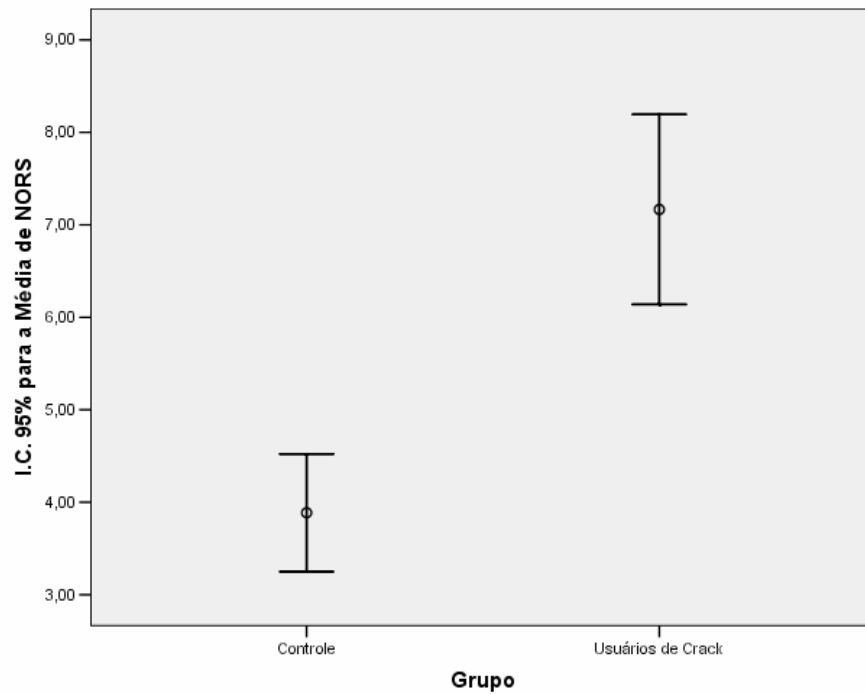


Figura 4- Intervalo de confiança (95%) para a média de AgNORs segundo grupo

Fonte: o autor

DISCUSSÃO

O presente estudo quantificou as regiões organizadoras nucleolares (NORs) no núcleo de células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos usuários e não usuários de *crack*. Um total de 6000 núcleos foi avaliado. As NORs representam segmentos de DNA que fazem a transcrição do RNAr, já que é no nucléolo que se realizam as primeiras etapas da síntese ribossômica. As NORs estão localizadas nas constrições dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e são visíveis no interior do nucléolo durante a intérfase. Estas estruturas possuem argirofilia, pois estão associadas com proteínas acídicas, não histônicas, sendo coradas seletivamente por meio da técnica por impregnação pela prata (AgNOR). Desta maneira, as AgNORs são visualizadas como pontos escuros intranucleares, que são quantificados por meio do uso da microscopia por luz.

O número de AgNORs por núcleo tem demonstrado uma associação com a proliferação celular e com o grau de diferenciação de vários tumores, por isso este marcador tem grande relevância no estudo do curso clínico e agressividade dos mesmos^{13,16-22,34}. Os resultados deste estudo revelaram que o número médio de AgNORs nos núcleos da mucosa bucal de usuários de *crack* praticamente duplica quando comparado com o das células de não usuários. Até a presente data, não há registros na literatura de estudos que tenham quantificado as AgNORs em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos usuários de *crack*. Os resultados deste trabalho corroboram os achados do estudo desenvolvido por WOYCEICHOSKI *et al.* (2007)¹² que utilizaram técnicas citomorfométricas para avaliar as células epiteliais da mucosa bucal de usuários de *crack*. Os resultados demonstraram que o uso crônico do *crack* foi capaz de induzir uma diminuição da área nuclear das células do epitélio da mucosa bucal e, conseqüentemente, alterar a relação núcleo/citoplasma. Estas modificações na área nuclear das células epiteliais podem ser o reflexo de uma resposta adaptativa da mucosa frente à agressão induzida pela droga. Vários estudos utilizando a técnica do AgNOR vêm demonstrando que a mucosa bucal aumenta a sua atividade proliferativa quando é exposta a diversos agentes agressores, tais como,

álcool, tabaco e cocaína. Todos estes agentes foram capazes de aumentar significativamente o número de AgNORs quando comparados com células de mucosa bucal de indivíduos não usuário de drogas^{9,10,23-26}, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho que indicam o aumento de AgNORs nos núcleos celulares da mucosa bucal de usuários de *crack*.

Acredita-se que os efeitos da cocaína na boca dependam da rota de administração da droga²⁷. Segundo MITCHELL-LEWIS *et al.* (1994)⁴, as lesões que ocorrem na mucosa bucal provocadas pela cocaína fumada em forma de *crack* acontecem muito mais provavelmente devido ao calor gerado sobre a mucosa durante o seu uso do que pela ação química da droga. Estudos realizados em esfregaços de mucosa traqueobrônquica e bucal demonstraram que a fumaça do *crack* pode ser capaz de produzir alterações celulares significativas^{5,8,12}. Na boca, o uso crônico do *crack* também é capaz de induzir alterações inflamatórias sobre a mucosa bucal⁸.

BARSKY *et al.* (1998)⁵ avaliaram se ocorriam alterações histopatológicas e moleculares no epitélio bronquial em fumantes de maconha, cocaína, *crack* e cigarro. Estes autores utilizaram vários marcadores celulares e, entre eles, o Ki-67, que é um marcador de proliferação celular que reflete a porcentagem de células envolvidas na divisão celular²⁸. Os resultados deste estudo demonstraram que ocorre uma expressão anormal de Ki-67 em amostras de usuários de drogas quando comparados com as de não usuários e levantam a hipótese de que usar maconha, tal qual fumar tabaco, exerce os efeitos de cancerização sobre o epitélio bronquial. Desta forma, estes autores sugerem a necessidade de se realizarem estudos adicionais com a cocaína e o *crack*, pois pouco se sabe do seu potencial carcinogênico e do seu papel no desenvolvimento do tumoral.

Os marcadores de proliferação celular que avaliam as modificações em nível celular têm sido muito utilizados proporcionando um melhor entendimento do comportamento biológico de várias alterações patológicas, em especial, quando não há nenhum sinal clínico. A análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares (NORs) permite avaliar o nível de proliferação celular, e conseqüentemente o monitoramento de lesões com propensão a malignidade^{9,10,33}.

O número, o tamanho e arranjo de AgNORs têm mostrado correlação com os indicadores de atividade proliferativa celular e é consenso entre os pesquisadores que o número de sítios de AgNORs aumenta com a diminuição da diferenciação celular^{14-18,21,23}. Desta forma, os estudos de análise quantitativa de AgNORs por núcleo em células de carcinoma escamoso, tumores de glândulas salivares, epitélio displásicos, hiperplásicos e normal têm demonstrado uma forte correlação com o aumento de AgNORs, proliferação celular e malignidade^{21,22,29}.

Além disso, sabe-se que a cocaína é um potente modulador imunológico. A exposição dos pulmões à droga é capaz de inibir a função e produção de citocinas pelos macrófagos limitando a capacidade destes em eliminar tanto as bactérias quanto as células tumorais. Estes efeitos aumentam a susceptibilidade dos usuários em desenvolverem câncer e também a síndrome da imunodeficiência adquirida^{5,30,31}.

Manifestações bucais podem ser observadas entre os usuários de *crack*. Na literatura, há relatos da ocorrência de bruxismo, erosão dentária causada pelo uso da droga e sintomatologia dolorosa da articulação temporo-mandibular^{1-4,6-8,11,27,32}. Além disso, acontecem lesões em tecido mole, tais como: lesões necróticas na língua, gengiva e mucosa bucal e também sialometaplasia necrosante do palato, associadas ao calor intenso pelo uso do cachimbo e provavelmente pelos próprios componentes químicos da droga^{11,27,32}.

Os achados do presente estudo nos permitem concluir que usuários de *crack* apresentam uma maior expressão de AgNORs. Desta forma, como o aumento de consumo desta droga é uma realidade social e muitas vezes estes pacientes buscam a assistência odontológica, torna-se necessário que o cirurgião-dentista tenha conhecimento deste risco, monitorando da melhor maneira possível a saúde oral destes indivíduos.

REFERÊNCIAS

1. GOODGER NM, WANG J, POGREL MA. Palatal and nasal necrosis resulting from cocaine misuse. *Br Dental J.* 2005, 198 (6): 333-334.
2. CAMERON YS, LEE DMD, MOHAMMADI H, DIXON RA. Medical and dental implications of cocaine abuse. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991, 49 (3): 290-293.
3. BROWN RS, JOHNSON CD. Corrosion of dental gold restorations from inhalation of crack cocaine. *Gen Dent.* 1994, 42 (3): 241-246.
4. MITCHELL-LEWIS DA, PHELAN JA, KELLY RB, BRADLEY JJ, LAMSTER IB. Identifying oral lesions associated with crack cocaine use. *J Am Dent Assoc.* 1994, 125 (25): 1104-1108.
5. BARSKY SH; ROTH MD, KLEERUP EC; SIMMONS M; TASHKIN DP. Histopathologic and molecular alterations in bronchial epithelium in habitual smokers of marijuana, cocaine, and/or tobacco. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90 (16): 1198-1205.
6. ASTON R. Drug abuse. Its relationship to dental practice. *Dent Clin North Am.* 1984, 28 (3): 595-610.
7. BEZMALINOVIC Z, GONZALEZ M, FARR C. Oropharyngeal injury possibly due to free-base cocaine. *N Engl J Med.* 1988, 319 (21):1420-1.
8. LIMA AAS, WOYECEICHOSKI IEC, BATISTA AMT, IGNACIO AS, MACHADO MAN et al. Cytopathological changes in oral epithelium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline.* 2007, 1: 31-40.
9. SAMPAIO HDEC, LOYOLA AM, GOMEZ RS, MESQUITA RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytol.* 1999, 43 (2): 117-20.

10. GEDOZ L, LAUXEN IS, SANT'ANA FILHO M, RADOS PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol. A longitudinal study using the AgNOR Stainig Technique. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007, 29 (4): 231-238.
11. PARRY J, PORTER S, SCULLY C, FLINT S, PARRY MG. Mucosal lesions due to oral cocaine use. *Br Dental J.* 1996, 180 (12): 462-464.
12. WOYCEICHOSKI IE, ARRUDA EP, RESENDE LG, MACHADO MA, GRÉGIO AM, AZEVEDO LR, LIMA AA. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105 (6): 745-749.
13. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986, 18 (1): 5-14.
14. CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol.* 1989,158 (3):185-188.
15. TRERÈ D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000, 31 (2):127-31.
16. DERENZINI M , TRERE D,PESSION A, MONTANARO L, SIRRI V ,OCHST RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol .* 1998, 152 (5): 1291-1297.
17. OLIVEIRA MG, LAUXEN IS, SANT'ANA FILHO M. O que são regiões organizadoras nucleolares (NORs) e qual a utilidade da técnica de AgNOR. *Rev Odontol Cienc.* 1999, 28 : 129-139.
18. DERENZINI M. The AgNORs. *Micron.* 2000, 31(2):117-20.
19. CECCARELLI C, TRERÈ D, SANTINI D, TAFFURELLI M, CHIECO P, DERENZINI M . AgNORs in breast tumours, *Micron.* 2000, 31(2): 143-149.
20. PICH A, CHIUSA L, MARGARIA E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000, 31(2):133-141.

21. MEDEIROS AMC, AZEREDO APR, OLIVEIRA MDC, FREITAS RA. Argirofilia da Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNORS) em epitélio oral normal, hiperplásico e displásico. *Rev. ABO Nac.* 2002, 10 (4): 230-234.
22. ADEYENI BF, KOLUDE BM, AKANG EE, LAWYOIN JO. A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumours. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006, 102 (4): 513-520.
23. CANÇADO RP, YURGEL LS, SANT'ANA FILHO M. Evaluation of the nuclear organizer region associated proteins in exfoliated cytology of normal bucal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol.* 2001, 37 (5): 446-54.
24. PAIVA R L, SANT'ANA FILHO M, BOHRER PL, LAUXEN IDAS, RADOS PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004, 26 (3): 175-80.
25. CARRARD VC, FILHO MS, RADOS PV, CHAVES AC, LAUXEN IDAS. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. *Alcohol.* 2004, 34 (2-3): 233-8.
26. CAMPOS FONTES P, MARQUES CORRÊA GH, SCHOLZ ISSA J, ALMEIDA JD. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008, 30 (1): 16-24.
27. GANDARA-REY JM, DINIZ-FREITAS M, GANDARA-VILA P, BLANCO-CARRION A, GARCIA-GARCIA A. Lesions of the oral mucosa in cocaine users who apply the drug topically. *Med Oral .* 2002, 7(2):103-7.
28. ROSS DA, HUAMAN JA, BARSKY SH. A study of the heterogeneity of the mucoepidermoid tumor and the implication of future therapies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992, 118 (11):1172-8.
29. SULKOWSKA M, FAMULSKI W, KASACKA I, SULKOWISK S, MILLER-FAMULSKA D, KODA M. Proliferating activity in oral dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001, 39 (2):191-2.

30. BALDWIN GC, BUCKEY DM, ROTH MD, KLEERUP EC, TASHKIN DP. Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. A potential etiology for pulmonary injury . Chest .1997, 111 (3): 698-705.
31. BALDWIN GC, TASHKIN DP, BUCLEY DM, PARK AN, DUBINETT SM, ROTH MD. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1997, 156 (5): 1606-13.
32. FAVA M, CHERUBINI K, YURGEL L, SALUM F, FIGUEIREDO MA. Necrotizing sialometaplasia of the palate in a cocaine-using patient. A case report. Minerva Stomatol. 2008, 57 (4): 199-202.
33. BUSTOS AIO, SANTANDER ILE, MATÍNEZ MEF, JAIMES-FRYRE NL, PINTO AVO. Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. Med Oral. 2004, 9: 97-203.
34. SIRRI V; ROUSSEL P, HERNANDEZ-VERDEEN D. The AgNOR proteins: qualitative change during the cell cycle. Micron. 2000, 31(2): 121-126.

ARTIGO EM INGLÊS**Study of the Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Exfoliative Cytology in the Oral Mucosa of *Crack* Users**

MCM Thiele, AAS Lima, MAN Machado

Stomatology Department, Post-Graduation in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Mailing address: Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP- 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil,- Phone: (41) 3271-1637- Fax: (41) 3271-1405

e-mail: magnacm@terra.com.br

Key words: Nucleolar organizer regions, cytology, oral mucosa, *crack*-cocaine.

SUMMARY

The consumption of illicit drugs has been increasing in the last years. This fact has been considered a public health issue. *Crack*, the smokable and more affordable form of cocaine, has become a popular drug and has been consumed in all social strata. This drug is able to increase the risk of the development of bronchial mucosa cancer and also cause ulcerative lesions and burns in the oral mucosa. The purpose of this study is to analyze the nucleolar organizer regions (NORs) by using the silver impregnation technique (AgNORs) in epithelial cells of the oral mucosa due to the chronic use of *crack*. The sample was composed of 60 male individuals divided into two groups; group I - 30 *crack* users; and group II (control) - 30 healthy individuals who do not make use of any illicit drug. Samples of epithelial cells of the buccal mucosa were obtained from each participant through the use of exfoliative cytology in a liquid basis. The smears were processed in the laboratory and colored by AgNOR technique. The NORs were randomly counted in 100 cellular nuclei per smear using light microscopy. Student's *t* test was applied and the average amounts of NORs for the crack users and the control groups were 7.1 ± 2.7 e 3.8 ± 1.7 , respectively. The difference between the groups was statistically different ($p < 0.001$). As the NORs are directly related to protein synthesis, this large amount in the *crack* group cells reinforces the hypothesis that the oral mucosa of crack users presents an increased cell activity if compared to non-users.

Key words: Nucleolar organizer regions, cytology, oral mucosa, *crack*-cocaine.

INTRODUCTION

Cocaine has been known since the most ancient civilizations and many indigenous tribes used it as a stimulating agent. This drug was introduced to medicine and dentistry in the late 19th century by Köller due to its anesthesiological properties¹⁻⁵. Pharmacologically, cocaine is classified as a central nervous system stimulant. Its effects are joy, energy and an increased self-confidence sensation, followed by anxiety, depression and fatigue. When utilized in high doses, cocaine is able to trigger hallucinations and psychotic cases^{2,6}.

This drug can be inhaled, smoked or used intravenously. Cocaine, when smoked, is named *crack*². Its use has become more frequent, especially after the nineteen-eighties, for being more affordable. Many histopathological alterations have already been identified in the epithelium of the tracheobronchial mucosa: basal cell hyperplasia, squamous metaplasia, mitosis figures, variation in nuclear morphology, increased nucleus/cytoplasm ratio, thickening of the basal membrane and submucous inflammation amongst others⁵.

Before reaching the lungs, *crack* smoke comes into contact with the oral mucosa. However, there are few studies on the effects in the mouth caused by this drug. There are records of mouth, oropharynx and laryngopharynx lesions related to the different forms of cocaine: dental enamel erosion caused by the cocaine hydrochloride applied intraorally; necrotic lesions in the tongue and epiglottis related to smoking base-free cocaine and larynx mucosa burns caused by *crack* use, amongst others⁷. The degree of toxicity and dependence is higher in *crack* users who also make use of alcohol and other drugs, and the high temperatures used to for heating the *crack* rocks magnify its carcinogenic potential⁸⁻¹².

By utilizing the AgNOR silver impregnation technique, a group of argyrophilic nucleolar proteins, known as Nucleolar Organizer Regions (NORs) are selectively distinguished. The NORs consist of DNA segments containing the genes for the production of RNAr and can be visualized by light microscopy as black dots located inside the cellular nucleus. The histologic distinction performed by the silver in the

AgNORs according to several researchers, is a method for measuring the cellular proliferation, and for an early diagnosis of oral cancer¹³⁻¹⁸.

LIMA *et al.* (2007)⁸ have demonstrated that there are alterations of an inflammatory nature in the oral mucosa of *crack* users. Structurally, the epithelial cells suffer a decrease in the nuclear area and in the nucleus/cytoplasm ratio, associated to an increase in the cytoplasmic area. These findings raise the hypothesis that *crack* may be able to increase cellular proliferation of the oral mucosa^{8,12}.

The aim of this study is to analyze if there is a difference between the number of NORs due to the chronic use of *crack* through the use of liquid-base exfoliative cytology and through the quantification of AgNORs in the oral mucosa epithelial cells.

MATERIAL AND METHOD

This study was approved by the Research Ethics Committee at Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR (Process number 1422/08). All participants in this research signed a Term of Consentment for participating in this research .

Sample

The sample employed in this study was composed by 60 male adults, paired in age and divided in two groups: a) *crack* group - composed by 30 *crack* cocaine users from Institute for Treatment of Alcoholics of the State of Paraná (IPTA) and b) Control group - 30 health individuals from the Dental Clinic of PUCPR and who did not make use of any illicit drug, alcohol and tobacco. The inclusion criteria was the absence of oral lesions and for experimental group being only *crack* users.

Cells collection

Initially, the participants were directed to rinse their mouths with water in order to remove possible rests of food. Afterwards, smears were taken from the upper part of the buccal mucosa through the exfoliative cytology technique in liquid basis. Epithelial cell collection was performed using a kit from the DNA-CITOLIQ[®] system (Digene, Brazil), named *Universal Collection Medium* (UCM). This technique carries out the application of the nylon brush with soft clockwise circular movements (five times). Afterwards, the bristles were dipped inside the recipient which holds the UCM. The closed recipient was shaken for a period of at least 30 seconds in order to allow the collected cells to be immersed in liquid. Upon termination of the collection, the samples were taken to the Stomatology laboratory at PUCPR for processing.

Laboratory Processing

Histological slides were adapted in a Prepgene[®] (Digene, Brazil) metal press along with a special filter containing a Filtrogene[®] (Digene, Brazil) polycarbonate membrane. Afterwards, a 200 μ L aliquot was transferred from the interior of the recipient to the surface of the filter disks with the assistance of a monocal micropipette. The Prepgene was closed in order to filter the swab and promote the adherence of the cells to the blade.

Staining method

For the staining of the NORs, the smears were fixed in ethanol at 95% during 12 hours. Afterwards, the impregnation by silver histochemical technique was carried out

for 30min at 45°C in a dark room, in accordance with the technique preconized by PLOTON *et al.* (1986)¹³.

Histological assessment

The quantitative analysis of the AgNORs was carried out through light microscopy utilizing an Olympus BX50 (Olympus, Japan) binocular microscope adapted with a WH 10X-H/22 ocular (Olympus, Japan) and PLAN 100X/0.25 (Olympus, Japan), lenses regulated water immersion lenses (1000X). Prior to the analysis, the slides had their identification numbers covered in order to avoid bias. The parameter utilized for counting was defined as well defined blackened points in the interior of the nucleoli, in accordance with the criteria established by CROCKER (1989)¹⁴. The process of counting the AgNORs was carried out by the same observer. The number of dark points colored by silver was evaluated in 100 cell nuclei for each smear. Nuclei with an absence of AgNORs were not included in the count. The nucleoli colored by silver similar to a ring were counted as if they were one. When the assemblage of colored points could not be viewed as individual NORs, they were also considered as only one, in accordance with the recommendations by Crocker (1989)¹⁴ and Trerè (2000)¹⁵.

Statistical Analysis

With the intent of comparing if there were statistically relevant differences in the average AgNOR per nuclei values between the two study groups, the results were submitted to the t test of *student* for independent samples, once n=30 in each group. The homogeneity was tested employing Levene's Variance Test and the level of significance was 5%.

RESULTS

The age average of the participants was of 28.4 years of age, and the average time of drug consumption was of seven years (± 1.9 years). Figure 1 shows the age distribution of the individuals in *crack* Group.

The AgNORs were located in the nucleus interior and were visualized as small structures with a predominantly rounded morphology, with its coloring varying from light brown to black, in various forms and numbers (Figures 2 and 3)

As figure 4 shows, NORs number was significantly higher in the oral cell mucosa of crack cocaine users as compared to the control group ($p < 0.001$). The average values and its respective standard deviations are shown on Table 1.

Table 1 – Descriptive statistics of the nuclear organizing regions according to the groups.

Group	n	Average	Median	Std. Dev..	p Value
<i>crack</i>	30	7.1667	7.6500	2.7510	< 0.001*
control	30	3.8867	3.4500	1.7055	

Source: Research data * *t Student's test* $p=0.0000012$

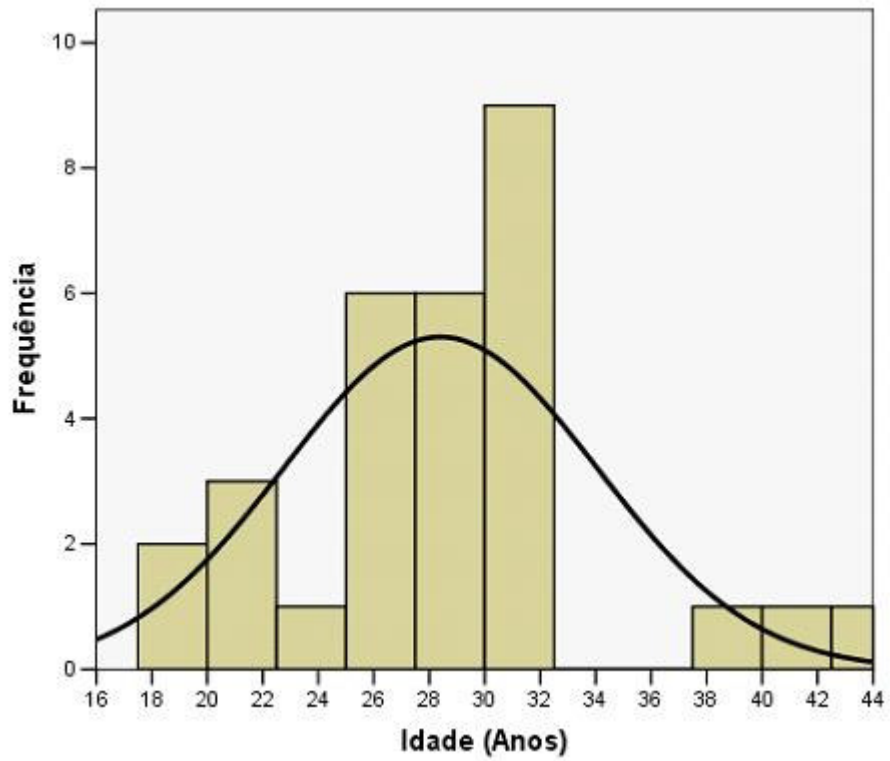


Figure 1 – Age distribution of individuals

Source: Author



Figure 2 - Numerous AgNORs in epithelial cell of *crack* cocaine user (AgNORs 1000X)

Source: Author

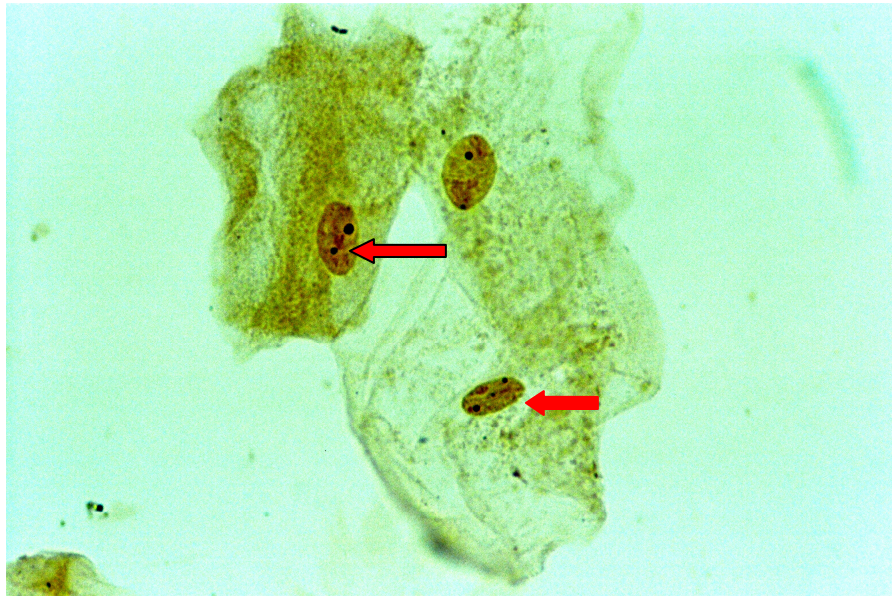


Figure 3 – Nuclei containing reduced number of AgNORs in oral smear of *crack* cocaine non-user (AgNOR, 1000X)

Source: Author

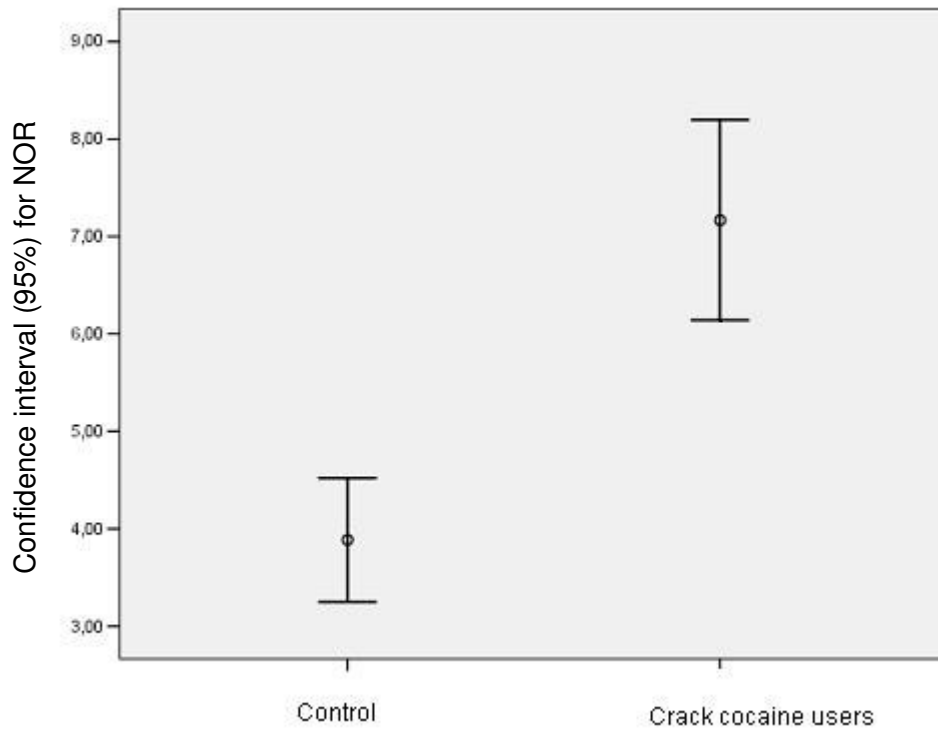


Figure 4- Confidence interval (95%) for the NOR average according to the group

Source: Author

DISCUSSION

This study quantified the nucleolar organizer regions (NORs) in the nucleus of oral mucosa epithelial cells of crack users and non-users. A total of 6000 nuclei was evaluated. The NORs represent DNA segments responsible for the transcription of the RNAr, since the first steps of the ribosome synthesis. The NORs are located in the constrictions of the acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21 e 22 and are visible in the interior of the nucleolus during interphase. These structures are argyrophilic, since they are associated with acidic proteins, not histonic, and are selectively colored through the silver impregnation technique (AgNOR). In this way, the AgNORs are visualized as dark intranuclear points, which are quantified through the use of light microscopy.

The AgNOR number per nucleus has demonstrated a correlation with the cell proliferation and with the differentiation degree of various tumors; thus, this marker is of great relevance in the study of their clinical course and aggressiveness^{13,16-22,34}. The results of these studies have revealed that the average AgNOR number in the oral mucosa nuclei of crack users is practically doubles when compared with the cells of non-users. So far, there have not been records in studies that have evaluated the proliferation degree of the oral mucosa regarding the aggression imposed by the crack smoke. The results of our work corroborate the findings of the study developed by WOYCEICHOSKI et al.(2007)¹², where cytomorphometric techniques were utilized to evaluate the oral mucosa epithelial cells of crack users. The results demonstrated that the chronic use of crack was capable of causing a decrease in the nuclear area of the oral mucosa epithelial cells and consequently altering the nucleus/cytoplasm ratio. These modifications in the nuclear area of the epithelial cell may be the reflex of an adaptive response of the mucosa to an aggression caused by the drug. Various studies which utilize the AgNOR technique have demonstrated that the mucosa increases its proliferative activities when insulted by several attacking agents, such as alcohol, tobacco and cocaine. All these agents have been capable of increasing significantly the AgNOR number when compared with oral mucosa cells of individuals who do not make use of drugs^{9,10,23-26}.

It is believed that the effects of cocaine in the mouth depend on the administration route of the drug²⁷. According to Mitchell-Lewis et al. (1994)⁴, the lesions which occur in the oral mucosa caused by cocaine smoked as crack take place more probably due to the heat generated on the mucosa during its use than to the chemical action of the drug.

Studies performed on oral and tracheobronchial mucosa smears demonstrated that the crack smoke may be capable of producing significant cellular alterations^{5,8,12}. In the mouth, the chronic use of crack is also capable of causing inflammatory alteration on the oral mucosa⁸.

BARSKY *et al.* (1998)⁵ evaluated if molecular and histopathological alterations in the bronchial epithelium took place in marijuana, cocaine and cigarette smokers, and in non-smokers. These authors utilized many cellular markers and, among them, the Ki-67. The results of this study demonstrated that there is an abnormal expression of Ki-67 in samples of drug users when compared to non-users. Ki-67 is a cellular proliferation marker which reflects the percentage of cells involved in cell division²⁷. The results of this study raised the hypothesis that using crack, in the same way as tobacco, exerts cancerization effects on the bronchial epithelium. In this way, these authors suggest the necessity of carrying out studies with cocaine and crack, since little is known about its carcinogenic potential and its role in tumor development.

The cellular proliferation markers which evaluate the modifications on a cellular level have been widely utilized lately, providing a better understanding of the biological behavior of various pathological alterations, especially in the absence of clinical signs. The quantitative analysis of the nucleolar organizing regions (NORs) allows the evaluation of the cellular proliferation level, and consequently the monitoring of the lesions with a propensity to malignity^{9,10,33}.

The number, size and arrangement of AgNORs have shown a correlation with the indicators of cellular proliferative indicators and it is a consensus among researchers that the number of AgNOR sites augments with the decrease in cellular differentiation^{14-18,21,23}. Thus, the studies on quantitative analysis of AgNORs per cell nucleus in squamous cells carcinoma, salivary gland cancer, dysplastic, hyperplastic

and normal epithelium, have demonstrated a strong correlation with the increase in AgNORs, cellular proliferation and malignity^{21,22,29}.

In addition, it is known that cocaine is a powerful immune modulator. Exposing the lungs to the drugs may inhibit its functioning and the production of cytokines by the macrophages limiting their capacity of eliminating bacteria as well as tumor cells. These effects increase the users' susceptibility in developing cancer and also the acquired immunodeficiency syndrome^{5,30,31}.

Oral manifestations may be observed amongst *crack* users. There are printed records of bruxism, dental erosion caused by drug use, painful symptomatology of the temporomandibular and miofascial joints^{1-4,6-8,11,27,32}. Moreover, there are also lesions in the soft tissue, such as: necrotic lesions on the tongue, gums and oral mucosa associated with the intense heat caused by the use of the pipe as well as the chemical components of the drug and necrotizing sialometaplasia on the palate^{11,27,32}.

The findings of this study allow us to conclude that this high AgNOR expression suggests that smoking cocaine in the form of crack influences the proliferative activity of the oral mucosa cells. Thus, as an increased consumption of this drug is a current social reality, and many times patients seek dental assistance, it becomes necessary that the dental Professional becomes aware of this risk, monitoring these individuals oral health in the best possible manner.

REFERENCES

1. GOODGER NM, WANG J, POGREL MA. Palatal and nasal necrosis resulting from cocaine misuse. *Br Dental J.* 2005, 198 (6): 333-334.
2. CAMERON YS, LEE DMD, MOHAMMADI H, DIXON RA. Medical and dental implications of cocaine abuse. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991, 49 (3): 290-293.
3. BROWN RS, JOHNSON CD. Corrosion of dental gold restorations from inhalation of crack cocaine. *Gen Dent.* 1994, 42 (3): 241-246.
4. MITCHELL-LEWIS DA, PHELAN JA, KELLY RB, BRADLEY JJ, LAMSTER IB. Identifying oral lesions associated with crack cocaine use. *J Am Dent Assoc.* 1994, 125 (25): 1104-1108.
5. BARSKY SH; ROTH MD, KLEERUP EC; SIMMONS M; TASHKIN DP. Histopathologic and molecular alterations in bronchial epithelium in habitual smokers of marijuana, cocaine, and/or tobacco. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90 (16): 1198-1205.
6. ASTON R. Drug abuse. Its relationship to dental practice. *Dent Clin North Am.* 1984, 28 (3): 595-610.
7. BEZMALINOVIC Z, GONZALEZ M, FARR C. Oropharyngeal injury possibly due to free-base cocaine. *N Engl J Med.* 1988, 319 (21):1420-1.
8. LIMA AAS, WOYECEICHOSKI IEC, BATISTA AMT, IGNACIO AS, MACHADO MAN et al. Cytopathological changes in oral epithelium induced by crack cocaine smoking. *Pharmacologyonline.* 2007, 1: 31-40.
9. SAMPAIO HDEC, LOYOLA AM, GOMEZ RS, MESQUITA RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytol.* 1999, 43 (2): 117-20.

10. GEDOZ L, LAUXEN IS, SANT'ANA FILHO M, RADOS PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol. A longitudinal study using the AgNOR Stainig Technique. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007, 29 (4): 231-238.
11. PARRY J, PORTER S, SCULLY C, FLINT S, PARRY MG. Mucosal lesions due to oral cocaine use. *Br Dental J.* 1996, 180 (12): 462-464.
12. WOYCEICHOSKI IE, ARRUDA EP, RESENDE LG, MACHADO MA, GRÉGIO AM, AZEVEDO LR, LIMA AA. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105 (6): 745-749.
13. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986, 18 (1): 5-14.
14. CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol.* 1989, 158 (3): 185-188.
15. TRERÈ D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000, 31 (2): 127-31.
16. DERENZINI M, TRERE D, PESSION A, MONTANARO L, SIRRI V, OCHST RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol.* 1998, 152 (5): 1291-1297.
17. OLIVEIRA MG, LAUXEN IS, SANT'ANA FILHO M. O que são regiões organizadoras nucleolares (NORs) e qual a utilidade da técnica de AgNOR. *Rev Odontol Cienc.* 1999, 28 : 129-139.
18. DERENZINI M. The AgNORs. *Micron.* 2000, 31(2): 117-20.
19. CECCARELLI C, TRERÈ D, SANTINI D, TAFFURELLI M, CHIECO P, DERENZINI M. AgNORs in breast tumours, *Micron.* 2000, 31(2): 143-149.
20. PICH A, CHIUSA L, MARGARIA E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000, 31(2): 133-141.

21. MEDEIROS AMC, AZEREDO APR, OLIVEIRA MDC, FREITAS RA. Argirofilia da Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNORS) em epitélio oral normal, hiperplásico e displásico. *Rev. ABO Nac.* 2002, 10 (4): 230-234.
22. ADEYENI BF, KOLUDE BM, AKANG EE, LAWYOYIN JO. A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumours. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006, 102 (4): 513-520.
23. CANÇADO RP, YURGEL LS, SANT'ANA FILHO M. Evaluation of the nuclear organizer region associated proteins in exfoliated cytology of normal bucal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol.* 2001, 37 (5): 446-54.
24. PAIVA RL, SANT'ANA FILHO M, BOHRER PL, LAUXEN IDAS, RADOS PV. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004, 26 (3): 175-80.
25. CARRARD VC, FILHO MS, RADOS PV, CHAVES AC, LAUXEN IDAS. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. *Alcohol.* 2004, 34 (2-3): 233-8.
26. CAMPOS FONTES P, MARQUES CORRÊA GH, SCHOLZ ISSA J, ALMEIDA JD. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008, 30 (1): 16-24.
27. GANDARA-REY JM, DINIZ-FREITAS M, GANDARA-VILA P, BLANCO-CARRION A, GARCIA-GARCIA A. Lesions of the oral mucosa in cocaine users who apply the drug topically. *Med Oral .* 2002, 7(2):103-7.
28. ROSS DA, HUAMAN JA, BARSKY SH. A study of the heterogeneity of the mucoepidermoid tumor and the implication of future therapies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992, 118 (11):1172-8.
29. SULKOWSKA M, FAMULSKI W, KASACKA I, SULKOWISK S, MILLER-FAMULSKA D, KODA M. Proliferating activity in oral dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001, 39 (2):191-2.

30. BALDWIN GC, BUCKEY DM, ROTH MD, KLEERUP EC, TASHKIN DP. Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. A potential etiology for pulmonary injury . Chest .1997, 111 (3): 698-705.
31. BALDWIN GC, TASHKIN DP, BUCLEY DM, PARK AN, DUBINETT SM, ROTH MD. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1997, 156 (5): 1606-13.
32. FAVA M, CHERUBINI K, YURGEL L, SALUM F, FIGUEIREDO MA. Necrotizing sialometaplasia of the palate in a cocaine-using patient. A case report. Minerva Stomatol. 2008, 57 (4): 199-202.
33. BUSTOS AIO, SANTANDER ILE, MATÍNEZ MEF, JAIMES-FRYRE NL, PINTO AVO. Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. Med Oral. 2004, 9: 97-203.
34. SIRRI V; ROUSSEL P, HERNANDEZ-VERDEEN D. The AgNOR proteins: qualitative change during the cell cycle. Micron. 2000, 31(2): 121-126.

GUIDELINES OF JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY

[Official Publication of the International Association of Oral Pathologists, The American Academy of Oral & Maxillofacial Pathology, The British Society for Oral & Maxillofacial Pathology, the British Society for Oral Medicine and the Scandinavian Society of Oral Pathology & Oral Medicine](#)

Edited by:Erik Dabelsteen

Print ISSN: 0904-2512

Online ISSN: 1600-0714

Frequency: Ten times a year

Current Volume: 38 / 2009

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 22/51 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine); 36/66 (Pathology)

Impact Factor: 1.711

AUTHOR GUIDELINES

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Relevant Documents: [Copyright Transfer Agreement](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Authors are encouraged to visit [Blackwell Publishing Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see [Conflicts of Interest](#) for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading "Conflict of Interest Statement".

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles

published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Copyright Transfer Agreement does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors, an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to download a copy of the form from www.wiley.com/go/ctaaglobal.

Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the form at submission. Please post the completed form back to the Production Editor (contact details below).

TEO Chin Yin

Senior Production Editor

Journal Content Management Department

Wiley Services Singapore Pte Ltd

600 North Bridge Road, # 05-01

Parkview Square, Singapore 188778

t +65 6511 8242; f +65 6511 8288

email cyteo@wiley.com

For questions concerning copyright, please visit [Copyright FAQ](#).

3. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

3.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages (excluding figures and tables) are subject to a charge of USD163.00 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

3.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid

inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

3.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental

procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see [Conflicts of Interest](#) for

generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

3.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp . Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

3.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected

Figures divided into parts should be labeled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures: www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp.

Check your electronic artwork before submitting it: www.blackwellpublishing.com/bauthor/eachecklist.asp

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

ANEXOS

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0001422/08**Protocolo CEP Nº **2165**

Título do projeto **Estudo das regiões organizadoras nucleolares em citologia
esfoliativa da mucosa bucal em pacientes usuários de crack**

Grupo **III**Versão **2**Protocolo CONEP **0432.0.084.00-07**Pesquisador responsável **Magna Carvalho de Meneses Thiele**

Instituição

Objetivos

GERAL:

Avaliar a eficácia do emprego da técnica da citologia em base-líquida pela Odontologia no diagnóstico de lesões na mucosa bucal.

ESPECÍFICOS:

- Analisar por meio da citologia exfoliativa em base-líquida se ocorre alterações no grau de proliferação celular das células da mucosa bucal em função do uso de crack.
- Analisar se ocorre diferença entre o número de NORs em função do uso crônico de crack.

Comentários

A população que será investigada neste estudo constituir-se-á de indivíduos adultos, brasileiros do Instituto Paranaense de Tratamento de Alcoólatras (IPTA) e pacientes da Clínica Odontológica da PUCPR.

A amostra empregada neste experimento será composta de 60 indivíduos adultos, do sexo masculino , divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1- 30 indivíduos usuários de crack

Grupo 2 - 30 indivíduos saudáveis com idade pareada com o grupo1, que não fazem uso de nenhum tipo de droga ilícita.

O material será coletado nos pacientes em tratamento no IPTA grupo1 (Instituto Paranaense de tratamento de Alcoólatras) e na clínica integrada da PUC PR.

Os indivíduos do grupo 1 serão selecionados , por serem usuários de crack e os pacientes do grupo 2 , serão selecionados apenas pelo critério, da idade, sexo e não fazerem uso de drogas ilícitas.

Os pacientes do IPTA que afirmarem serem usuários de crack durante a anamnese serão convidados a participar do estudo. Os objetivos específicos desta pesquisa serão explicados de forma detalhada aos indivíduos. Caso concorde, o mesmo assinará um termo de consentimento de participação na pesquisa.

Uma vez aceita a participação na pesquisa, será realizada a coleta de material pela técnica da citologia em base-líquida. Para tal, inicialmente os indivíduos serão orientados a realizar um enxágüe bucal com água para remover possíveis restos alimentares. A coleta de células será realizada com um kit do sistema DNA-CITOLIQU, denominado Universal Collection Medium (UCM).

A coleta das células do tecido a ser analisado(mucosa jugal) será obtida por meio da aplicação da escova de forma suave e em movimentos giratório no sentido horário (cinco voltas). Em seguida, a parte da escova que apresenta as cerdas será mergulhada no interior do frasco contendo o UCM. O frasco tampado será agitado por um período mínimo de 30 segundos para permitir que as células colhidas fiquem imersas no meio líquido. Uma cartela contendo lâminas histológicas (Lamigene) será adaptada numa prensa metálica (Prepgene) juntamente com um filtro especial contendo uma membrana de policarbonato (Filtrogene). Uma alíquota de 200µl será transferida do interior do frasco para a superfície da lâmina histológica com o auxílio de uma micropipeta e depois a prensa metálica é fechada realizando o imprint do material sobre a lâmina. O material disposto sobre as lâminas será fixado pela imersão das lâminas em uma solução de álcool etílico absoluto. A seguir, proceder-se-á a coloração das mesmas com a técnica de coloração do AgNOR. As lâminas serão fixadas por etanol a 95% durante doze horas. As amostras obtidas serão coradas pela técnica histoquímica de impregnação pela prata por 30min a 45°C em câmara escura.

Análise das Regiões Organizadoras Nucleolares. A análise dos esfregaços será feita por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX50 adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus) e objetivas PLAN 100X/0,25 (Olympus). Previamente a leitura, as lâminas terão seus números de identificação cobertos para evitar vies. A imagem dos campos citológicos será capturada em uma ampliação de 1000 vezes sob óleo de imersão, por uma câmera Sony CCD Íris (Color Video Câmera) e a avaliação das células será feita por meio do sistema de análise de imagens Image ProPlus, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000. A contagem das AgNORs será realizada em 100 núcleos celulares para cada esfregaço citológico. O parâmetro utilizado para contagem será definido como pontos enegrecidos bem definidos no interior dos nucléolos. Os dados obtidos serão registrados em fichas individuais, tabulados e submetidos à análise estatística descritiva e ao teste do Qui -quadrado.

Parecer Nº **0001422/08**

Protocolo CEP Nº **2165**

Título do projeto **Estudo das regiões organizadoras nucleolares em citologia**

Grupo **III**

esfoliativa da mucosa bucal em pacientes usuarios de crack

Versão **2**

Protocolo CONEP **0432.0.084.00-07**

Pesquisador responsável **Magna Carvalho de Meneses Thiele**

Instituição

Considerações

Metodologia clara, não apresentando inadequações em relação às questões éticas.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Adequado conforme Resolução 196/96

Recomendações

-

Conclusões

Projeto aprovado

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **09/04/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.


Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 09 de Abril de 2008.


Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUCPR

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____, abaixo qualificado, **DECLARO** para fins de participação em pesquisa, na condição de sujeito objeto da pesquisa que fui devidamente esclarecido do Projeto de Pesquisa intitulado: Estudo das regiões organizadoras nucleolares em citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes fumantes e alcoólatras, desenvolvido pelo(a) _____ do Curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, quanto aos seguintes aspectos:

- a) Diversas doenças bucais desenvolvem-se a partir do tecido que reveste a boca dentre elas, o câncer bucal. Esta doença está associada ao uso abusivo de álcool e cigarros. Este trabalho tem por objetivo avaliar, por meio da citologia esfoliativa, o grau de crescimento celular da sua boca através da contagem de estruturas presentes no núcleo das células. Para tal finalidade, será necessário realizar um enxágüe bucal com água e, em seguida, será feita uma coleta de células usando uma escova com cerdas de nylon. Este processo é feito suavemente em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas) na mucosa interna da sua bochecha, não oferecendo risco, dor ou desconforto. Em seguida, o material colhido será estudado em laboratório por meio de microscópios.
- b) Pelo fato desta pesquisa ter única e exclusivamente interesse científico, a mesma foi aceita espontaneamente pelo senhor, que, no entanto, poderá desistir a qualquer momento da mesma, inclusive sem nenhum motivo, bastando para isso informar, da maneira que achar mais conveniente, a sua desistência. Por ser voluntária e sem interesse financeiro, o senhor não terá direito a nenhuma remuneração e não terá nenhum gasto referente à pesquisa. Os dados referentes ao senhor serão sigilosos e privados, e a divulgação do

resultado visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos pela pesquisa em questão, sendo que o senhor poderá solicitar informações durante todas as fases desta pesquisa, inclusive após a publicação da mesma. Todos os participantes da pesquisa e a sociedade serão beneficiados, uma vez que, possibilita medidas preventivas em casos em que sejam encontradas quaisquer alteração clínica ou microscópica;

DECLARO, outrossim, que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto voluntariamente em participar desta pesquisa.

Curitiba, de _____ de 2006.

QUALIFICAÇÃO DO DECLARANTE

Objeto _____ da _____ Pesquisa
 Nome):.....RG:.....Data
 de nascimento:..... / / Sexo: M () F ()
 Endereço:.....nº.....Apto.....Bairr
 o:.....Cidade:.....Cep:.....Tel:.....

Assinatura do Declarante

ANEXO III



ASSOCIAÇÃO DE PESQUISA E TRATAMENTO DO ALCOOLISMO
UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL SOB Nº 703 e UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL SOB Nº 10030
C.N.P.J. Nº 80.205.685/0001-41

TERMO DE ACEITE

A **APTA – Associação de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo**, inscrita no CNPJ 80.205.685/0001-41, é uma instituição sem fins lucrativos, vem por meio desta informar a quem possa interessar, que autoriza a pesquisa, realizada juntamente com a PUC – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e coordenada pela Dr^a. Magna Thiele.

Sem mais nos colocamos a disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.


Lucimara P. da Silva
Gerente Administrativo

Lucimara Pflieger da Silva
Gerente Administrativo

Campo Largo, 11 de março de 2008

ANEXO IV

ANÁLISE ESTATÍSTICA

ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEARES SEGUNDO GRUPO								
						INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)		
GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	L.I.	L.S.	
Controle	30	3,8867	3,4500	1,7055	0,3114	3,2498	4,5235	
Usuários de Crack	30	7,1667	7,6500	2,7510	0,5023	6,1394	8,1939	
Teste t de Student para amostras independentes								
Independent Samples Test								
Levene's Test for Equality of Variances								
F	Sig.	t	df	Valor p	Observed Power	Mean Difference	Std. Error Difference	95% CI
Equal variances not assumed							Lower	Upper
	10,6176	0,001875	-5,55040070	48,4234875	0,000012	0,99976437	-3,28	0,59094
Intervalo de Confiança (95%) para a Média de NORS segundo Grupo								
<p>Gráfico de intervalo de confiança (I.C. 95%) para a Média de NORS segundo Grupo. O eixo Y representa o I.C. 95% para a Média de NORS, variando de 3,00 a 9,00. O eixo X representa o Grupo, com duas categorias: Controle e Usuários de Crack. Para o grupo Controle, o ponto médio está em aproximadamente 3,9, com um intervalo de confiança de 3,3 a 4,5. Para o grupo Usuários de Crack, o ponto médio está em aproximadamente 7,2, com um intervalo de confiança de 6,2 a 8,2.</p>								

ANEXO V

Journal of Oral Pathology and Medicine - Proof for Peer Review



TITLE: STUDY OF THE NUCLEOLAR ORGANIZING REGIONS (AGNORS) IN EXFOLIATIVE CYTOLOGY IN THE ORAL MUCOSA OF CRACK COCAINE USERS

Journal: Journal of Oral Pathology and Medicine

Manuscript ID: JOPM-08-09-OA-0940

Manuscript Type: Original Article

Date Submitted by the

Author:

07-Aug-2009

Complete List of Authors: Thiele, Magna; Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Stomatology

Soares Lima, Antonio; Universidade Federal do Paraná, Oral Pathology

Machado, Maria Ângela; PUCPR, Oral Pathology

Alanis, Luciana; PUCPR, Stomatology

Gregio, Ana Maria; PUCPR, Pharmacology

Trevilatto, Paula; PUCPR, Genetic

Methods: Immunohistochemistry

Keywords: AgNor, Oral mucosa, crack cocaine, cytology

Abstract:

Crack cocaine is the smokable and more affordable form of cocaine. This drug is able to increase the risk of the development of bronchial mucosa cancer and also cause ulcerative lesions and burns in the oral mucosa. The objective of this study was to analyze the nucleolar organizing regions (NORs) by using the silver impregnation technique (AgNORs) in epithelial cells of the oral mucosa due to the chronic use of crack, and so indicating if cell proliferation of such cells is taking place. The sample was composed of 60 male individuals divided into two groups: group I - 30 crack cocaine users; and group II (control) - 30 healthy individuals who do not make use of any illicit drug. Samples of epithelial cells of the cheek mucosa were obtained from each participant through the use of liquid-based exfoliative cytology. The smears were processed in the laboratory and colored with AgNOR technique preconized by PLOTON et al. (1986). The NORs were randomly counted in 100 cellular nuclei per smear using light microscopy and following the criteria preconized by CROCKER (1989). The average number of NORs for groups I and II were 7.1 ± 2.7 and 3.8 ± 1.7 , respectively. This difference appeared statistically different (t test by student, $p = 0.000012$). Since the NORS are directly related to protein synthesis, this large amount in the group I cells reinforces