

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**BRUNO AUGUSTO LINHARES ALMEIDA MARIZ**

**EFEITO DO FUMO NA EXPRESSÃO PROTEICA DA  
CITOQUERATINA 19 (K19) EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA  
BUCAL**

**João Pessoa  
2014**

**BRUNO AUGUSTO LINHARES ALMEIDA MARIZ**

**EFEITO DO FUMO NA EXPRESSÃO PROTEICA DA  
CITOQUERATINA 19 (K19) EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA  
BUCAL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Odontologia, da Universidade  
Federal da Paraíba em cumprimento  
às exigências para conclusão.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Naila Francis Paulo de Oliveira  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Glaucia Marques Freitas Ribeiro

João Pessoa  
2014

M343e Mariz, Bruno Augusto Linhares Almeida.

Efeito do fumo na expressão proteica da *citoqueratina* 19 (K19) em células epiteliais da mucosa bucal / Bruno Augusto Linhares Almeida Mariz. - - João Pessoa: [s.n.], 2015.

32f. : il.

Orientadora: Naila Francis Paulo de Oliveira.

Co-orientadora: Gláucia Marques Freitas Ribeiro.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Citodiagnóstico. 2. Queratinas. 3. Imuno-histoquímica. 4. Mucosa bucal. 5. Hábito de fumar.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616-076.5:663.9(043.2)

**BRUNO AUGUSTO LINHARES ALMEIDA MARIZ**

**EFEITO DO FUMO NA EXPRESSÃO PROTEICA DA CITOQUERATINA 19 (K19)  
EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL**

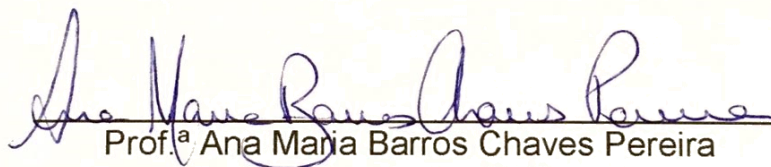
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Odontologia, da Universidade  
Federal da Paraíba em cumprimento  
às exigências para conclusão.

**Trabalho de conclusão de curso aprovado em 28 / 08 / 2014**



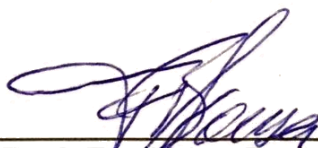
---

Prof.<sup>a</sup> Naila Francis Paulo de Oliveira  
(Orientadora – UFPB)



---

Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Barros Chaves Pereira  
(Examinadora – UFPB)



---

Prof. Frederico Barbosa de Sousa  
(Examinador – UFPB)

## DEDICATÓRIA

*A Deus,*

Senhor, obrigado porque sei que sempre estás presente em minha vida. Agradeço-Te por Teu perdão e por dar-me uma vida plena e abundante. Agradeço-Te pela Sua compaixão, pela Sua graça, pela Sua bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me nos momentos mais difíceis. A Ti, que já és dono de tudo o que sou e que possuo, dedico a minha vida.

*Aos meus pais, Maria de Fátima e Carlos Augusto,*

Dedico esse trabalho a vocês, por serem as pessoas mais importantes para mim e os que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Mamãe, obrigado por ser esse exemplo de vida, sabedoria e compaixão, Deus não poderia ter escolhido alguém melhor para enfrentar tudo o que passamos. Papai, sei que sempre olhas por mim e estás muito feliz pela conclusão de mais essa etapa em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Às professoras **Naila Francis Paulo de Oliveira e Gláucia Marques Freitas Ribeiro**, por me orientarem de forma brilhante nesse trabalho, e pelo exemplo contínuo de dedicação. Pelos conhecimentos a mim fornecidos, pelo aprendizado, mostrando sabedoria durante o período de nossa convivência. Para mim, ser orientado por vocês foi uma satisfação imensa e motivo de muito orgulho. Obrigado por tudo.

À professora **Maria do Socorro Aragão**, chefe do Laboratório de Patologia Bucal (DCOS/CCS/UFPB), por ceder amostras de biópsias orais para o controle positivo deste estudo.

A todo o **corpo docente do curso de Odontologia**, que contribuiu de forma significativa para o meu aprendizado, tornando possível a minha formação e preparação para a realização desse trabalho, principalmente às professoras **Ana Maria Barros, Andressa Feitosa, Francineide Almeida, Hannah Verheul e Marize Raquel**.

A toda **minha família**, por sempre sonharem e idealizarem a conclusão do meu curso, demonstrando alegria pela minha vitória e pelo meu sucesso. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus **colegas de universidade**, por esses anos inesquecíveis de convivência, estudos e muitos momentos eternizados, tornando a vida acadêmica mais suave e repleta de saudades. Obrigado por tornarem meus dias mais alegres, especialmente à **Aline, Ana Elisa, Bruna, Priscila e Thayssa**.

Às amigas **Isabelle e Sabrina**, que me ajudaram imensamente na realização dessa pesquisa, estando presentes desde o primeiro momento.

Aos **colegas de laboratório**, pelo companheirismo e pelos conhecimentos e experiências compartilhados.

Aos **pacientes**, que confiaram a mim sua saúde, proporcionando o meu aprendizado e formação qualificada. Sem vocês a Odontologia não existiria.

A todos, que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho; com vocês, compartilho a felicidade de finalizá-lo e a gratidão por completar mais uma etapa dessa longa jornada.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

**Objetivo:** comparar a expressão da citoqueratina 19 (K19) em células epiteliais da mucosa oral entre fumantes, não fumantes e ex-fumantes. **Metodologia:** amostras de epitélio da mucosa bucal de indivíduos fumantes (n=20), não fumantes (n=20) e ex-fumantes (n=20) foram coletadas por bochecho e processadas por imunohistoquímica. O número de células marcadas foi contado em cinco campos de cada lâmina por dois avaliadores (k=1,00). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA One-Way e Tukey ao nível de significância de 5%. **Resultados:** indivíduos fumantes apresentaram maior porcentagem de células marcadas (74,5%) em relação aos não fumantes (35,0%) (p=0,003). Os indivíduos ex-fumantes apresentaram 55,3% de células marcadas para a K19, porém não houve diferenças significativas em comparação aos não fumantes (p=0,18) ou aos fumantes (p=0,22). **Conclusão:** o hábito de fumar está associado a alteração no perfil de expressão proteica da Citoqueratina 19 (K19), sendo observado maior número de células marcadas em fumantes, indicando alterações na maturação epitelial desses indivíduos.

**Palavras-chave:** citodiagnóstico; queratinas; imuno-histoquímica; mucosa bucal; hábito de fumar.

## ABSTRACT

**Objective:** to compare the expression of cytokeratin 19 (K19) in epithelial cells of the oral mucosa of smokers, nonsmokers and former smokers. **Methods:** samples of epithelium of the oral mucosa of smokers (n=20), non-smokers (n=20) and former smokers (n=20) were collected by mouthwash and processed by immunohistochemistry. The number of stained cells was counted in five fields of slides prepared in duplicate. The number of stained cells was counted in five fields per slide by two observers (k = 1.00). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey tests at a significance level of 5%. **Results:** smokers had higher percentage of stained cells (74.5%) compared to non-smokers (35.0%) (p=0.003). Former smokers showed 55.3% of stained cells for K19, but there were no significant differences compared to non-smokers (p=0.18) or smokers (p=0.22). **Conclusion:** smoking is associated with changes in protein expression of cytokeratin 19 (K19), being the greater number of stained cells observed in smokers, indicating changes in epithelial maturation of these individuals.

**Keywords:** cytodiagnosis; keratins; immunohistochemistry; oral mucosa; smoking.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. Ética em Pesquisa.....	15
3.2. Amostra.....	15
3.3. Coleta das amostras.....	16
3.4. Análise de expressão proteica.....	16
3.5. Análise Estatística.....	17
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>29</b>
<b>Anexo 01 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa</b>	
<b>Anexo 02 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	
<b>Anexo 03 - Ficha Clínica</b>	

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA:

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável e um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. A fumaça do cigarro é uma mistura química complexa a qual contem mais de 400 diferentes compostos, sendo que em torno de 69 deles são muitos estudados e altamente associados ao câncer (FOWLES; DYBING, 2003; DEMARINI, 2004).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês: International Agency for Research on Cancer) da Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que em 2012 surgiram 14,1 milhões de novos casos de câncer e cerca de 8,2 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença em todo o mundo, segundo dados do projeto Globocan 2012 (IARC, 2012).

Com o crescimento e o envelhecimento da população mundial, além da redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas, a OMS afirma que em 2030 surgirão 21,4 milhões de casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (IARC, 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) calcula a ocorrência de 576 mil novos casos de câncer em 2014, mostrando a magnitude da doença no país. Desses, 15.290 novos casos ocorrerão na cavidade oral. Nos homens, o câncer bucal é o quinto mais prevalente no Brasil, e o quarto mais prevalente no Nordeste (INCA, 2014).

O uso do tabaco afeta o epitélio superficial resultando em mudanças na aparência dos tecidos. Essas mudanças abrangem o aumento da pigmentação e o espessamento do epitélio. Ainda, o tabaco pode irritar as glândulas salivares menores e o palato duro e aumentar o risco para a doença periodontal e o câncer bucal (TAYBOS, 2003). Na mucosa bucal de fumantes clinicamente saudáveis foram observadas algumas mudanças, tais como: alta taxa de proliferação das células epiteliais (VAN OIJEN et al, 1998), alterações nucleares e citoplasmáticas (PAVANELLO et al, 2006; CAMPOS FONTES et al, 2008; ABDELAZIZ; OSMAN, 2011), aumento no número de células queratinizadas (ORELLANA-BUSTOS et al, 2004), como também alterações na expressão das citoqueratinas (DONETTI et al, 2010; LIMA et al, 2011; GUALERZI et al, 2012).

Citoqueratinas são proteínas pertencentes à família dos filamentos intermediários, as quais são predominantemente expressas em células epiteliais. As queratinas representam em torno de trinta proteínas diferindo pelo peso molecular; tendo o mais baixo (40 kd), as queratinas 8 e 18, as quais são encontradas no epitélio simples e glandular; queratinas de peso molecular intermediário, encontradas no epitélio estratificado; e as mais pesadas queratinas (aproximadamente 67 kd) são encontradas no epitélio estratificado queratinizado (MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008).

De acordo com a proposta do Comitê de Nomenclatura de Queratinas (SCHWEIZER et al, 2006), as queratinas estão divididas em dois grupos: tipo I (K9–K10, K12–K28, e K31–K40 incluindo K33a e K33b) as quais são ácidas e codificadas pelo cromossomo 17, enquanto as do tipo II (K1–K8 (incluindo K6a, K6b e K6c, K71–K86) são básicas e codificadas pelo cromossomo 12 (ROMANO et al, 1988). Uma propriedade única das queratinas é que em contraste com outras proteínas dos filamentos intermediários, somente conseguem constituir seus filamentos pela formação de heteropolímeros pela formação de pares de moléculas do tipo I e do tipo II (1:1) (MOLL et al, 1982).

Elas são os principais componentes do citoesqueleto do tecido epitelial, mantendo a integridade e função do tecido, que age como uma barreira protetora contra danos causados por agentes químicos, físicos e biológicos. Conforme as células deixam a camada basal e entram em diferenciação, se tornam mais largas e começam a achatar e acumular citoqueratinas. Isso ocorre em ambos os epitélios, queratinizado e não queratinizado, embora seja mais proeminente em epitélio queratinizado (SQUIER; KREMER, 2001).

Tipicamente, os filamentos de queratinas ficam inseridos aos desmossomos e hemidesmossomos. Dessa forma, contribuem não somente com a estabilidade entre as células epiteliais, mas também com a conexão à membrana basal na ligação entre o epitélio e o tecido conjuntivo (BUXTON; MAGEE, 1992; MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008). As citoqueratinas também são importantes para a polaridade da membrana das células epiteliais. Dessa forma, apresentam não só função mecânica, mas também atuam na sinalização celular (ORIOLO et al, 2007).

As citoqueratinas apresentam distribuição específica para cada subtipo de epitélio, permitindo que sejam utilizadas como importantes marcadores de sua diferenciação.

O aumento ou diminuição de sua expressão estão frequentemente relacionados ao câncer e ao hábito de fumar. As citoqueratinas são importantes marcadores da diferenciação e proliferação epitelial e são frequentemente utilizadas para o diagnóstico de tumores. Técnicas de imuno-histoquímica, as quais utilizam anticorpos específicos para as citoqueratinas são usados de forma rotineira em laboratórios para diagnósticos de tumores (KARANTZA, 2011; KHANOM et al, 2012).

A citoqueratina 19 (K19) é a menor delas e é diferente das outras citoqueratinas, uma vez que não apresenta cauda alfa-helicoidal (BADER et al, 1986). É expressa em epitélio simples, além de epitélio pseudoestratificado, como também nas células da camada basal do epitélio estratificado não queratinizado. Já foi observado na mucosa oral que a expressão de K19 pode ser induzida por displasia (LINDBERG; RHEINWLAD, 1989) e inflamação (MOLL; TROYANOVSKY; MOLL, 1993). Aumento da expressão da K19 foi observado em câncer de bexiga (MORITA et al, 1997), tireoide (SETHI et al, 2011; WU et al, 2013), fígado (KIM et al, 2011), vesícula biliar (LI et al, 2013) e pâncreas (HAN et al, 2013).

A expressão de mRNA da K19 em células tumorais circulantes no sangue e de biópsias aspirativas de linfonodos de pacientes com câncer de pulmão mostrou-se um marcador importante para acompanhar a resposta dos pacientes ao tratamento. Pacientes com positividade para K19 durante o tratamento do câncer tiveram maiores índices de recidiva da doença e uma sobrevida menor (BUGALHO et al, 2013; SHI et al, 2013). Em biópsias aspirativas de linfonodos de pacientes com câncer de colo do útero, a expressão do RNA mensageiro da K19 foi utilizada para identificar metástases (OKAMOTO et al, 2013).

Em Carcinomas hepatocelulares, a expressão da K19 indica pior prognóstico e maior capacidade de invasão, ocorrendo possivelmente por um processo de desdiferenciação celular (GOVAERE et al, 2014; SANTOS et al, 2014). Quando expressa em linfonodos regionais desses pacientes, a sobrevida deles diminui consideravelmente (LEE et al, 2013).

A citoqueratina 19 observada em citologia esfoliativa de epitélio bucal já foi sugerida com uma forte indicadora senão definitiva de malignidade, particularmente se sua presença é interpretada juntamente com outras informações, como o perfil do DNA (DEBUS et al, 1984; PURKIS et al, 1990; OGDEN et al, 1993; ODGEN et al, 1994; NIE et al, 2002; RAM PRASSAD; NIRMALA; KOTIAN, 2005; MAHALINGAM et al, 2012).

Em relação ao fumo, um estudo revelou por imuno-histoquímica que em amostras obtidas por citologia esfoliativa de epitélio bucal queratinizado de indivíduos fumantes, as citoqueratinas 6, 16 e 19 apresentaram maior expressão quando comparadas aos indivíduos não fumantes, sugerindo que as células de indivíduos fumantes estão em estado de hiperproliferação (LIMA et al, 2011).

O aumento da expressão da K19 sugere a ocorrência de alterações na maturação epitelial, que podem manifestar-se clinicamente no futuro, fato esse que nos mostra a importância de estudos analisando a expressão da K19, além de outras citoqueratinas nas células epiteliais da mucosa de indivíduos fumantes que não apresentam alterações clínicas.

## **2. PROPOSIÇÃO:**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Avaliar o efeito do fumo na expressão proteica da Citoqueratina 19 (K19) em células epiteliais da mucosa oral.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

Comparar a expressão proteica da Citoqueratina 19 (K19) entre pacientes fumantes, ex-fumantes e não fumantes que não apresentavam sinais clínicos de lesões orais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1. Ética em Pesquisa:**

Os procedimentos para a realização desta pesquisa respeitaram as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pela Resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012 (publicada em 13/06/13) do Conselho Nacional de Saúde. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Protocolo 136/12) (Anexo 01).

#### **3.2. Amostra:**

A amostra é composta por 60 indivíduos brasileiros, saudáveis, de ambos os sexos, com faixa etária a partir de 30 anos, pertencentes à Universidade Federal da Paraíba, sendo alunos, professores e funcionários. Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com o hábito de fumar: Grupo Controle, n=20 (indivíduos que nunca fumaram), Grupo Fumante, n=20 (indivíduos que fumam há pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia) e Grupo Ex-Fumante, n=20 (indivíduos que fumaram por pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia). Todos os indivíduos assinaram um Termo de Informação e Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a participação voluntária na pesquisa científica, de acordo com as normas do Comitê em Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPB (Anexo 02). Os indivíduos excluídos da amostra foram diabéticos, grávidas ou em período de lactação, com histórico médico de doença autoimune, com história de hepatite e infecção por HIV, câncer bucal e que apresentaram sinais clínicos visíveis de qualquer alteração no local avaliado (Anexo 03). Não foram excluídos pacientes pertencentes a qualquer grupo étnico racial, pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é de pouco valor em um país altamente miscigenado racialmente.

### 3.3. Coleta das amostras:

As células epiteliais da mucosa bucal foram obtidas a partir de um bochecho com dextrose autoclavada a 3% por 50 segundos, e após sedimentação das células por centrifugação, o pellet foi ressuspendido com PBS, sendo utilizados 20µl para a confecção do esfregaço. Foram confeccionados dois esfregaços para cada voluntário em lâminas silanizadas sendo, após secagem ao ar, fixados imediatamente com fixador citológico (Propilenoglicol + Álcool Absoluto). Posteriormente, os esfregaços foram mantidos em ultrafreezer a -70°C até a realização da técnica de Imuno-histoquímica (YONN et al, 2009).

### 3.4. Análise de Expressão Proteica:

A expressão da citoqueratina 19 foi detectada através de Análise Imuno-histoquímica pelo método PAP (Peroxidase anti-peroxidase), através dos anticorpos primários e secundários (Cytokeratin 19, monoclonal de camundongo, clone Ks19.1, isotipo 322,00 322,00 IgG1 – BioCare).

As lâminas foram incubadas por 20 a 30 minutos com soro normal em câmara úmida; *overnight* a 4°C com antissoro primário e por 30 minutos com antissoro secundário. Os banhos em tampão PBS/Phosphat Buffer Salin (10%, pH 7,2-7,3) foram realizados nos intervalos entre as aplicações dos anticorpos. A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de diaminobenzidina (DAB chromogen system; marca Signet). Para a contracoloração foi aplicada a hematoxilina de Harris diluída cinco vezes por dois minutos. Após a desidratação, foi realizada a montagem da lâmina com meio de montagem sintético a base de polímeros (EasyPath).

O controle negativo recebeu apenas o soro de coelho. Para o controle positivo, foram usados cortes parafinizados de lesões diagnosticadas histopatologicamente como sendo Carcinomas de Células Escamosas Orais, cedidos pelo Laboratório de Patologia Bucal (Departamento de Clínica e Odontologia Social/CCS/UFPB).

Após calibração, cada lâmina foi analisada por dois pesquisadores ( $k = 1,00$ ). Para cada indivíduo, foram analisados cinco campos da área onde os anticorpos foram aplicados. Em cada campo, foi contabilizado o número total de células e o número de células marcadas, se houvessem, para cálculo da porcentagem de células marcadas.

### **3.5. Análise Estatística:**

A análise estatística foi realizada através do software BioEstat 5.3 (Pará-Brasil). Foi realizado o teste de D'Agostino-Pearson e depois de verificada a normalidade dos dados, foram realizados os testes Qui-quadrado, ANOVA One-Way e Tukey ao nível de significância de 5%.

#### 4. RESULTADOS:

A tabela 01 apresenta os dados demográficos das amostras para análise da expressão proteica da citoqueratina 19 (K19).

**Tabela 01** – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros demográficos e consumo de cigarros da população estudada.

	<b>Não Fumantes (n=20)</b>	<b>Fumantes (n=20)</b>	<b>Ex-fumantes (n=20)</b>
<b>Idade (anos)*</b>	42,9 ± 10,1	47,4 ± 10,0	55,9 ± 9,8
<b>% Homens**</b>	25	60	65
<b>% Mulheres</b>	75	40	35
<b>Cigarros/dia</b>	----	18,8 ± 10,8	23,9 ± 14,0
<b>Tempo de consumo de cigarros (anos)</b>	----	24,3 ± 13,2	20,1 ± 12,9
<b>Cessação do hábito de fumar (anos)</b>	----	----	15,8 ± 7,7

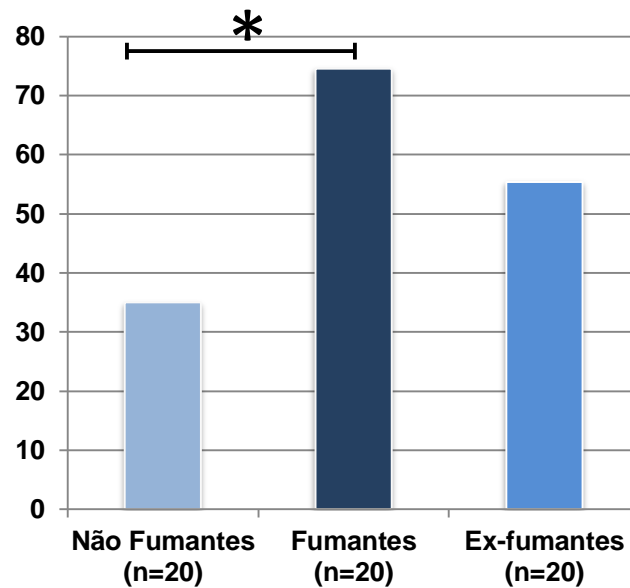
\*0,001, ANOVA; \*\*0,022,  $\chi^2$

Os indivíduos fumantes apresentaram maior porcentagem de células marcadas (74,5%) e os não fumantes apresentaram a menor (35,0%) ( $p=0,003$ ). Os indivíduos ex-fumantes apresentaram 55,3% de células marcadas para a K19, porém não houve diferenças significativas em compara o aos não fumantes ( $p=0,18$ ) ou aos fumantes ( $p=0,22$ ) (Tabela 02, Gráfico 01).

**Tabela 02** – Porcentagem média de células marcadas para a Citoqueratina 19 (K19) entre os grupos.

	<b>Porcentagem de Células Marcadas</b>	
	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Não fumantes</b>	35,00	34,39
<b>Fumantes</b>	74,50	35,09
<b>Ex-fumantes</b>	55,35	38,30

**Gráfico 01** – Porcentagem de células marcadas entre os grupos. Não fumantes (n=20), Fumantes (n=20), Ex-fumantes (n=20). \*p=0.003; ANOVA.



Uma vez que os dados demográficos (Tabela 01) apontaram diferenças em relação à idade e gênero entre os grupos, foi realizada análise estatística comparando-se esses fatores com a expressão proteica da K19 independente do hábito de fumar. Quanto à idade foram formados dois grupos onde o primeiro foi composto por indivíduos de 30 a 48 anos e o segundo por indivíduos com mais de 48 anos. Os dados desta pesquisa revelaram que não há diferença significativa na expressão proteica da K19 em relação à idade ( $p=0,80$ ) ou em relação ao sexo ( $p=0,72$ ).

Ainda, os fumantes foram divididos em dois grupos de acordo com o número de cigarros fumados por dia: Grupo 1 (de 5-20 cigarros por dia) e Grupo 2 (mais de 20 cigarros por dia). Em relação à duração do hábito, também foram criados dois grupos: Grupo A (fumam por até 20 anos) e Grupo B (fumam por mais de 20 anos). Contudo, não foram encontradas diferenças significativas na expressão da K19 em relação ao número de cigarros ( $p=0,72$ ) ou à duração do hábito ( $p=0,30$ ).

Os ex-fumantes foram divididos em dois grupos para avaliarmos se o tempo desde o término do hábito influenciaria na expressão da K19. Indivíduos que pararam de fumar há mais de 15 anos apresentaram menor número de células marcadas para K19 (50,14%) em relação aos que pararam há menos de 15 anos (58,15%), porém essa diferença não foi significativa ( $p=0,66$ ).

## 5. DISCUSSÃO:

A técnica de imuno-histoquímica é usada para detectar diversos marcadores tumorais, que podem indicar alterações nucleares e citoplasmáticas. Dentre as últimas, a alterações na expressão das citoqueratinas são largamente estudadas em diversas patologias (ODGEN et al, 1993; ODGEN et al, 1994).

O presente estudo observou maior número de células marcadas para Citoqueratina 19 (K19) em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos fumantes, em comparação com não fumantes, sugerindo estado de hiperproliferação na mucosa oral de fumantes, uma vez que K19 é expressa na camada basal de epitélio estratificado não queratinizado (LIMA et al., 2011; PRESLAND; JUREVIC, 2002).

Foi encontrado apenas um estudo na literatura que avaliou a expressão da K19 na mucosa oral de pacientes fumantes. Nele, essa expressão foi significativamente maior em fumantes, quando comparados aos não fumantes, indicando que o processo de maturação epitelial desses indivíduos encontra-se desregulado. Indivíduos que fumaram por mais tempo (mais de 26,5 anos) apresentam uma maior expressão da K19 (62,5%) em relação aos que fumaram por menos tempo. Entretanto, o número de cigarros consumidos por dia não influenciou a expressão dessa citoqueratina (LIMA et al, 2011).

Até o momento, nenhum estudo avaliou a expressão de qualquer citoqueratina no epitélio da mucosa oral de ex-fumantes. Os dados deste estudo não mostram diferenças significativas entre a expressão da K19 de indivíduos ex-fumantes em comparação com não fumantes ou fumantes, contudo, há uma tendência de diminuição de células marcadas em indivíduos ex-fumantes quando comparados aos fumantes, o que pode sugerir que a cessação do hábito de fumar pode diminuir a expressão da K19, tendendo o epitélio a voltar ao estado normal de diferenciação. Ainda, o tempo após a cessação do hábito de fumar não influenciou na expressão da K19, sendo que indivíduos que pararam de fumar há mais de 15 anos tiveram uma menor expressão da K19 em relação aos que pararam há menos de 15 anos, porém, essa diferença não foi significativa.

Feng et al. (2013) avaliaram através de imuno-histoquímica a expressão da Citoqueratina 19 e da Conexina 43 no epitélio da mucosa lingual de ratos, que tiveram a carcinogênese induzida através da 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO). Na

mucosa lingual de ratos normais, a marcação positiva da Citoqueratina 19 distribuiu-se na camada de células basais. Nas amostras com displasias leve, moderada e severa, essa marcação ocorreu na camada supra basal. Nas amostras com Carcinoma de Células Escamosas, a K19 foi expressa em todas as camadas do epitélio. A intensidade de marcação da K19 aumentou significativamente à medida que o grau de displasia aumentou, sendo de: 30,0% no tecido normal; 50% na displasia leve; 58,33% na displasia moderada; 80,0% na displasia severa e 91,67% no tecido com Carcinoma de Células Escamosas (CCE). É possível correlacionar os índices de positividade de marcação da mucosa lingual normal dos ratos, com os dados do presente trabalho encontrados nas células dos indivíduos não fumantes (35,0%); da displasia leve à moderada com indivíduos ex-fumantes (55,35%) e da displasia severa com os indivíduos fumantes (74,50%). Os autores sugerem ainda que a expressão da Citoqueratina 19 está associada com o processo de carcinogênese, possuindo um importante papel no diagnóstico precoce do Carcinoma de Células Escamosas.

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, que observaram número e intensidade maiores de células marcadas positivamente para a K19, à medida que os Carcinomas de Células Escamosas (CCE) tornavam-se mais indiferenciados, reforçando o papel da expressão da Citoqueratina 19 no diagnóstico de lesões potencialmente malignas e na determinação do nível de diferenciação do CCE (NIE et al, 1999; NIE et al, 2002; RAM PRASSAD; NIRMALA; KOTIAN, 2005; KHANOM et al, 2012).

Yoshida (2007) encontrou diferenças significativas na expressão de mRNA da K19 em biópsias de Carcinoma de Células Escamosas Oral, em relação a amostras de mucosa oral normal, porém não observou diferenças quanto ao grau de diferenciação das lesões e a expressão da K19.

Feng et al (2009) avaliaram a expressão do mRNA da K19 em tecidos cancerígenos, tecidos próximos às lesões de câncer e linfonodos retirados de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral. Os tecidos cancerígenos apresentaram maior expressão do mRNA da K19 em relação aos tecidos próximos e à mucosa normal e sua expressão em linfonodos foi considerada como marcador para detectar micrometástases do CCE oral.

Novos estudos avaliando a expressão proteica de outras citoqueratinas no epitélio da mucosa oral são de grande valia para esclarecer alterações ocorridas antes do aparecimento de alterações clínicas. A análise imuno-histoquímica dessas e de outras proteínas pode ser usada como um método complementar para o diagnóstico do Carcinoma de Células Escamosas Oral.

**CONCLUSÃO:**

- O hábito de fumar está relacionado à alteração no perfil de expressão proteica da Citoqueratina 19 (K19) nas células epiteliais da mucosa oral, sendo encontrado maior número de células marcadas estão presentes em fumantes em comparação aos não fumantes.
- O perfil de expressão da Citoqueratina 19 (K19) em indivíduos ex-fumantes não difere de indivíduos não fumantes e fumantes.

**REFERÊNCIAS:**

ABDELAZIZ, M.S.; OSMAN, T.E. Detection of Cytomorphological Changes in Oral Mucosa among Alcoholics and Cigarette Smokers. **Oman Med J.**, v.26, n.5, p.349-52, 2011.

BADER, B.L.; MAGIN, T.M.; HATZFELD, M.; FRANKE, W.W. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. **EMBO J.**, v.5, n.8, p.1865-75, 1986.

BUGALHO, A.; MARTINS, C.; DIAS, S.S.; NUNES, G.; SILVA, Z.; CORREIA, M.; MARQUES GOMES, M.J.; VIDEIRA, P.A. Cytokeratin 19, carcinoembryonic antigen, and epithelial cell adhesion molecule detect lung cancer lymph node metastasis in endobronchial ultrasound-guided transbronchial aspiration samples. **Clin Lung Cancer.**, v.14, n.6, p.704-712, nov., 2013.

BUXTON, R.S.; MAGEE, A.I. Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. **Semin Cell Biol.**, v.3, n.1, p.157-167, 1992.

CAMPOS FONTES, P.; MARQUES CORRÊA, G.H.; SCHOLZ ISSA, J.; ALMEIDA, J.D. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytologyspecimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. **Anal Quant Cytol Histol.**, v.30, n.1, p.16-24, fev., 2008.

DEBUS, E.; MOLL, R.; FRANKE, W.W.; WEBER, K.; OSBORN, M. Immunohistochemical distinction of humans carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. **Am J Pathol.**, v.114, n.1, p.121-130, 1984.

DEMARINI, D.M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutat. Res.**, v.567, n.2-3, p.447-474, nov., 2004.

DONETTI, E.; GUALERZI, A.; BEDONI, M.; VOLPARI, T.; SCIARABBA, M.; TARTAGLIA, G.; SFORZA, C. Desmoglein 3 and keratin 10 expressions are reduced by chronic exposure to cigarette smoke in human keratinised oral mucosa explants. **Arch. Oral Biol.**, v.55, n.10, p.815-823, out., 2010.

FENG, Y.; GU, Y.L.; NIE, M.H.; ZHANG, Q.M.; LIANG, S.Z. Study on the expression of cytokeratin 19 mRNA in oral squamous cell carcinoma. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v.27, n.3, p.241-243, jun., 2009.

FENG, Y.; KANG, X.; LI, C.; NIE, M. Expression of cytokeratin 19 and connexin 43 in 4-nitroquinoline-I-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v.31, n.3, p.237-241, jun., 2013.

FOWLES, J.; DYBING, E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. **Tob. Control.**, v.12, n.4, p.424-430, 2003.

GLOBOCAN 2012: **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acesso em: 12 de julho de 2014.

GOVAERE, O.; KOMUTA, M.; BERKERS, J.; SPEE, B.; JANSSEN, C.; DE LUCA, F.; KATOONIZADEH, A.; WOUTERS, J.; VAN KEMPEN, L.C.; DURNEZ A.; VERSLYPE, C.; DE KOCK, J.; ROGIERS, V.; VAN GRUNSVEN, L.A.; TOPAL, B.; PIRENNE, J.; VANKELECOM, H.; NEVENS, F.; VAN DEN OORD, J.; PINZANI, M.; ROSKAMS, T. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. **Gut.**, v.63, n.4, p.674-685, abr., 2014.

GUALERZI, A.; SCIARABBA, M.; TARTAGLIA, G.; SFORZA, C.; DONETTI, E. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa. **Inhalation Toxicology.**, v.24, n.6, p.382-389, 2012.

HAN, X.; ZHAO, J.; JI, Y.; XU, X.; LOU, W. Expression of CK19 and KIT in resectable pancreatic neuroendocrine tumors. **Tumour Biol.**, v.34, n.5, p.2881-2889, out., 2013.

INCA 2014. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 12 de julho de 2014.

KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. **Oncogene.**, v.30, n.2, p.127-128, jan., 2011.

KHANOM, R.; SAKAMOTO, K.; PAL, S.K.; SHIMADA, Y.; MORITA, K.; OMURA, K.; MIKI, Y.; YAMAGUCHI, A. Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse **Pathophysiologies Histol Histopathol.**, v.27, n.7, p.949-959, jul., 2012.

KIM, H.; CHOI, G.H.; NA, D.C.; AHN, E.Y.; KIM, G.I.; LEE, J.E.; CHO, J.Y.; YOO, J.E.; CHOI, J.S.; PARK, Y.N. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. **Hepatology.**, v.54, n.5, p.1707-17, 2011.

LEE, C.W.; KUO, W.L.; YU, M.C.; CHEN, T.C.; TSAI, C.N.; LEE, W.C.; CHEN, M.F. The expression of cytokeratin 19 in lymph nodes was a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma after hepatic resection. **World J Surg Oncol.**, v.11, n.1, p.136, jun., 2013.

LI, J.; YANG, Z.L.; ZOU, Q.; YUAN, Y.; LI, J.; LIANG, L.; ZHEN, G.; CHEN, S. Squamous Cell/Adenosquamous Carcinomas and Adenocarcinomas of the Gallbladder: An Immunohistochemistry Study of Prognostic Markers. **Pathol Oncol Res.**, v.28, n.1, set., 2013.

LIMA, C.F.; LEITE, S.F.; CARVALHO, Y.R.; CABRAL, L.A.; BALDUCCI, I.; ALMEIDA, J.D. Cytokeratin profile in exfoliative cytology of smokers. **Anal Quant Cytol Histol.**, v.33, n.1, p.19-24, 2011.

LINDBERG, K.; RHEINWALD, J.G. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. **Am J Pathol.**, v.134, n.1, p.89–98, 1989.

MAHALINGAM, M.; RICHARDS, J.E.; SELIM, M.A.; MUZIKANSKY, A.; HOANG, M.P. An immunohistochemical comparison of cytokeratin 7, cytokeratin 15, cytokeratin 19, CAM 5.2, carcinoembryonic antigen, and nestin in differentiating porocarcinoma from squamous cell carcinoma. **Human Pathology.**, v.43, n.1, p.1265–1272, 2012.

MOLL, R.; FRANKE, W.W.; SCHILLER, D.L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell.**, v.31, n.1, p.11-24, 1982.

MOLL, I.; TROYANOVSKY, S.M.; MOLL, R. Special program of differentiation expressed in keratinocytes of human haarscheiben: an analysis of individual cytokeratin polypeptides. **J Invest Dermatol.**, v.100, n.1, p.69–76, 1993.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochem Cell Biol.**, v.129, n.6, p.705-713, 2008.

MORITA, T.; KIKUCHI, T.; HASHIMOTO, S.; KOBAYASHI, Y.; TOKUE, A. Cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) in bladder cancer. **Eur Urol.**, v.32, n.2, p.237-244, 1997.

NIE, M.; LI, B.; ZENG, G.; HE, Z.; CHEN, Q.; ZHOU, M.; LUO, G.; ZENG, X. Changes of simple epithelial cytokeratin during oral carcinogenesis. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v.17, n.3, p.208-209, ago., 1999.

NIE, M.; ZHONG, L.; ZENG, G.; LI, B. The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v.37, n.3, p.187-190, mai., 2002.

OGDEN, G.R.; MCQUEEN, S.; CHISHOLM, D.M.; LANE, E.B. Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. **J Clin Pathol.**, v.46, n.1, p.352-6, 1993.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; CHISHOLM, D.M.; LANE, E.B. DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. **Oral Oncol Eur J Cancer.**, v.30, n.2, p.405-8, 1994.

OKAMOTO, S.; NIIKURA, H.; NAKABAYASHI, K.; HIYAMA, K.; MATODA, M.; TAKESHIMA, N.; WATANABE, M.; NAGASE, S.; OTSUKI, T.; YAEGASHI, N. Detection of sentinel lymph node metastases in cervical cancer: assessment of KRT19 mRNA in the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. **Gynecol Oncol.**, v.130, n.3, p.530-536, jun., 2013.

ORELLANA-BUSTOS, A.I.; ESPINOZA-SANTANDER, I.L.; FRANCO-MARTÍNEZ, M.E.; LOBOS-JAMESFREYRE, N.; ORTEGA-PINTO, A.V. Evaluation of

keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. **Med Oral.**, v.9, n.3, p.197-203, 2004.

ORIOLO, A.S.; WALD, F.A.; RAMSAUER, V.P.; SALAS, P.J. Intermediate Wlaments: a role in epithelial polarity. **Exp Cell Res.**, v.313, n.10, p.2255–2264, 2007.

PAVANELLO, M.B.; PRADO, F.A.; BALDUCCI, I.; BRANDÃO, A.A.; ALMEIDA, J.D. Cytologic analysis of alterations induced by Smoking and by alcohol consumption. **Acta Cytol.**, v.50, n.4, p.435-440, jul./ago., 2006.

PRESLAND, R.B.; JUREVIC, R.J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. **J Dent Educ.**, v.66, n.4, p.564-74, abr., 2002.

PURKIS, P.E.; STEEL, J.B.; MACKENZIE, I.C.; NATHRATH, W. B.; LEIGH, I.M.; LANE, E.B. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. **J Cell Sci.**, v.97, n.1, p.39-50, 1990.

RAM PRASSAD, V.V.; NIRMALA, N.R.; KOTIAN, M.S. Immunohistochemical evaluation of expression of cytokeratin19 in different histological grades of leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Indian J Dent Res.**, v.16, n.1, p.6-11, jan./mar., 2005.

ROMANO, V.; BOSCO, P.; ROCCHI, M.; COSTA, G.; LEUBE, R.E.; FRANKE, W.W.; ROMEO, G. Chromosomal assignments of human type I and type II cytokeratin genes to different chromosomes. **Cytogenet Cell Genet.**, v.48, n.3, p.148-51, 1988.

SANTOS, N.P.; OLIVEIRA, P.A.; ARANTES-RODRIGUES, R.; FAUSTINO-ROCHA, A.I.; COLAÇO, A.; LOPES, C.; GIL DA COSTA, R.M. Cytokeratin 7/19 expression in N-diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular lesions: implications for histogenesis. **Int J Exp Pathol.**, v.95, n.3, p.191-198, jun., 2014.

SCHWEIZER, J.; BOWDEN, P.E.; COULOMBE, P.A.; LANGBEIN, L.; LANE, E.B.; MAGIN, T.M.; MALTAIS, L.; OMARY, M.B.; PARRY, D.A.; ROGERS, M.A.; WRIGHT, M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins. **J Cell Biol.**, v.172, n.2, p.169–174, 2006.

SETHI, K.; SARKAR, S.; DAS, S.; RAJPUT, S.; MAZUMDER, A.; ROY, B.; PATRA, S.; MOHANTY, B.; EL-NAGGAR, A.K.; MANDAL, M. Expressions of CK-19, NF-kappaB, E-cadherin, beta-catenin and EGFR as diagnostic and prognostic markers by immunohistochemical analysis in thyroid carcinoma. **J Exp Ther Oncol.**, v.9, n.3, p.187-99, 2011.

SHI, W.L.; LI, J.; DU, Y.J.; ZHU, W.F.; WU, Y.; HU, Y.M.; CHEN, Y.C. CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood predict treatment efficacy and survival in small-cell lung cancer patients. **Med Oncol.**, v.30, n.4, p.755, dez., 2013.

SQUIER, C.A.; KREMER, M.J. Biology of oral mucosa and esophagus. **J Natl Cancer Inst Monogr.**, v.29, n.1, p.7-15, 2001.

TAYBOS, G. Oral changes associated with tobacco use. **Am J Med Sci.**, v.326, n.4, p.179-82, 2003.

VAN OIJEN, M.G.; GILSING, M.M.; RIJKSEN, G.; HORDIJK, G.J.; SLOOTWEG, P.J. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and exsmokers. **Oral Oncol.**, v.34, n.1, p.297-303, 1998.

WU, G.; WANG, J.; ZHOU, Z.; LI, T.; TANG, F. Combined staining for immunohistochemical markers in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: improvement in the sensitivity or specificity? **J. Int. Med. Res.**, v.41, n.4, p.975-983, ago., 2013.

YOON, A.J.; SHEN, J.; WU, H.C.; ANGELOPOULOS, C.; SINGER, S.R.; CHEN, R.; SANTELLA, R.M. Expression of activated checkpoint kinase 2 and histone 2AX in exfoliative oral cells after exposure to ionizing radiation. **Radiat Res.**, v.171, n.6, p.771-776, jun., 2009.

YOSHIDA, Y. Effective biological marker to detect oral squamous cancer cells expression patterns of CK 10, 17, 19 and SCCA mRNA. **Kokubyo Gakkai Zasshi.**, v.73, n.3, p.37-42, mar., 2007.

## ANEXO 01:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 8ª Reunião realizada no dia 28/08/2012, o projeto de pesquisa intitulado: “IMPACTO DO FUMO NO PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS BUCAIS” da Naila Francis Paulo de Oliveira. Prot. nº 0136/12. CAAE: 02886912.1.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 8ª Reunião realizada no dia 28/08/2012, o projeto de pesquisa intitulado: “IMPACTO DO FUMO NO PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS BUCAIS” da Naila Francis Paulo de Oliveira. Prot. nº 0136/12. CAAE: 02886912.1.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.



Dr. *[Assinatura]*  
Coordenadora CEP/CCS/AUFPB  
Mat. SIAPE: 0332618

**ANEXO 02:****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) Senhor(a):

Esta pesquisa é sobre o efeito do cigarro na molécula de DNA e está sendo desenvolvida pela Prof<sup>a</sup> Naila Francis Paulo de Oliveira, do Departamento de Biologia Molecular- Centro de Ciências Exatas e da Natureza- Universidade Federal da Paraíba e sua equipe de pesquisa (alunos vinculados ao programa PIBIC/PIVIC da UFPB e programa de Pós graduação em Odontologia).

O objetivo do estudo é identificar possíveis alterações no DNA (a molécula que guarda nossa informação genética) com o hábito de fumar. A finalidade deste trabalho é contribuir para o entendimento do efeito do cigarro, visando indiretamente contribuir para o entendimento do impacto do cigarro para a saúde humana.

Solicitamos a sua colaboração para responder algumas perguntas sobre sua saúde e doação de células da boca. As células da boca serão coletadas a partir de um bochecho com solução esterilizada de açúcar. Solicitamos também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis. Solicitamos também a sua permissão para uso do material coletado para pesquisas posteriores.

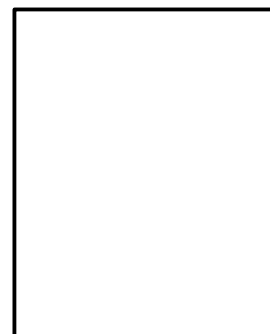
Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

---

Assinatura do Participante da Pesquisa



Espaço para impressão datiloscópica

---

Assinatura da Testemunha

Contato com o Pesquisador (a) Responsável: Profª Drª Naila Francis Paulo de Oliveira.

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora:

Naila Francis Paulo de Oliveira- Endereço (Setor de Trabalho): Centro de Ciências Exatas e da Natureza/ Departamento de Biologia Molecular- UFPB- Telefone: 3216-7643

Ou para o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS: Bloco Arnaldo Tavares – Sala 812 – 1º andar - Centro de Ciências da Saúde-Campus I - Cidade Universitária - Bairro Castelo Branco - Telefone: 3216 7791.

Atenciosamente,

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

**ANEXO 03:****UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

Nº amostra: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: F M Idade: \_\_\_\_\_ Cor: M P B

Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_ CEL: \_\_\_\_\_

**DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL**

Doença crônica? S N (não aceitar diabetes/câncer bucal)

Qual? \_\_\_\_\_

Diabetes na família? S N

Câncer na família? S N Qual? \_\_\_\_\_

Uso de medicamentos? S N Qual? \_\_\_\_\_

Sangramento gengival? S N

Fumante? S N Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_ Quantos anos? \_\_\_\_\_

Fumante passivo? S N

Ex-fumante? S N Quantos cigarros/dia? \_\_\_\_\_ Quantos anos? \_\_\_\_\_

Parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Faz uso de enxaguatório bucal? S N Qual frequência? \_\_\_\_\_

Faz uso de bebida alcoólica? S N Qual frequência? \_\_\_\_\_