

PAMELA APARECIDA DINIZ

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS FRENTE À
UTILIZAÇÃO DE COLUTÓRIOS BUCAIS**



2011

PAMELA APARECIDA DINIZ

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS FRENTE À
UTILIZAÇÃO DE COLUTÓRIOS BUCAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático
para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José
dos Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

D615a Diniz, Pamela Aparecida.

Análise da frequência frente a utilização de colutórios bucais / Pamela
Aparecida Diniz. - São José dos Campos: [s.n.], 2011.
95f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista,
2011.

Orientador: Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode

1. Antissépticos bucais. 2. Testes para micronucleos. 3. Álcool .4.
Mucosa Oral. 5. Câncer Oral I. Rode, Sigmar de Melo. II. Universidade
Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III.
Título

tD65

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte

São José dos Campos, 22 de Junho de 2011.

Assinatura :

E-mail: pamela.diniz@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode (Orientador)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Universidade Estadual Paulista

Dra. Celina Faig Lima Carta

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Universidade Estadual Paulista

São José dos Campos, 22 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

*Cuidas de mim, Sei que Tu cuidas de mim, Senhor.
Ainda que eu ande pelo vale, E o achesse a sombra da morte.
Cuidas de mim, Cuidas de mim, Mesmo que eu não queira a Tua presença,
Mesmo que eu me afaste de Ti, Cuidas de mim. cuidas de mim.
Teu amor é como a rocha que não se quebra jamais. Teu amor é como o sol a
nascer toda manhã. É um amor que me constrange, Que me envolve e me
aquece.
Esse amor és Tu Senhor. És tu Senhor.
(Pde. Fábio de Melo- SCJ)*

*Ao meu “PAI ETERNO” fonte de toda sabedoria e
inteligência, pelo vosso olhar de misericórdia e compaixão
indescritível, porque nada seria possível sem a SUA vontade e SUA
permissão.*

*A “NOSSA SENHORA DA APARECIDA”, companheira de
viagem, socorro de minhas aflições, olhar materno que me conduz.*

*Aos meus pais, Vanderlei e Maria, amor tão grande que
nem cabe no peito, pelo apoio e por tornarem meu sonho possível.
Quando tudo parece perdido, é no sorriso de vocês que me
encontro, daí então, tenho a certeza de que tudo dará certo. Vocês
são minha força, rochedo, inspiração, meu sol, minha estrela, meu
mundo. Amo vocês.*

A minha irmã, Amanda, o sorriso dos meus lábios, a mão forte e o abraço quente. Obrigada pelo incentivo, por não me permitir desanimar, obrigada por sonhar comigo. Obrigada principalmente por acreditar nos meus sonhos

A minha irmã Paloma e ao meu cunhado Armando, alegrias do meu coração. Exemplos em minha vida. Modelo a ser seguido de união, superação, garra e especialmente de vitória! Obrigada por estarem ao meu lado, inspirando meus caminhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode, meu grande presente de mestrado! Por ter conduzido meu caminhar de maneira excepcional, pela calma, paciência, amizade, carinho e apoio. Por me inspirar a ser cada vez melhor! Obrigada por ser luz, quando meu caminho estava escuro.

A Dra. Celina Faig Lima Carta, inteligência inigualável e docilidade incomparável. Obrigado pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pelas horas de conversa, por me acalmar em minhas crises existenciais! Sou imensamente grata!

As meninas do laboratório, Ana Lourdes e Salete, pois com uma amizade incondicional, estiveram ao meu lado no executar deste trabalho, nos momentos de pavor e estresse, mas também nos risos e nas alegrias! Obrigada, meninas!

As amigas, companheiras e confidentes de Pós Graduação, Sabrina Pinotti, Gabriela Lima e Gabriela Santana, pelos muitos momentos de conversas e risos, as horas se tornam minutos quando estamos juntas, as dificuldades ficaram menores e o fardo fica mais leve! Obrigada por estar nessa caminhada lado a lado comigo! Somos vencedoras!

A amiga **Valéria Adriano Vieira**, pela companhia, amizade e principalmente por me acompanhar nos meus “pomodoros”! Obrigada por sempre ter uma palavra de carinho e um ombro amigo, pelo ânimo a cada dia, quando tudo nos levava a desanimar.

A amiga, confidente e companheira de trabalho, **Ellen Eduarda Fernandes** (Iniciação Científica – CNPQ), pela dedicação a este projeto, por me ajudar a desvendar os mistérios da pesquisa científica, por ser tão dócil e por mudar sua rotina em prol de nosso trabalho! Obrigada, Ellenzinha!

A minha amiga e irmã, CD **Bianca Gilli Marson**, que mesmo à distância me incentiva, me acolhe e me apóia desde a graduação! Minha grande e verdadeira amiga!

Aos meus amigos eternos, **Carlos Eduardo Guedes Belchior, Bruno Machado e Rodrigo Schall**, obrigada por me deixar partilhar da presença de vocês, mesmo na distância ou na ausência, sei que comigo estão!

Agradeço imensamente aqueles que perto ou longe, sonharam comigo. Partilho com vocês, neste momento minha imensa alegria!

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal, em especial a sua coordenadora, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, sou imensamente agradecida pela acolhida e pela oportunidade de fazer parte deste programa, na certeza de que excelentes frutos serão colhidos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação, de maneira especial a: Profa. Adj. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, pela dedicação e por compartilhar conosco seus conhecimentos e experiências; a Profa. Tit. Yasmin Carvalho Rodarte, exemplo a ser seguido de profissionalismo, paciência e docilidade. Obrigada por partilhar conosco suas sábias palavras!

Ao Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Especiais – CEBAPE, de maneira especial à Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes, pelas portas abertas, carinho, amabilidade e comprometimento com a pessoa humana.

Ao Prof. Ivan Balducci, pelo apoio nas análises estatísticas, pela paciência e carinho para com minha pesquisa.

Obrigada!

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para eu não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Enxaguatórios Bucais.....	20
2.2 Álcool e Carcinogênese.....	24
2.3 Enxaguatórios Contendo Álcool X Câncer.....	27
2.4 Teste de Micronúcleos e Biomonitoramento Genético.....	32
2.4.1 Critérios para pontuação dos Micronúcleos.....	34
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Amostra	36
4.2 Critérios de Exclusão.....	38
4.3 Metodologia da Citologia Esfoliativa.....	38
4.4 Técnica de Coloração	41
4.5 Análise das Lâminas.....	42
4.6 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Caracterização da Amostra.....	45
5.2 Frequência Geral de Micronúcleos.....	46
5.2.1 Frequência Geral de Micronúcleos X Variáveis Qualitativas.....	52
5.2.2 Frequência Geral de Micronúcleos X Idade.....	52
5.2.3 Frequência Geral de Micronúcleos X Sexo.....	54

5.2.4 Freqüência Geral de Micronúcleos X Demais Variáveis	
Qualitativas.....	55
5.3 Resultados Citológicos.....	55
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE	89
ANEXO.....	95

Diniz PA. Análise da frequência de micronúcleos frente à utilização de colutórios bucais [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O estudo avaliou a frequência de micronúcleos em amostras citológicas após a utilização diária de colutórios bucais. Os MN se originam a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase durante a divisão celular podendo ocorrer devido à exposição excessiva a agentes nocivos, defeitos na mitose e/ou processo de reparação do DNA. 45 indivíduos, com idades variando entre 17 a 42 anos e instituídos como critério de exclusão: ingestão de bebida alcoólica, fumantes; doença periodontal; doenças sistêmicas que possam interferir na integridade da mucosa jugal; indivíduos com histórico médico ou farmacológico que afetem o desempenho do estudo, histórico familiar de neoplasias malignas. A amostra foi dividida em 02 grupos experimentais e 01 grupo controle; estes realizarão enxágüe bucal com: água destilada (controle), Colgate Plax® sem álcool e Listerine® (por 03 semanas foi realizada a coleta citológica na mucosa jugal e porção mediana da borda de língua. O material coletado foi corado por coloração específica de *Feulgen/Fast Green*. A análise de 3000 células/indivíduo foi realizada por microscopia óptica e a estatística utilizou os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para frequência de MN e células micronucleadas. A frequência média de micronúcleos na mucosa jugal foi para o grupo Listerine de $1,31 \pm 1,25$ e de $1,02 \pm 0,96$, para o grupo Plax, demonstrando ligeira elevação em comparação com o grupo Controle ($0,95 \pm 0,76$); seguindo a mesma elevação em relação às células micronucleadas, para o grupo Listerine ($1,26 \pm 1,21$), grupo Plax ($0,91 \pm 0,79$) e ($0,82 \pm 0,61$) o grupo Controle. No sítio língua, o grupo Plax $1,28 \pm 1,42$, apresentou sensível diferença em comparação aos outros grupos Listerine $1,11 \pm 1,25$ e Controle $0,95 \pm 0,73$; o mesmo também foi observado na análise de células micronucleadas: Plax foi de $1,17 \pm 1,28$, $1,00 \pm 1,12$ para o grupo Listerine e $0,88 \pm 0,64$ para o grupo Controle. Os resultados demonstram ligeira elevação da frequência de MN, em relação aos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, porém esta diferença foi estatisticamente não significativa. Os resultados sugerem que os enxaguatórios bucais testados

não são indutores de alterações genotóxicas, não alterando dessa maneira a frequência MN.

Palavras-chave: Antissépticos bucais. Testes para micronúcleos. Álcool. Mucosa Oral. Câncer Oral.

Diniz, PA. Mouthwash: Evaluation of the frequency of micronuclei [dissertation]. School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

This study evaluated the frequency of micronuclei in cytological samples after daily use of oral mouthwash. The MN originates from chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during cell division. This damage can occur due to excessive exposure to harmful agents, defects in mitosis and / or DNA repair process. A sample of 45 individuals ranging from 17 to 42 years and established as a criterion for exclusion of alcohol intake greater than 01 alcoholic drinks weekly dose smoking, presence of periodontal disease, systemic diseases that may interfere with the integrity of oral mucosa, individuals with medical or pharmacological history that affects the performance of the study and individuals with a family history of malignancies. These individuals were divided into two experimental groups and one control group: distilled water (control), Colgate Plax Alcohol Free® and Listerine ® (for a period of 03 weeks). Once a week we performed the cytologic collection from left side of the buccal mucosal, and the middle portion of the edge of the tongue on the left. The collected material was stained with specific staining Feulgen/Fast Green. An analysis of 3000 cells / individuals was performed by optical microscopy and statistical tests used the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test for frequency of MN and micronucleated cells. The average frequency of total micronuclei in the mucosa was, to the Listerine ($1,31 \pm 1,25$) and for the Colgate it was $1,02 \pm 0,96$, showing a slight increase compared with the control group which had indices of $0,95 \pm 0,76$. Following the same elevation, a small increase was observed on the micronucleated cells for the Listerine group the mean was $1,26 \pm 1,21$, it was $0,91 \pm 0,79$ to the Colgate and $0,82 \pm 0,61$ to the control group. When we performed the assessment of the tongue site, the Colgate ($1,28 \pm 1,42$) showed significant difference compared to the other groups: Listerine ($1,11 \pm 1,28$) and Control ($0,95 \pm 0,73$). The same result was also observed in the analysis of micronucleated cells than for Colgate ($1,17 \pm 1,28$) for the Listerine ($1,00 \pm 1,11$) and for control ($0,88 \pm 0,64$). The results showed that there was a slight increase in the frequency of MN, for the two experimental groups when compared to the control group, but this difference

was not statistically significant. The results suggest that tested mouthwashes do not induce genotoxic alterations, consequently they do not have influence in the MN frequency.

Keywords: Mouthwash. Micronucleus Test. Alcohol. Oral Mucosa, Oral Cancer.

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia está voltada para a prevenção das doenças bucais e, sendo assim, o cirurgião dentista deve estar capacitado para atuar junto ao paciente dentro de um contexto amplo, proporcionando-lhes condições odontológicas favoráveis e de saúde para um bom relacionamento familiar e social (Albuquerque *et al.*, 2004). Inserido neste contexto a placa bacteriana torna-se um facilitador das cáries e das doenças periodontais e tem sido amplamente considerada o principal fator etiológico dessas doenças.

O controle da placa é básico para a prática odontológica, sem ele, a higiene bucal não pode ser alcançada nem preservada, e nem os resultados da terapêutica odontológica assegurados (Gebran, Gebert, 2002).

A qualidade da higiene bucal realizada pelo indivíduo assume característica fundamental. A remoção mecânica da placa, mediante escovação adequada associada ao fio dental ainda é considerada o principal, mais efetivo, acessível e difundido meio de prevenção das doenças bucais (Chiapinotto *et al.*, 1998). Concomitantemente o controle químico da placa bacteriana, por meio dos enxaguatórios bucais, constitui um método eficaz no auxílio do controle mecânico, porém sem substituí-lo (Marinho, Araújo, 2007).

Muitos dos colutórios com propriedades antiplaca contêm graus farmacêuticos de álcool, com os propósitos de solubilidade, preservação e atividade germicida. Os enxaguatórios que contêm álcool incluem compostos de óleos essenciais e clorexidina (Ferreira *et al.*, 2008).

O uso de colutórios orais aumenta o tempo de exposição da mucosa oral ao álcool, tem sido demonstrando que enxaguatórios bucais com alto teor de álcool produzem lesões hiperqueratinizadas tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Peláez et al., 2004), evidências afirmam que o tabagismo e consumo de álcool em excesso aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas de boca e orofaringe em humanos (Figueiro-Ruiz et al., 2004., 2003; Marshall et al., 1992; Moreno-López et al., 2000). Diante dessas afirmações, a ocorrência destes carcinomas em indivíduos não fumantes e que não consomem bebidas alcoólicas, influenciaram muitos pesquisadores a considerarem outros possíveis fatores de risco em potencial.

Mais recentemente, o uso regular de bochechos contendo álcool especialmente entre os não usuários de tabaco e álcool, também tem sido discutido como fator de risco para o câncer bucal.

O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, barato, não-invasivo, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, como consumo crônico e abusivo de álcool, tabaco e/ou outras substâncias mutagênicas (Gattás, 2001; Ramirez et al., 1999). Os micronúcleos se originam a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase durante a divisão celular. Este dano pode ocorrer devido à exposição excessiva a agentes nocivos, defeitos na mitose e/ou processo de reparação do DNA (Holland et al., 2008).

Desta maneira, a detecção de micronúcleos na citologia esfoliativa deve ser interpretada como exposição recente a carcinógenos ou como erros espontâneos durante a replicação de DNA (Bloching, 2000). Sua frequência elevada na mucosa oral é considerada um indicativo de efeitos

genotóxicos e está relacionado ao provável desenvolvimento de carcinomas da mucosa oral (Stich, Rösing, 1983).

Portanto, a utilização do teste do micronúcleo para analisar as possíveis alterações genotóxicas decorrentes do uso freqüente de enxaguatórios bucais. Avaliando então quantitativamente micronúcleos de indivíduos usuários de enxaguatórios bucais, através de citologia esfoliativa, com a finalidade de verificar tais efeitos genotóxicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enxaguatórios Bucais

Os primeiros relatos a respeito do uso de enxaguatórios bucais surgiram em meados de 1800, consolidando-se através dos tempos, devido às dificuldades de remoção de detritos orais (Asadoorian, 2006). Ainda que o foco fosse sobre a cárie e a sua prevenção, nos meados de 1960, estudos relacionaram os enxaguatórios antimicrobianos à prevenção da gengivite e periodontite (Mandel, 1988).

Atualmente reconheceu-se que as práticas mecânicas de higiene oral podiam ser insuficientes, proporcionando um impulso determinante para o uso de enxaguatórios. Embasado neste aspecto e acerca dos conhecimentos sobre os fatores etiológicos das doenças periodontais a placa dentária torna-se então o fator etiológico primário de duas das mais prevalentes doenças bucais: cárie dentária e doença periodontal (Page et al., 1998).

Conseguir um controle aceitável da placa na maioria dos pacientes não é tarefa fácil. Nem sempre são suficientes os habituais métodos mecânicos de remoção, os quais requerem tempo, motivação e destreza manual. Neste caso, existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais podem desempenhar um papel chave e de valor significativo como coadjuvantes dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças periodontais. Entretanto, em nenhum caso devem

substituir os métodos mecânicos de remoção da placa, e sim, atuar como auxiliares dos mesmos (Rojas, Santos-Aleman, 2005).

Os enxaguatórios bucais atuam como adjuvante no controle da placa e das doenças periodontais, agindo de modo a inibir a atividade bacteriana, sendo benéficos no tratamento e prevenção de diversas doenças orais ou orofaríngeas (Haq et al., 2009).

Além da ação aguda dos enxaguatórios, Otten et al., 2011 afirmaram que tanto os cremes dentais como os enxaguatórios bucais antimicrobianos são capazes de atuar nos microorganismos do biofilme dental, permanecendo biodisponível, quando aderido ao biofilme antigo, resultando na liberação prolongada de sua ação antimicrobiana, demandando excelente importância clínica, já que geralmente os pacientes não são capazes de remover completamente o biofilme bucal com a limpeza mecânica.

A utilização freqüente de enxaguatórios bucais vem tornando-se essencialmente popular nos últimos anos. Esta solução é eficaz no controle e redução da placa e das gengivites, seu uso aumentado tendeu-se devido a razões sociais e cosméticas (Gurdal et al., 2002).

A utilização de enxaguatórios bucais no Brasil encontra-se em franca ascensão na higiene oral, complementando o trio: escova, creme e fio dental. Entre 2002 a 2007 houve um aumento de 190% nas vendas, representando uma parcela significativa da população, segundo a Associação Brasileira de Higiene Pessoal e Cosméticos (ABIHPEC, 2009).

Monfrin e Ribeiro (2000) citaram como principais substâncias antimicrobianas utilizadas nas formulações dos enxaguatórios bucais os fluoretos de sódio, cloreto de cetilperidínio, triclosan, óleos essenciais, tirotricina entre outros.

O cloreto de cetilpiridínio, base das formulações das marcas comerciais de enxaguatórios Cepacol, Oral B e Colgate Plax é um composto

monovalente, catiônico, tensoativo pertencente ao grupo dos compostos quaternários de amônia (Mendes et al., 1995). Apresenta maior efetividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, provocando aumento da permeabilidade celular e rompimento da parede celular bacteriana (Gebran, Gebert, 2002), clinicamente fornece um benefício mesmo que pequeno, mas significativo na redução do acúmulo de placa e da inflamação gengival (Herrera, 2009). Akande, (2004), em uma análise de caso controle, afirma, da mesma maneira que os enxaguatórios derivados de cloreto de cetilpiridíneo, fornecem um aumento significativo na redução da microbiota oral, em comparação aos enxaguatórios contendo compostos fenólicos, triclosan ou óleos essenciais.

O uso prolongado dessa substância, porém pode causar sensação de queimação, descoloração dos dentes, ulcerações recorrentes e aumento da formação do cálculo (Granjeiro et al., 1993).

A clorexidina por sua vez, é uma bisguanida catiônica, encontrada principalmente em forma de sais de digluconato de clorexidina. Possui amplo espectro sobre bactérias gram-positivas, negativas, fungos e leveduras. Clinicamente apresenta redução significativa de placa bacteriana, pois age afetando a aderência microbiana aumentando a permeabilidade celular por meio do rompimento da bactéria. Apresenta concentrações variando de 0,12%, 0,2% e 2%, sendo a clorexidina a 0,12% a mais indicada, devido à associação da eficácia contra os microorganismos com a diminuição dos efeitos adversos, quando comparadas às soluções mais concentradas. (Mendes et al., 1995; Gebran, Gebert, 2002; Souza, Abreu, 2003).

O triclosan por sua vez, é um fenol sintético, não iônico que apresenta baixa toxicidade não provocando desequilíbrio na cavidade oral (Saba-Chujfi, 1998; Gebran, Gebert, 2002). Possui amplo espectro bacteriano, eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstra excelente efetividade contra *Mycobacterium*, tendo principal

afinidade com bactérias anaeróbias, assim como esporos e fungos da espécie *Cândida*. Sua ação ocorre pela lise da membrana citoplasmática do microorganismo (Saba-Chujfi, 1998; Monfrin, Ribeiro, 2000).

A tirotricina (gramicidina 20 a 25% e tirocidina cerca de 60%), presente no enxaguatório Malvatricin® (Daudt), é oriunda do *Bacillus brevis*, que dependendo de sua concentração, pode ter ação bacteriostática ou bactericida, atuando sobre bactérias gram-negativas e possuindo ação tópica duradoura (Monfrin, Ribeiro, 2000). O enxaguatório também apresenta extrato de malva além de outros componentes em sua composição, existindo formulações sem tirotricina.

O enxaguatório que apresenta o maior histórico de uso é composto por solução hidro-alcoólica dos óleos essenciais timol, mentol e eucaliptol. Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os óleos essenciais podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do produto devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes, os quais agem principalmente sobre bactérias gram-positivas e leveduras (Bugno et al., 2006).

Os óleos essenciais são compostos principalmente por timol, eucaliptol, mentol e salicilato de metila. Agem lesando a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos e diminuindo os lipopolissacarídeos e o conteúdo protéico da placa bacteriana (Mendes et al, 1995); possuem um amplo espectro antimicrobiano, afetando bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras. A eficácia dos anti-sépticos bucais advindos dos óleos essenciais é geralmente atribuída à sua atividade bactericida, porém, também por interferir na colonização bacteriana da superfície do dente, além de inibir a agregação bacteriana de gram-positivos, retardando a multiplicação bacteriana (Fine, 2010). Isto pode levar a uma redução da carga bacteriana, maturação lenta da placa e diminuição da massa e patogenicidade da placa bacteriana. Os óleos essenciais estão

envolvidos também na ruptura da parede celular e inibição enzimática (Fine, 2010).

Segundo Sharma et al. (2002) os óleos essenciais, possuem efeito antiplaca menor que a clorexidina, porém ao longo de um período de 6 meses em igualdade de condições, apresentam resultados equiparados em termos de seus efeitos antigengivite, devido à sua ação antiinflamatória.

No Brasil, segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2004, os enxaguatórios bucais são classificados como produtos de higiene pessoal e cosmético. As formulações que apresentam indicações específicas como antissépticos, antiplaca e de uso infantil são classificadas como produtos de grau 2 e demandam a comprovação da sua segurança e eficácia antimicrobiana.

2.2 Álcool e Carcinogênese

O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Além disso, é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação (Carrard et al., 2008).

O câncer é o resultado de mutações no DNA; mutações surgidas espontaneamente e por ação de vários agentes mutagênicos, especialmente o tabaco e o álcool. Uma seqüência de mudanças genéticas

iniciam eventualmente a perda de controle do crescimento e autonomia das células (Scully, 2011).

Os mecanismos pelos quais as bebidas alcoólicas exercem seu efeito cancerígeno não são bem compreendidos e provavelmente diferem de acordo com os sítios de atuação. (Boffetta, Hashibe, 2006)

Um aumento da proliferação celular decorrente do consumo crônico de álcool (Maier et al., 1994, Homman et al., 1997, Maito et al., 2003; Carrard et al., 2004), e um aumento da autólise ou morte celular (Mascre, Joly, 1981; Martinez et al. 2000; Martinez et al. 1998; Slomiany et al. 1998) parecem ser processos relacionados a influência do consumo de álcool no processo de renovação celular. Embora esses resultados pareçam inicialmente contraditórios, nada impede que o aumento da proliferação celular nas camadas mais profundas do tecido epitelial seja uma resposta adaptativa ao aumento da morte celular nas camadas mais externas, a fim de que seja mantida a homeostase (Carrard, 2004). Conclui-se dessa forma que o aumento da proliferação celular estaria atuando de maneira compensatória para manter a integridade do tecido epitelial, e poderia favorecer uma maior ocorrência de mutações e danos cumulativos, levando ao desenvolvimento do câncer (Carrard, 2008).

É notadamente reconhecido que o álcool é um fator de risco de grande impacto associado ao câncer oral. O etanol em si não é cancerígeno (Boyle et al, 2003; WHO, 1999), porém o primeiro produto metabólico, o acetaldeído, tem sido reconhecido como uma substância cancerígena local (Salaspuro, 2003), atuando genotóxicamente sobre as células (Boffetta, Hashibe, 2006). O acetaldeído (AA) é formado endogenamente como produto principal da oxidação metabólica do etanol dependente da enzima álcool desidrogenase (WHO, 1999).

O álcool pode ser cancerígeno através de vários mecanismos, a principal via e a mais importante é pela sua oxidação em

acetaldeído pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH). O acetaldeído é então degradado em acetato pelo aldeído desidrogenase (ALDH). Variações genéticas nas atividades dessas enzimas (ADH e ALDH) podem influenciar o resultado da exposição ao álcool, e sua carcinogenicidade (Scully, 2011).

A mucosa bucal não é o local preferencial para degradação do álcool, porém alguma quantidade é absorvida e metabolizada em nível tecidual durante a deglutição (Dong et al., 1996; Maher, 1997); então o acetaldeído é convertido imediatamente em acetato, mas em algumas situações pode haver seu acúmulo: consumo contínuo de altas doses, bem como degradação parcial da ALDH. Segundo Dellarco, 1988, o acetaldeído é um metabólito tóxico capaz de provocar a quebra da dupla fita de DNA e de formar complexos adutos com diferentes moléculas, principalmente com proteínas, o que compromete o metabolismo celular.

De acordo com International Agency for Research on Câncer, (IARC), 1999; em estudos com animais, relataram que a inalação de acetaldeído promoveu o surgimento de tumores no trato respiratório, particularmente adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas na mucosa nasal de ratos e carcinomas de laringe em hamsters.

Lachenmeier, 2009, através de estudo caso-controle, investigou os níveis de acetaldeído presentes na saliva após o uso de enxaguatórios bucais, dessa maneira afirmou que os níveis estavam próximos das concentrações normalmente encontradas em bebidas alcoólicas, ressaltando ainda, que esses mesmos níveis são compatíveis com a formação a adutos de DNA e troca das cromátides irmãs.

2.3 Enxaguatórios Contendo Álcool X Câncer

Os enxaguatórios bucais nas ultimas décadas, têm sido utilizados para uma variedade de finalidades, entre as quais a prescrição terapêutica para tratamentos das doenças gengivais, manutenção da higiene bucal e no controle da placa bacteriana (Gagari, Kabani, 1995).

A utilização de álcool nos enxaguatórios bucais, além de suas propriedades anti-sépticas, possui a função de solvente dos princípios ativos, além da função de preservar a composição e a fórmula. (Lorca-Sarañer et al., 2005; Ciancio et al., 1995).

As concentrações alcoólicas dos enxaguatórios podem variar de acordo com as necessidades de dissolução dos princípios ativos e dos agentes aromatizantes. Quando utilizado nos enxaguatórios, o etanol livre é reduzido, devido ao complexo processo dos componentes fenólicos ativos, de modo que o verdadeiro nível de etanol disponível é inferior ao indicado na rotulagem dos produtos; esta concentração alcoólica varia de 7 a 12% nos compostos de clorexidina e de 22 a 27% nos com óleos essenciais; comparando com as bebidas alcoólicas temos a cerveja variando em seu teor alcoólico de 5 a 7%, os vinhos 12 a 14% e os vinhos licorosos e destilados a 25% (Walsh, 2008).

Sabe-se, porém, que o álcool é reconhecido como potencial agente carcinogênico, através de vários mecanismos, sendo a mais importante pela oxidação do acetaldeído (cancerígeno) por enzimas (desidrogenases do álcool). O acetaldeído é então degradado a acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH). Variações genéticas nas atividades dessas enzimas (ADH e ALDH) podem influenciar o resultado da exposição ao álcool, e sua carcinogenicidade (Scully, 2011).

A suposição de que a solução alcoólica presente nos enxaguatórios bucais pudesse ser considerada um fator de risco para o câncer bucal foi relatado primeiramente por Weaver et al. em 1979.

Weaver et al. (1979), realizaram um estudo de caso controle, relatando que em 11 indivíduos não fumantes e não consumidores de bebidas alcoólicas, 10 utilizavam enxaguatórios bucais, em doses duplas e diárias, há mais de 20 anos, enxaguatórios estes com teor alcoólico em torno de 25%. Nessa amostra os enxaguatórios bucais foram considerados fator de risco para o câncer bucal, porém a afirmação não pôde ser sustentada quando fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas foram incluídos na amostra, resultando em uma amostra limitada e com dificuldades de comparabilidade entre os grupos comparados, segundo os próprios autores.

Blot et al. (1983) realizaram um estudo de caso controle; a amostra era constituída por 206 mulheres diagnosticadas com carcinomas em boca e orofaringe e 352 controles; estes eram indagados sobre o uso de enxaguatórios. Concluíram que não existia um aumento significativo entre o risco daqueles que utilizavam colutórios contendo álcool.

Wynder et al. (1983), através de uma investigação em nível hospitalar, com 571 indivíduos com carcinomas em boca e orofaringe (CBOF) e 568 controles, dentre esses 157 mulheres foram ouvidas, demonstrando uma moderada associação (2,8%) entre CBOF e enxaguatórios bucais, porém não houve relação dose-resposta quando relacionado ao tempo de uso em mulheres não fumantes e não consumidoras de bebidas alcoólicas. Os autores concluíram que devido a uma possível confusão causada por tabagismo e uso de álcool não foi possível estabelecer uma relação causal entre enxaguatórios e câncer de boca e orofaringe.

Em 1985, Mashberg et al., estudaram o uso de colutórios com álcool e sua associação com o câncer de boca e orofaringe em uma

amostra composta por homens etilistas e tabagista. Questionários foram aplicados nos quais foram relatados história médica, dados demográficos e utilização de enxaguatórios bucais, avaliando as porcentagens alcoólicas dos produtos. Os resultados não demonstraram diferenças significativas na frequência de uso entre o grupo experimental e grupo controle, relatando uma proporção de 43% de casos nesta amostra contra 48% no grupo controle. Afirmando então que as diferenças entre estas porcentagens eram estatisticamente insignificativas, não comprovando desta maneira associação em CBOF e colutórios com álcool.

Em 1989, Kabat et al., avaliaram através de investigação multihospitalar, por meio de entrevistas com 125 mulheres portadoras de carcinomas orais e orofaríngeos e 107 controles, A associação não pode ser encontrada, pois as participantes relataram utilizar colutórios para disfarçar o hálito provocado pelo uso de tabaco e bebidas alcoólicas.

Winn et al. (1991) consideraram a possibilidade que a exposição prolongada a certos compostos dos colutórios poderiam aumentar o risco de câncer oral. Realizaram então, uma análise através de entrevista em portadores de carcinomas orais e faríngeos e um grupo controle e a amostra foi pareada por sexo e idade. Os resultados relataram que o uso regular de enxaguatórios aumentou em 40% o risco de CBOF entre homens e 60% entre as mulheres, após um ajuste para tabagismo e bebidas alcoólicas. O risco foi aumentado em ambos os sexos quando se comparou duração X frequência e aumentado de acordo com as concentrações alcoólicas dos enxaguatórios, consistente com aumento de risco associado com consumo de bebidas alcoólicas.

Em 2001 os mesmos autores, conduziram uma análise semelhante em Porto Rico. Os dados demonstraram que aproximadamente 25% dos casos de neoplasias malignas de boca e orofaringe em homens e 50% dos casos em mulheres não foram associados ao uso de cigarro e

bebidas alcoólicas. Foi observado um risco aumentado, embora não significativo, em indivíduos não fumantes e que não consumiam bebidas alcoólicas, entre os quais foi observado um efeito da utilização de colutórios contendo álcool. Porém, afirmaram que não foram capazes de avaliar com precisão o relato de uso de tabaco, bebidas alcoólicas e colutórios contendo álcool. Os autores concluíram que não houve evidência de risco aumentado de neoplasias malignas de boca e orofaringe associadas ao uso de colutórios com álcool.

Em 2007, Guha et al. num estudo de caso controle, mostraram uma ligação significativa entre o uso diário de enxaguatórios bucais contendo álcool e o desenvolvimento de câncer bucal em pacientes que relataram este uso. Concluíram nesta metodologia que o uso de enxaguatórios contendo álcool pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço independente do uso de tabaco e consumo de álcool. Quando somente consideram-se as neoplasias malignas da cavidade oral, faringe e laringe, o uso de colutórios alcoólicos duas vezes ao dia, aumentou a incidência deste câncer em nove vezes para os fumantes, mais de cinco vezes para aqueles que também fazem o consumo de bebidas alcoólicas, e quase cinco vezes para aqueles que nunca ingeriram tais bebidas. Os autores, porém afirmaram não saber o tipo de enxaguatórios utilizado nem os teores alcoólicos dos mesmos.

Marques et al. em 2008, em um estudo de caso-controle de base hospitalar, incluíram na amostra 309 pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e 468 controles, pareados por sexo e idade. Por entrevista foram questionados sobre tabagismo, consumo de álcool, escolaridade, saúde bucal e práticas de higiene bucal, resultando em uma associação mais intensa com tumores de faringe aqueles que utilizavam enxaguatórios bucais contendo álcool, afirmando desta maneira que o uso diário de enxaguatórios bucais apresentou associação mais intensa de

tumores de faringe do que tumores de boca, e afirmando ainda que o uso habitual de enxaguatórios bucais foi fator associado com as neoplasias malignas orais, independentes do tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas.

Cullough e Faraht em 2008, afirmaram baseados em revisões literárias que já havia provas suficientes para aceitar a proposição de que a probabilidade para o desenvolvimento do câncer é maior ou então agravada pelo uso de colutórios contendo álcool, citando ainda que desaconselham os profissionais em recomendar o uso em longo prazo desses tipos de bochechos.

Em 2009 Vecchia, utilizando-se de uma análise crítica dos dados publicados nas ultimas três décadas, revelou que não há estabelecido uma possível relação entre colutórios bucais contendo álcool e as neoplasias malignas orais, já que estes estudos não são apoiados por evidências epidemiológicas, tornando-os inconsistentes. Pesando ainda contra essa associação, está o baixo risco de desenvolvimento de neoplasias malignas no aparelho digestivo devido a concentrações mínimas de álcool.

Teles e Teles, em 2009, através de metanálise, não encontraram evidência na literatura que o uso de enxaguatórios com álcool pudesse aumentar o risco de câncer bucal e orofaríngeo, chamando a atenção para que a maioria dos trabalhos sobre o assunto apresentava sérias deficiências, prejudicando os resultados.

Recentemente em 2010, Lachenmeier; discutiu baseado em uma revisão literária, sobre os efeitos cancerígenos de bochechos contendo álcool e concordou plenamente em desaconselhar o uso regular de enxaguatórios orais contendo álcool por razões de prudência, especialmente por estes estarem disponíveis comercialmente; em contraposição Divaris et al., 2010, afirmaram que qualquer associação entre a utilização de enxaguatórios e a possibilidade de câncer oral, deve ser tratada com cautela,

pois nas pesquisas anteriores há pouca informação específica sobre os produtos utilizados e seu teor de álcool, bem como os dados de frequência deste uso.

2.4 Teste de Micronúcleos e Biomonitoramento Genético

A molécula de DNA é responsável pelo controle de todo o metabolismo que a célula desempenha durante o ciclo celular. Alterações na estrutura da molécula de DNA podem resultar em descontrole das funções celulares. Eventos que desregulem o ciclo celular podem ser umas das causas que antecedem a iniciação ou promoção tumoral. Cromossomos aberrantes, frequência aumentada de micronúcleos e a troca entre cromátides irmãs freqüentes, sejam espontâneos ou induzidos por agentes genotóxicos são bons indicadores de danos biológicos ao material genético (Da Cruz, 1994)

O micronúcleo é pode ser definido como fragmentos ou cromossomos inteiros acêntricos que não foram incluídos no núcleo principal nas células filhas. A formação de micronúcleos pode ser induzida por substâncias clastogênicas (substâncias que causam quebras cromossômicas) ou aneugênicas (agentes que afetam o reparo do fuso mitótico) (Belien et al., 1995).

Ou ainda, como Holland et al., 2008: “Os micronúcleos se originam a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase durante a divisão celular. O dano pode ocorrer devido à exposição excessiva a agentes nocivos, defeitos na mitose e/ou processo de reparação do DNA.”

Sua frequência elevada na mucosa oral é considerada um indicativo de elevação das taxas de mutação e está relacionado ao desenvolvimento de carcinomas da mucosa oral (Stich et al. 1983).

A mucosa bucal é constituída por epitélio escamoso estratificado que permite uma abordagem minimamente invasiva para as coletas celulares, sendo que 90% das lesões de câncer bucal são de origem epitelial (Cairns, 2006). A utilização de células bucais tem grande potencial epidemiológico, tanto como um meio não-invasivo para avaliação genotóxica quanto na identificação de potenciais biomarcadores para avaliação de doenças futuras (Thomas et al., 2011).

O biomonitoramento genético revela-se de grande valia como medida de estimativa de exposição ambiental a agentes genotóxicos. Particularmente, a biomonitorização de populações humanas expostas a agentes potencialmente mutagênicos, citotóxicos, ou mesmo cancerígenos podem fornecer uma detecção precoce do sistema de desregulamentação celular no desenvolvimento do câncer. (Valverde, Rojas, 2009)

A análise de danos de DNA, através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da cavidade bucal promete ser um método amplamente utilizado, sendo minimamente invasivo e utilizado para monitorização das populações expostas a agentes genotóxicos. Outra grande vantagem do teste MN é a relação custo/eficiência, uma vez que com um investimento limitado de tempo e dinheiro, o torna uma medida confiável de instabilidade genética podendo ser aplicada em grandes populações humanas. (Ceppi et al., 2010)

O teste de micronúcleos em células da mucosa bucal é um dos métodos menos invasivos para avaliação de danos genéticos em humanos. Foi inicialmente proposto por Stich e Röslein em 1983, e continua ganhando popularidade como biomarcador de dano genético, suas

informações podem ser usadas como um alerta precoce de risco em potencial em desenvolver problemas de saúde a longo prazo (Au, 1991).

O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, barato, não-invasivo, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, como consumo crônico e abusivo de álcool, tabaco e/ou outras substâncias mutagênicas (Gattás, 2001; Ramirez et al., 1999) ou ainda considerado por Ladeira et al., 2011; como um procedimento simples, prático, de baixo custo podendo ser utilizado para a prevenção e gestão clínica de trabalhadores sujeitos a riscos ocupacionais cancerígenos, ou seja, através da exposição a um agente genotóxico, tais como formaldeído.

Desta maneira a detecção de micronúcleos na citologia esfoliativa deve ser interpretada como exposição recente a carcinógenos, ou reparo frente a erros espontâneos durante a replicação de DNA. (Bloching, 2000).

2.4.1- Critérios para pontuação dos micronúcleos

Um aspecto importante da técnica de micronúcleos em células da mucosa bucal é o critério para a identificação e contagem das células.

Tolbert et al. (1992), propõe critérios mais aceitos e utilizados que serão apresentados na descrição dos materiais e métodos.

3 PROPOSIÇÃO

Tivemos como proposição a análise da frequência de micronúcleos nas células esfoliadas da mucosa bucal em seres humanos após o uso diário de enxaguatórios, a fim de contribuir para elucidar a respeito da participação do álcool dos enxaguatórios bucais na carcinogênese oral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos sob o protocolo número 094/2009-PH/CEP. (*Anexo A*)

Os indivíduos foram orientados quanto à utilização de seus dados, material citológico e quanto à importância da pesquisa e sigilo das informações. Aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), (Apêndice A) permitindo a utilização das informações e material coletado na pesquisa.

4.1 Amostra

A amostra foi composta 45 alunos (graduação, pós-graduação e pré-vestibular) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP com idade entre 17 e 42 anos, sendo selecionados aleatoriamente.

A amostra foi distribuída da seguinte maneira:

Grupo 1 - Controle - 15 indivíduos utilizaram na forma de bochecho, 20ml de água destilada, por 30 segundos, duas vezes ao dia (manhã e noite), após higiene oral, por 03 semanas subsequentes.

Grupo 2 - Colgate Plax Sem Álcool® (*Fluoreto de sódio (225 ppm de flúor), cloreto de cetilpiridino (0,05%), água, glicerina, propileno glicol, benzoato de sódio, aroma, ácido fosfórico e sacarina sódica*) - 15 indivíduos utilizaram na forma de bochecho, 20ml do colutório Colgate Plax sem álcool® (Colgate-Palmolive), por 20 segundos, duas vezes ao dia (manhã e noite), após higiene oral, de acordo com indicação do fabricante, por 03 semanas subseqüentes.

Grupo 3 - Listerine® Johnson & Johnson (*Timol 0,064%, eucaliptol 0,092%, salicilato de metila 0,06% e mentol 0,042%, Fluoreto de sódio 0,022% (100ppm de Flúor), excipiente: água purificada, solução de sorbitol, álcool 21,6%, poloxamer 407, ácido benzóico, aroma de menta, sacarina sódica, benzoato de sódio N-propanol, corante amarelo #10 e corante verde # 3.*) - 15 indivíduos utilizaram na forma de bochecho, 20ml do colutório Listerine Menta Defesa® (Johnson & Johnson), por 30 segundos, duas vezes ao dia (manhã e noite), após higiene oral, de acordo com indicação do fabricante, por 03 semanas subseqüentes.

Quadro 1- Distribuição dos grupos experimentais segundo tratamento testado:

Grupos	Enxaguatórios Testados	Dose	Tempo de bochecho	Freqüência	Duração do tratamento
Grupo 1 - Controle	Água destilada	20ml	30 seg	2x ao dia (manhã e noite)	03 semanas
Grupo 2 - Plax	Plax® - Colgate sem álcool	20ml	60 seg	2x ao dia (manhã e noite)	03 semanas
Grupo 3 - Listerine	Listerine® Johnson&Johnson	20ml	30 seg	2x ao dia (manhã e noite)	03 semanas

Os voluntários foram submetidos a anamnese, na qual foram obtidos dados de saúde geral, bem como de seus hábitos (Apêndice B).

4.2 Critérios de Exclusão

A amostra foi caracterizada pela aplicação de questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, hábitos de consumo de tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de enxaguatórios bucais e exposição a outros agentes genotóxicos.

Serão instituídos como critérios para exclusão da amostra: (Riep et al., 1999):

- Consumo de bebida alcoólica durante o período de avaliação. (Quantidade máxima permitida semanal: 1 lata de cerveja (330 ml) a 5% álcool= 13 gramas de etanol ou 1 copo de vinho (140 ml) a 12% álcool= 13,3 gramas de etanol, segundo critérios AUDIT, 2001; para bebedores de baixo grau).
- Consumo de tabaco;
- Utilização de enxaguatórios bucais no mês anterior ao início das coletas citológicas;
- Presença de doença periodontal;
- Presença de doenças sistêmicas que possam interferir na integridade da mucosa jugal. (Diabetes, pênfigo e lúpus)
- Indivíduos com histórico familiar de neoplasias maligna:

4.3 Metodologia da Citologia Esfoliativa

Foram realizadas 04 coletas, sendo 01 para controle inicial, e as restantes semanalmente por um período de 03 semanas subseqüentes.

As coletas foram realizadas em dias e horários pré-estabelecidos, preferencialmente pela manhã no mínimo duas horas após a última refeição.

A coleta procedeu-se pela esfoliação gentil do tecido epitelial mucoso, obtida com o auxílio de escova *cytobrush*. Duas áreas distintas da cavidade oral desses indivíduos foram submetidas à coleta de células para análise de frequência de micronúcleos:

(A) mucosa jugal do lado esquerdo, aproximadamente 1 cm abaixo do ducto da parótida, paralelamente a linha Alba e

(B) porção mediana da borda de língua do lado esquerdo.

Todos os voluntários foram submetidos a este procedimento no primeiro dia antes do início dos testes. Anteriormente a cada coleta citológica, foi realizado bochecho de dez segundos com água destilada.

Os materiais citológicos foram fixados e processados de acordo com o método *Feulgen* contra corados com Fast Green.

Após a coleta, os materiais foram dispostos suavemente sobre as lâminas de vidro e fixados em solução spray fixadora Vagispec® solução de propilenoglicol e álcool absoluto, (Vagispec® Adlin Plásticos Ltda, Brasil) (Souza et al. 2009); as amostras foram então, encaminhadas ao Laboratório do CEBAPE - Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Especiais, procedendo a coloração (Método *Feulgen* contra coradas com Fast Green).

As lâminas previamente identificadas foram armazenadas em caixas porta lâminas.

A figuras 1, ilustra as coletas citológicas, fixação e armazenamento:



Figura 1- a) Coleta de citologia esfoliativa em borda lateral de língua do lado esquerdo; b) coleta de citologia esfoliativa em mucosa jugal do lado esquerdo; c) aplicação do material

coletado sobre a lâmina pré-identificada; d) fixação do material coletado com fixador Vagispec® Adlin Brasil; e) armazenamento das lâminas em containers porta lâminas, para posterior coloração.

4.4- Técnica de Coloração

O método de *Feulgen* é específico para DNA consiste em uma reação de natureza estequiométrica em que cada molécula fixada pelo reativo de Schiff corresponde a uma porção constante e equivalente da molécula de DNA. A técnica foi desenvolvida por Robert Feulgen e Rossenbeck, em 1924, para identificação de material nuclear (Hardie et al., 2002), e fornece preparações limpas e de excelente contraste. As cromátides aparecem claramente, delimitados com as constrições primárias e secundárias mais evidentes. Sua desvantagem é a instabilidade do corante. (Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas - UEL).

Quadro 2 - Técnica seqüencial de coloração para o método *Feulgen* (continua)

Seqüência	Ação	Procedimento
01	Remoção da Solução Fixadora	<i>Enxágüe em álcool 95%</i>
02	Hidratação	<i>HCl 4N por 5 minutos em temperatura ambiente,</i>
03	Coloração Nuclear	<i>Reagente Schiff- Merck®®, por 90 min a 4°C, sem presença de luz</i>
04	<i>Lavagem</i>	<i>3 mergulhos seguidos em água destilada</i>

Quadro 2 - Técnica seqüencial de coloração para o método *Feulgen* (conclusão)

05	Contra Coloração de Fast Green Coloração Citoplasmática	<i>1 mergulho em solução de Fast Green Vetec®,</i>
06	Desidratação	<i>3 mergulhos seguidos em álcool absoluto.</i>
07	Clareamento	<i>Xilol 6 a 8 mergulhos cada</i>
08	Montagem - Permite a ligação entre a lâmina e lamínula; protege o material da dessecação e age como selador contra o oxigênio, prevenindo o desbotamento do corante.	<i>Entelan e lamínula</i>

Adaptado de Ramirez e Saldanha, 2002.

4.5- Análise das Lâminas

As lâminas foram examinadas sob microscopia de luz utilizando o microscópio óptico modelo AXIOSKOP2/Zeiss® com sistema de foto integrado Canon, inicialmente com aumento 40x e para confirmação dos micronúcleos aumento 100x.

Para a análise de micronúcleos, observou-se no mínimo 3000 células, seguindo os padrões indicados por Holland et al, 2008.

Os critérios adotados foram os estabelecidos por Tolbert et al, 1992, para seleção, inclusão, número de células e identificação de micronúcleos:

a) Seleção e número de células que foram avaliadas;

Segundo Holland et al., 2008, recomenda-se 1000 células com um aumento para 2000 a 3000 células se menos de cinco MN forem observados após a contagem de 1000 células; embora tenha sido sugerido 10.000 células para se observar um aumento estatístico significativo.

b) Inclusão de células:

b.1) citoplasma de células intactos e posição relativamente plana sobre a lâmina;

b.2) pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;

b.3) poucos debris;

b.4) perímetro nuclear distinto, normal e intacto .

c) Critérios para identificação dos micronúcleos:

c.1) perímetro arredondado sugestivo de uma membrana;

c.2) diâmetro inferior a um terço do núcleo, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor;

c.3) Feulgen positivo, ou seja, rosa quando iluminada em campo claro;

c.4) a intensidade de coloração semelhante à do núcleo;

c.5) textura semelhante à do núcleo;

c.6) mesmo plano focal do núcleo;

c.7) inexistência de sobreposição ou ligação com o núcleo.

4.6 Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Mann Whitney e correlação de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

Foram avaliados 45 indivíduos, distribuídos em 3 grupos experimentais:

- **Grupo Controle**, constituído por 13 mulheres e 02 homens, a média de idade foi de 26 anos (variando entre 17-35 anos),
- **Grupo Plax**, constituído por 08 mulheres e 07 homens, a média de idade de 29 anos (variando de 17-42 anos),
- **Grupo Listerine**, constituído por 09 mulheres e 06 homens, a média de idade foi 28 anos (variando de 18-38 anos)

Quanto à etnia no grupo Controle 80% se declararam brancos e 20% pardos, no grupo Plax 66,67% brancos, 26,67% pardos e 6,67% negros; no grupo Listerine 86,67% brancos e 13,33 pardos%.

Quando se indagou a respeito dos indivíduos que estavam sob tratamento médico 60% dos indivíduos responderam negativamente no grupo Controle, 80% no grupo Plax e 93,33% no grupo Listerine. Quanto do uso de medicamentos; os anticoncepcionais foram mais citados em 42,86% da amostra no grupo Controle, seguido por antidepressivos 14,29% e hormônios tireoidianos 7,14%. No grupo Plax 86,6% responderam não fazer uso de qualquer medicamento, 6,67% relatam utilizar anticoncepcionais e 6,67 antidepressivos. No grupo Listerine 86,67% responderam

negativamente para o uso de medicamentos, 13,33% usavam anticoncepcionais e 6,67% antidepressivos.

Quando questionados sobre o uso de tabaco, 100% dos indivíduos afirmaram que não faziam uso de tabaco, quanto ao consumo de bebidas alcoólicas 100% do grupo controle afirmaram não ter consumido bebidas alcoólicas durante a pesquisa, 20% do grupo Plax e 13,34% do grupo Listerine, consumiram durante a pesquisa a dose máxima permitida de bebidas alcoólicas.

As atividades profissionais principais foram assim citadas: Grupo Controle: 86,67% estudantes, 6,67% dentistas e 6,67% biólogos. Grupo Plax: 46,67% estudantes, 26,67% dentistas, 13,33% militares, 6,67% biólogos e 6,67% professores. Grupo Listerine: 46,67% estudantes, 20% dentistas, 6,67% assistentes administrativos, 6,67% biólogos, 6,67% publicitários e 6,67% relações públicas.

5.2 Frequência Geral de Micronúcleos

A tabela 01 compara os resultados para os três grupos (Controle, Plax e Listerine) através do teste de Kruskal-Wallis para frequência geral de MN e células micronucleadas em mucosa e língua.

Tabela 01 - Frequência Total de MN e Células Micronucleadas em mucosa jugal

	<i>Total de Geral de MN</i>			<i>Total Geral de Células Micronucleadas</i>		
	Controle	Plax	Listerine	Controle	Plax	Listerine
Média	0,95	1,02	1,31	0,82	0,91	1,26
Mediana	1	1	1	1	1	1
Desvio Padrão	0,76	0,96	1,25	0,61	0,79	1,21
p-valor	0,3760			0,1416		

Kruskal Wallis: nível de significância 5%

Tabela 02 - Frequência Total de MN e Células Micronucleadas em língua

	<i>Total de Geral de MN</i>			<i>Total Geral de Células Micronucleadas</i>		
	Controle	Plax	Listerine	Controle	Plax	Listerine
Média	0,95	1,28	1,11	0,88	1,17	1,00
Mediana	1	1	1	1	1	1
Desvio Padrão	0,73	1,42	1,25	0,64	1,28	1,12
p-valor	0,8741			0,7917		

Kruskal Wallis: nível de significância 5%

Diante dos números analisados, pode-se constatar um ligeiro aumento no número de MN quando comparado o grupo Controle em relação aos grupos Plax e Listerine e também quando esses são comparados entre si; porém não ocorreu diferença estatística significativa.

Quando analisado o sítio mucosa jugal, o grupo Controle teve como média um total de MN entre $0,95 \pm 0,76$, o grupo Plax a variação de MN foi de $1,02 \pm 0,96$ e para o grupo Listerine foi de $1,31 \pm 1,25$. Em relação à frequência de células micronucleadas os valores variaram para o grupo Controle $0,82 \pm 0,61$, $0,91 \pm 0,79$ para o grupo Plax e $1,26 \pm 1,21$ para o grupo Listerine.

Para o sítio língua, a média de MN para o grupo Controle variou entre $0,95 \pm 0,73$, para o grupo Plax $1,28 \pm 1,42$ e para o grupo Listerine $1,11 \pm 1,25$. Quanto à frequência de células micronucleadas o grupo Controle apresentou média de $0,88 \pm 0,64$, o grupo Plax $1,17 \pm 1,28$ e o grupo Listerine $1,00 \pm 1,12$.

As tabelas 03 e 04 comparam os resultados das frequências médias de células com 01 MN, células com mais de 1 MN, total de células micronucleadas e total de MN, para os três grupos (Controle, Plax e Listerine), através do teste de Kruskal-Wallis, para os sítios mucosa jugal e língua.

Tabela 03 - Frequência Média: Células com 1 MN, Células com + de 1 MN, Total de Células Micronucleadas e Total de MN, por grupo no sítio mucosa jugal

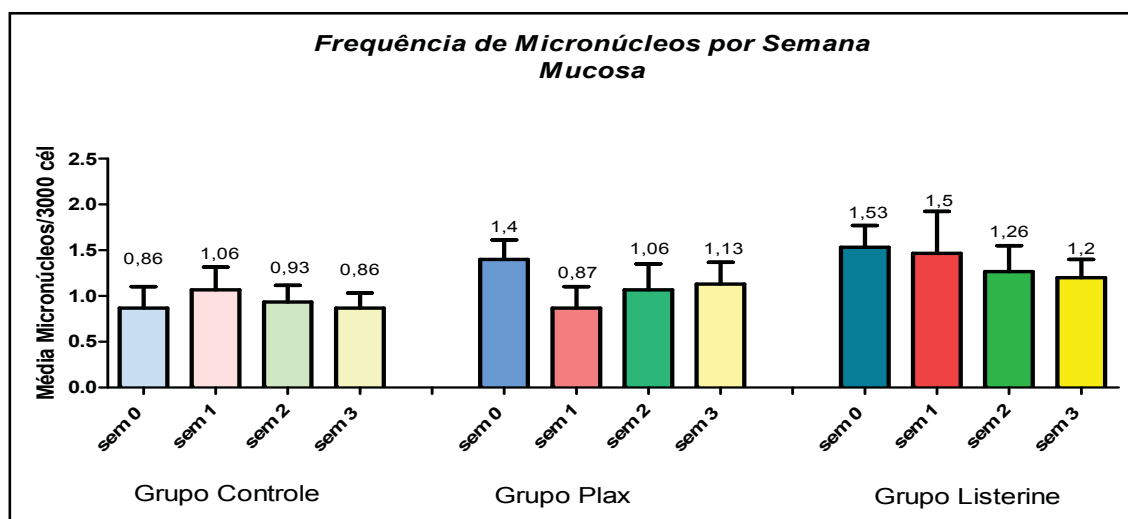
Mucosa Jugal				
	Células com 1 MN	Células com + de 1MN	Total de Células Micronucleadas	Total de MN
Controle	0,73	0,15	0,82	0,95
Plax	0,79	0,11	0,90	1,02
Listerine	1,22	0,06	1,26	1,31

Kruskal Wallis: nível de significância 5% $p=0,8541$

Tabela 04 - Frequência Média: Células com 1 MN, Células com + de 1 MN, Total de Células Micronucleadas e Total de MN, por grupo no sítio Língua

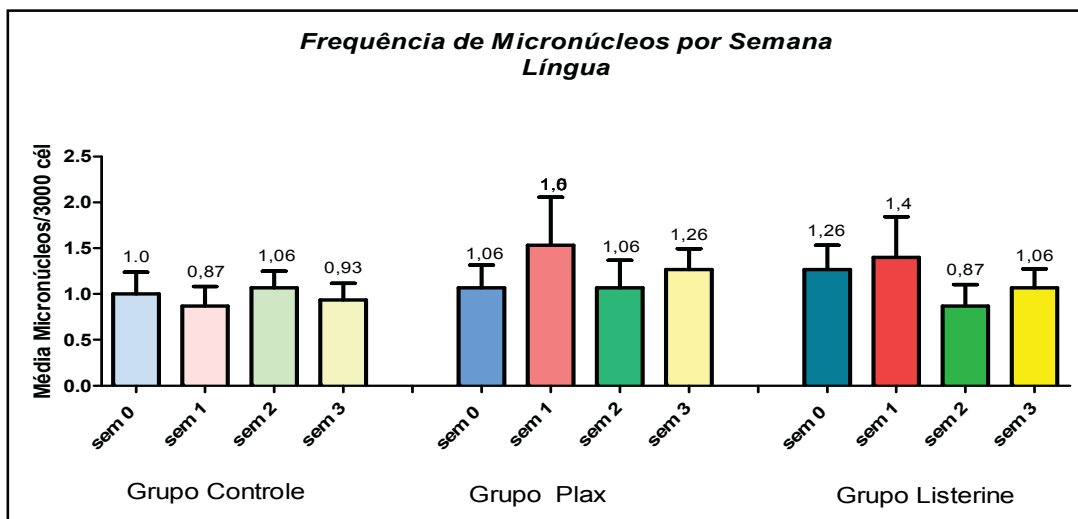
Língua				
	Células com 1 MN	Células com + de 1MN	Total de Células Micronucleadas	Total de MN
Controle	0,86	0,04	0,88	0,95
Plax	1,02	0,31	1,28	1,28
Listerine	0,91	0,08	1,00	1,11

Kruskal Wallis: nível de significância 5% $p=0,7241$



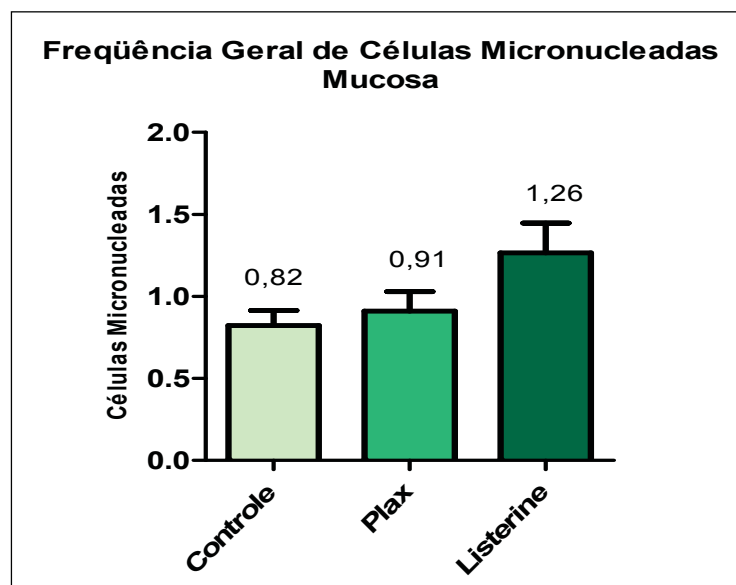
Kruskal Wallis: nível de significância 5% p valor=0,5316

Figura 06- Distribuição da frequência de micronúcleos do sítio mucosa jugal, de acordo com as semanas subdivididas em grupos.



Kruskal Wallis: nível de significância 5% p valor= 0,9883

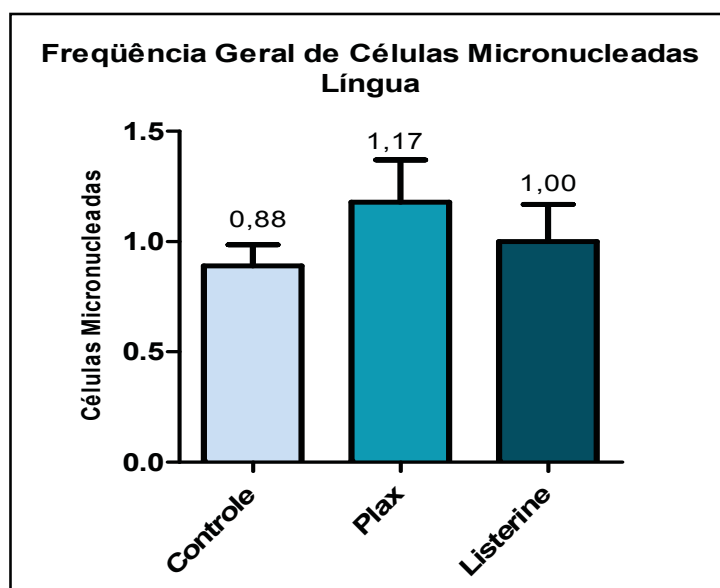
Figura 7- Distribuição da frequência de micronúcleos do sítio língua, de acordo com as semanas subdivididas em grupos



Kruskal Wallis: nível de significância 5% p valor= 0,1416

Figura 08- Distribuição da frequência total de células micronucleadas do sítio mucosa jugal.

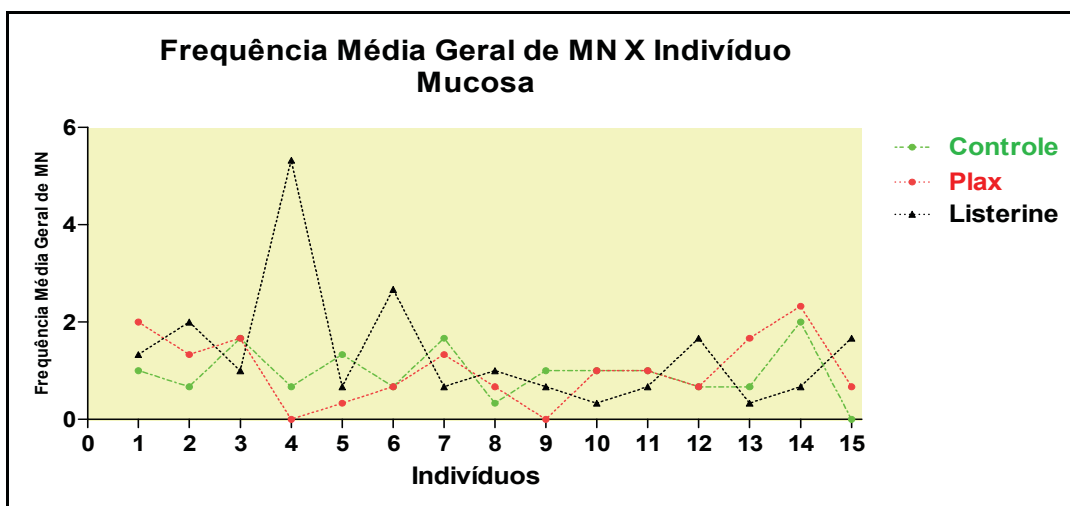
A figura 09 demonstra a frequência total de células micronucleadas expressas em língua, evidenciando discreta elevação da frequência de células micronucleadas no grupo Plax em comparação com o grupo Controle.



Kruskal Wallis: nível de significância 5% P valor=0,7917

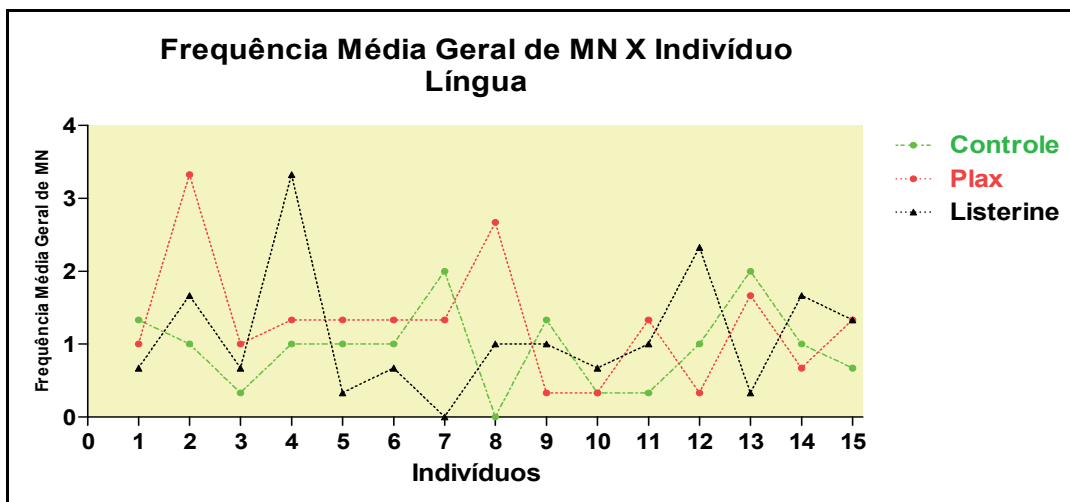
Figura 9- Distribuição da frequência total de células micronucleadas do sítio língua

Nas figuras 10 e 11, comparam os resultados para os três grupos (Controle, Plax e Listerine) através do teste de Kruskal-Wallis para frequência geral de MN e células micronucleadas em mucosa jugal e língua.



Controle: p valor=0.5604, Plax: p valor=0.9694, Listerine: p valor=0, 1325 > 0.05 ns
Kruskal Wallis: nível de significância 5%.

Figura 10 - Distribuição da frequência média geral de micronúcleos por indivíduo em mucosa jugal:



Controle: p valor=0.7473, Plax: p valor=0.4829, Listerine: p valor=0,5440 > 0.05 ns
Kruskal Wallis: nível de significância 5%

Figura 11 - Distribuição da frequência média geral de micronúcleos por indivíduo em língua:

5.2 Frequência Geral de Micronúcleos e Variáveis Qualitativas

A quantificação de associação entre duas variáveis foi avaliada por meio da análise de correlação de Spearman. A correlação de Spearman é uma prova não paramétrica com a finalidade de determinar o grau de associação entre duas variáveis. Dessa maneira, quando a correlação é positiva indica que as variáveis são diretamente proporcionais. Para auxiliar nessa correlação, foi utilizado o teste de coeficiente de variação, onde o resultado do p-valor (é uma estatística utilizada para sintetizar o resultado de um testes de hipóteses), onde, se o p-valor é menor que o nível de significância (5% ou 0,05), a hipótese avaliada é considerada verdadeira.

5.2.1 Frequência Geral de MN x Idade

A tabela 5 demonstra através da correlação de Spearman a associação entre a frequência geral de MN e Idade

Tabela 5 – Correlação de Spearman para Frequência de MN X Idade

Resultado				
Controle	Mucosa Jugal	Correlação	-0,2120	Correlação negativa
		p-valor	0,4481	Não significativa
	Língua	Correlação	0,2480*	Correlação positiva
		p-valor	0,3728	Não significativa
Plax	Mucosa jugal	Correlação	0,2978*	Correlação positiva
		p-valor	0,2810	Não significativa
	Língua	Correlação	-0,1824	Correlação negativa
		p-valor	0,5153	Não significativa
Listerine	Mucosa jugal	Correlação	0,0135*	Correlação positiva
		p-valor	0,9680	Não significativa
	Língua	Correlação	-0,0313	Correlação negativa
		p-valor	0,9116	Não significativa

* Hipótese Significativa

A figura 12 mostra a frequência geral de MN por indivíduo e idade, por meio do modelo estatístico de Mann Whitney

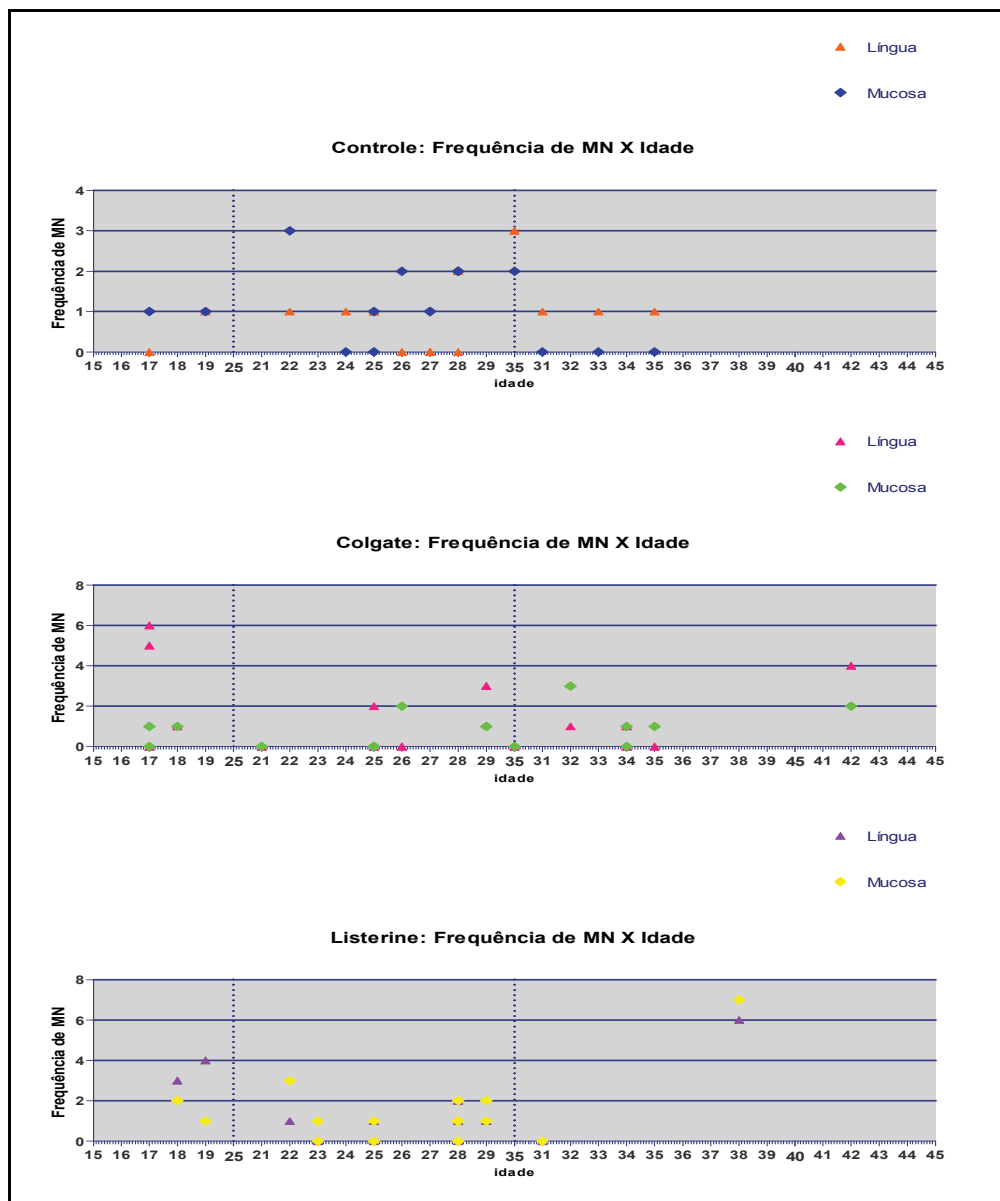


Figura 12- Frequência Geral de MN por indivíduo x Idade, por sítio e grupo Experimental.

5.2.2 Frequência Geral de MN x Sexo

Embora haja diferenças na frequência de MN entre os sexos masculino e feminino, os mesmos não foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Mann Whitney, como descrito nas tabelas abaixo:

As tabelas 06, 07 e 08 demonstram a frequência geral de micronúcleos por sexo e sítio do grupos Controle, Plax e Listerine, respectivamente..

Tabela 6 – Frequência Média de MN por sexo e por sítio, grupo Controle

CONTROLE	Sexo	N	Média MN	Desvio Padrão
<i>Língua</i>	F	13	0,962	0,366
	M	2	1,000	0,707
<i>Mucosa Jugal</i>	F	13	0,904	0,526
	M	2	1,125	0,530
P valor= 0,8663 > 0.05 ns Mann Whitney: nível de significância 5%				

Tabela 7 – Frequência Média de MN por sexo e por sítio, grupo Plax

PLAX	Sexo	N	Média MN	Desvio Padrão
<i>Língua</i>	F	8	0,969	0,411
	M	7	1,536	0,770
<i>Mucosa Jugal</i>	F	8	1,188	0,513
	M	7	1,036	0,529
P valor=0.3601 > 0.05 ns Mann Whitney: nível de significância 5%				

Tabela 8 – Frequência Média de MN por sexo e por sítio, grupo Listerine

<i>LISTERINE</i>	<i>Sexo</i>	<i>N</i>	<i>Média MN</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Língua</i>	F	9	0,917	0,661
	M	6	1,500	0,922
<i>Mucosa Jugal</i>	F	9	1,222	0,441
	M	6	1,583	0,585
P valor=>		0.1672 > 0.05 ns Mann Whitney: nível de significância 5%		

5.2.3 Frequência Geral de MN x Demais Variáveis Qualitativas

As variáveis qualitativas: etnia, medicamentos, tratamento médico, suplementos vitamínicos e uso de bebidas alcoólicas não puderam ser avaliadas devido à mínima variação na amostra.

5.3 Resultados Citológicos

As figuras abaixo ilustram a análise citológica.

A figura 13 representa o esfregaço corado pelo Método de *Feulgen-Fast Green*.

As figuras 14 e 15 representam células micronucleadas

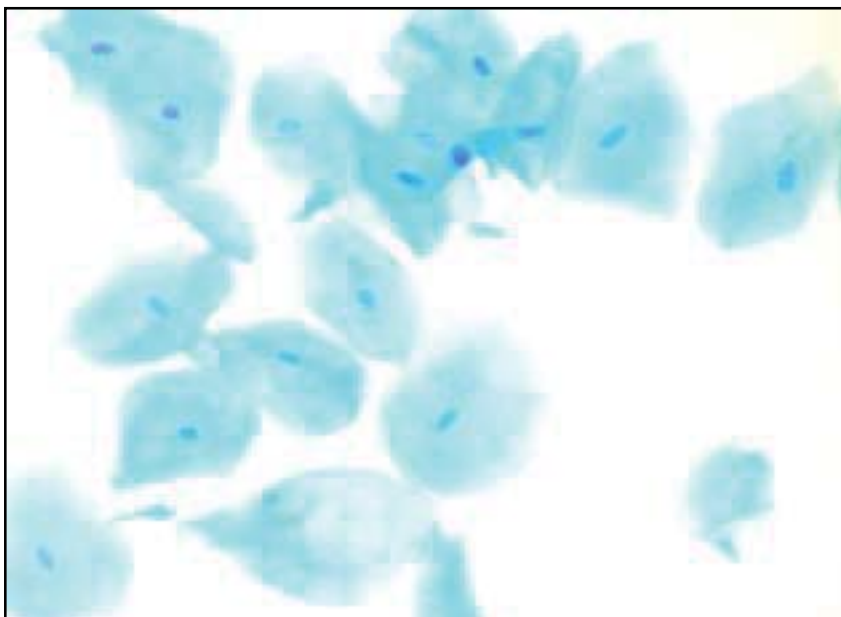


Figura 13 - Esfregaço corado pelo método Feulgen-Fast Green, apresentando citoplasma verde e núcleo magenta.(400x) Grupo Controle.

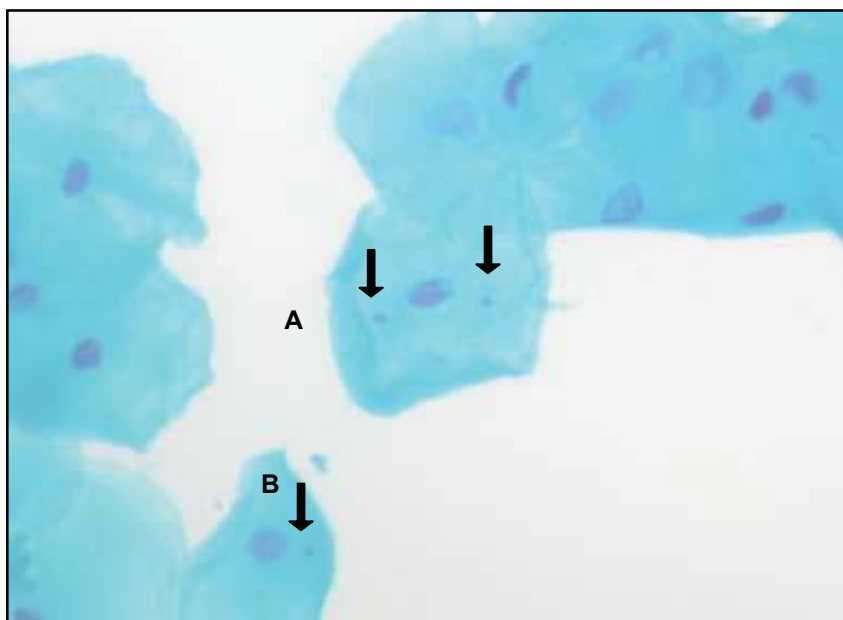


Figura 14 - Célula micronucleada com 02 MN em A, célula com 01 MN em B. Grupo Listerine.(400x).

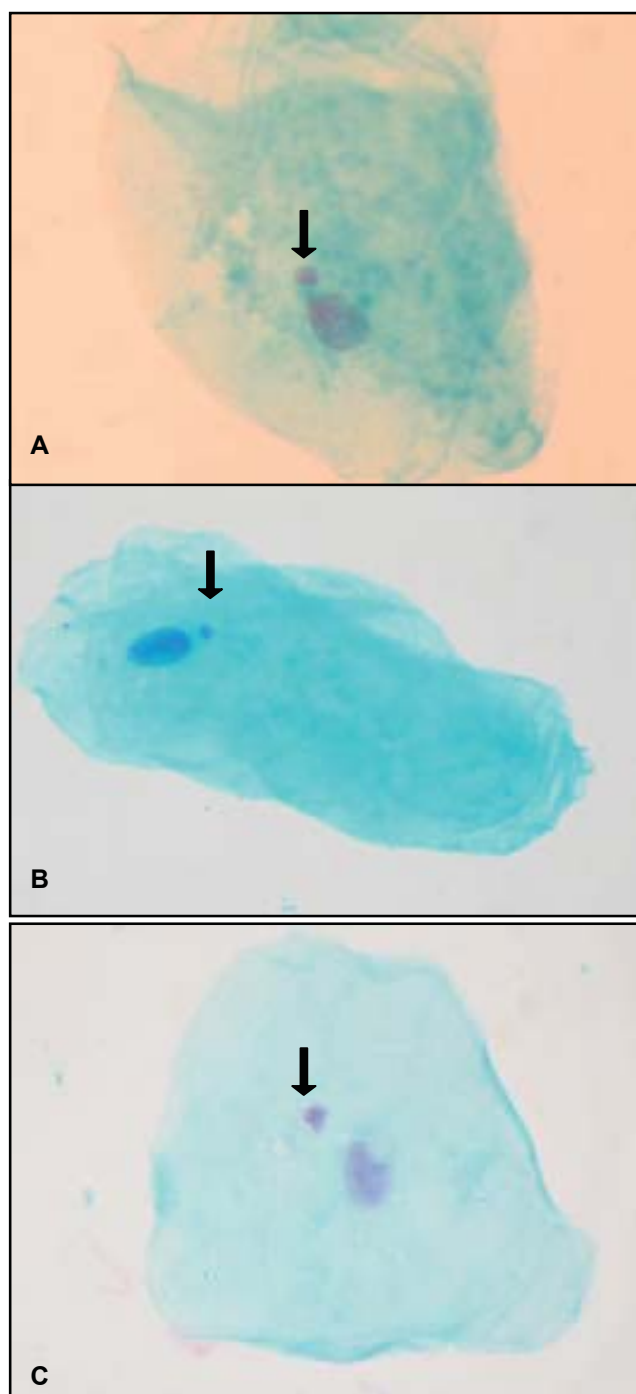


Figura 15 - Células micronucleadas: A) Grupo Controle; B) Grupo Plax; C) Grupo Listerine (1000x).

6 DISCUSSÃO

Ao longo da vida um indivíduo é exposto a diversos fatores ambientais, substâncias químicas, agentes físicos e biológicos que associados a fatores genéticos herdados ou não, podem agir sobre células normais e aumentar a frequência de aparecimento de mutações celulares, podendo ser correlacionadas ao desenvolvimento de neoplasias. (Boraks, 1999).

Em âmbito mundial, tem se encontrada forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e a produção de efeitos nocivos à saúde humana, de maneira peculiar à incidência de câncer em populações ocupacionalmente expostas (Márquez - Fernández et al., 2005).

Múltiplos agentes genotóxicos atuam nas células, sendo relacionados a vários estágios da carcinogênese; na cavidade oral, o tabaco tem sido descrito como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas (Roberts, 1997). A ingestão de álcool, por sua vez, é citado como forte agente potencializador no desencadeamento de lesões cancerosas (Stich, Röslein, 1983).

A relação entre o consumo de álcool e o câncer oral demonstra-se claramente complexo, pois, é uma doença em que múltiplas etiologias interagem, resultando em dificuldades para determinar o papel preciso de cada agente de forma independente. Apesar disso, é indiscutível a ação do álcool na etiologia do câncer oral (Petti, 2009), mesmo diante da dificuldade de isolá-lo como um único fator na patogênese das neoplasias malignas da cavidade oral. (Reidy et al., 2011).

O álcool atua na solubilidade dos agentes ativos de diversos enxaguatórios disponíveis comercialmente, e apresentam concentração com variações entre 6% a 26,9% (Gagari, 1995). Diante da ação do álcool na mucosa oral e, por conseguinte, sua ação na etiologia do câncer, diversos autores têm questionado a possível relação entre o uso de enxaguatórios bucais contendo álcool e sua influência no desencadeamento de lesões orais.

O possível efeito nocivo de enxaguatórios contendo álcool tem sido sugerido devido ao fato de que muitos desses bochechos contêm altas concentrações alcoólicas e os bochechos são mantidos na cavidade oral em contato direto com a mucosa oral por períodos mais longos do que o álcool de bebidas alcoólicas (Carretero-Pelaez et al., 2004).

Lima et al., 2010, em um estudo comparativo de pacientes dependentes químicos e abstêmicos, relataram influência na frequência de MN em indivíduos usuários de bebidas alcoólicas, assim como Ramirez e Saldanha, 2002, em um estudo prospectivo de indivíduos alcoólatras com carcinoma de boca e orofaringe em comparação com indivíduos saudáveis que não consumiram nenhum tipo de bebida alcoólica, encontrando uma associação significativa entre a frequência de micronúcleos e a duração do consumo de álcool.

As células orais são a primeira barreira para a inalação ou ingestão e são capazes de metabolizar carcinógenos bem como produtos reativos (Autrup et al., 1985, Liu et al., 1993, Vondracek et al., 2001, Spivack et al., 2004). Cerca de 90% das lesões de câncer em humanos são originários de células epiteliais (Rosin, 1992). Dessa maneira pode-se afirmar que as células epiteliais orais representam um alvo preferencial para os primeiros eventos genotóxicos induzidos por agentes cancerígenos que entram no organismo por inalação e ingestão (Holland et al., 2008).

As interações do DNA com substâncias químicas são reconhecidamente os primeiros passos na iniciação do câncer, desta maneira maior ênfase deve ser dispensada aos métodos que detectam atividade genotóxica em humanos (Reis, 2008).

Os micronúcleos se originam de regiões cromossômicas atrasadas ou que migraram irregularmente na anáfase. Eles podem derivar de cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos produzidos por quebra cromossômica ou por atraso de cromátides ou cromossomos inteiros, causado por distúrbios do fuso mitótico (Sarto, 1987).

De acordo com Hsu 1987, células expostas a agentes genotóxicos e que apresentem alterações de DNA, além de aumento na frequência de micronúcleos e resistência ao processo apoptótico podem dar origem a neoplasias malignas.

A formação de micronúcleos é um indicativo de genotoxicidade de um determinado agente capaz de causar mutações na fita de DNA, principalmente grandes deleções. Conseqüentemente, ocorre um aumento da instabilidade genética que é a causa subjacente ao desenvolvimento de neoplasias (Chaves, 1999). Adicionalmente, os eventos de caráter citotóxico e genotóxico podem resultar em material genético extranuclear, com a formação de estrutura semelhante ao micronúcleo clássico, além de serem eventos correlacionados com os processos de iniciação e/ou promoção tumoral (Tolbert et al., 1991).

Dentre as inúmeras técnicas, o teste de micronúcleos destaca-se por apresentar vantagens em relação aos demais. Sua simplicidade o torna atrativo, uma vez que grande número de células pode ser analisado. (Flores, Yamaguchi, 2008) além de praticidade e baixo custo (Carvalho et al., 2002).

Neste estudo foram avaliados três grupos: dois grupos experimentais e um grupo controle. O grupo experimental Plax foi constituído

por indivíduos que utilizaram enxaguatórios bucais que não continham em sua formulação álcool, o grupo experimental Listerine foi constituído por indivíduos que utilizavam enxaguatórios bucais contendo álcool em sua formulação, por fim o grupo controle utilizou-se de enxágüe bucal com água destilada.

Com a finalidade de garantir resultados fidedignos o presente estudo foi pautado de acordo com o projeto HUMN (Human Micronucleus), que tem como finalidade resolver as principais questões técnicas, tais como o método de coloração de células bucais, critérios ideais para a classificação de células, contabilização de micronúcleos e outras anormalidades, além da harmonização e padronização do teste de micronúcleo, permitindo uma comparação mais confiável de dados entre as populações humanas e de laboratórios permitindo uma avaliação de desempenho do teste, e consolidação de sua utilização a nível mundial para o biomonitoramento de danos ao DNA (Holland et al., 2008).

Os sítios bucais escolhidos para análise da freqüência de micronúcleos foram a borda lingual lateral esquerda e mucosa jugal esquerda, próxima a linha Alba. A borda lingual é considerada o local de maior incidência de carcinomas orais, por isso este sítio foi escolhido, segundo Ramirez e Saldanha, 2002; sendo acompanhados na aplicação do teste de micronúcleos nessa região por Reis et al., 2004, Flores, 2009, Lima et al., 2010, Frões, Costa, 2010. O sítio seguinte foi à mucosa jugal do lado esquerdo próximo à linha Alba, sendo que este sítio possui contato direto com o enxaguatório bucal, assim como indicou Carretero Pelaez et al., 2004. Suhas et al., 2004, aplicaram o teste de micronúcleos em língua e mucosa jugal a fim de investigar alterações em indivíduos usuários de tabaco “*beedi*” na Índia, acompanhados por Reis et al., 2006, para avaliação de MN em etilistas e Jadhav et al. (2011) que o aplicaram com a finalidade de investigar MN em portadores de carcinoma oral de células escamosas.

Para a coleta de células elegemos a utilização de esfoliação gentil da mucosa jugal com “cytobrush”, que já se mostrou mais adequada para a coleta intra-oral, proporcionando maior conforto aos indivíduos, além de permitir que o cabo longo tenha fácil acesso às áreas mais difíceis, como utilizado por Gattás, 2001; Lima et al., 2010, Sanchez-Siles, 2011. Não optamos pela utilização da coleta de células com espátula de madeira, pois segundo Almeida e Cabral (1992), a utilização desta pode favorecer alterações celulares por desidratação.

Após a aplicação das células em lâminas previamente limpas e identificadas, o material coletado foi fixado por solução fixadora spray, inicialmente utilizada para esfregaços vaginais como indicado por Martins, 2009 devido à facilidade de manuseio, não encontramos na literatura dados para comparação em relação às células da mucosa bucal.

Diversos métodos de coloração são citados na literatura, porém preferência deve ser dada a colorações DNA-específicos para coloração de núcleos, micronúcleos e outras anomalias nucleares presentes em células bucais esfoliadas. A coloração Feulgen-Fast Green (FFG) é utilizada por muitos pesquisadores (Gattas 1992; Reis 2002; Carvalho et al. 2002, Martins 2006; Lima et al.; 2010; Joshi 2011) devido à sua especificidade de DNA fornecendo uma aparência clara e transparente do citoplasma que permite a fácil identificação de micronúcleos (Holland et al., 2008).

Alguns estudos utilizam colorações fluorescentes, tais como DAPI (Pastor, 2003), laranja de acridina (Dey, 2010), Hoechst (Imle, 2009), e May-Grunwald Giemsa (Giemsa), Nersesyan et al., 2006 correlacionaram as frequências de micronúcleos em amostras coradas por Giemsa comparando-as com cariorrexe, cariólise, cromatina condensada, e células binucleadas, sendo que tais correlações não foram encontradas com colorações DNA

específica. Estes resultados indicam que as anomalias nucleares (e, eventualmente, grânulos de queratina) podem ser interpretados como micronúcleos em colorações DNA inespecíficas e resultando em falso-positivos.

Foram analisadas no mínimo 3000 células, seguindo os padrões indicados por Tolbert et al., 1992. Os primeiros estudos da década de 1980 (Stich, 1983,1982) avaliaram um número relativamente pequeno de células (500). Mais tarde, Tolbert et al., 1992 recomendaram o número mínimo de 1000 células, com um aumento para 2000 a 3000, se menos de cinco micronúcleos forem observados após a contagem de 1.000 células. A maioria dos estudos publicados tem analisado em torno de 1000 a 3000 células, embora tenha sido sugerido a contagem de 10.000 células pode ser necessário observar para se um aumento estatisticamente significativo de 50% na frequência de micronúcleos (Belien, 1995).

Muitos fenômenos degenerativos foram encontrados durante a análise das lâminas, podemos citar os broken eggs, nuclear buds e cariólise, que podem ser facilmente confundidos com MN, e foram excluídos da contagem.

Neste estudo realizado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os usuários contínuos de enxaguatórios bucais Plax e Listerine em comparação com o grupo Controle, para o número total de micronúcleos e células micronucleadas, bem como para a frequência de surgimento de tais estruturas em comparação ao tempo de utilização de enxaguatórios bucais, tanto nos sítios mucosa jugal como no sítio língua.

A correlação dos dados qualitativos (etnia, medicamentos, tratamento médico, suplementos vitamínicos e uso de bebidas alcoólicas) não foram considerados estatisticamente significativos, em decorrência da mínima variação da amostra.

Carlin et al. 2011, avaliaram comparativamente os danos de DNA e morte celular em células expostas a vários bochechos disponíveis comercialmente: Listerine ® Cepacol ®, Colgate Plax sem álcool ®, Periogard ®, e Colgate Whitening ®, utilizando o teste de MN para avaliar mutagenicidade e citotoxicidade in vivo. O sítio analisado foi a mucosa jugal direita, cerca de 2000 células foram analisadas a frequência em % de MN encontrados para o enxaguatório Listerine foi de 0.07% para antes da exposição e 0.04% após exposição, para o enxaguatório Colgate Plax sem álcool 0.04% para antes da exposição e 0.16%, após a exposição resultando em variações estatisticamente não significativas. Não induzindo qualquer sinal de mutagenicidade. Quando avaliado enxaguatório bucal a base de gluconato de clorexidina, Dantas et al. (2010), em uma análise da presença de MN em indivíduos expostos comparados a indivíduos não expostos, apresentaram um aumento estatisticamente significativo, indicando que algum componente do colutório analisado possui efeito mutagênico.

Em nosso estudo a frequência média de micronúcleos para a mucosa jugal foi para o grupo Listerine de $1,31 \pm 1,25$ e de $1,02 \pm 0,96$, para o grupo Plax, e de $0,95 \pm 0,76$ para o grupo Controle, variação estatisticamente não significativa como citado por Carli et al., 2011 e oposta aos achados de Freitas et al (2005), aonde há afirmações que pequenas concentrações de álcool nos enxaguatórios possibilitam o aumento da frequência de micronúcleos, entretanto, os autores ressaltaram que dado o pequeno número de indivíduos que referiram uso de antissépticos, os resultados obtidos deveriam ser vistos com reserva e indicariam necessidade de estudos para o estabelecimento da associação sugerida. Nesse estudo não foi citado o enxaguatório utilizado e a quantidade de uso diário. Sousa et al, em estudo realizado com enxaguatório contendo solução hidroetanólico e óleos essenciais de alecrim do campo, relatou a ausência de atividade mutagênica in vitro, através do teste de micronúcleo. Pithon et al. (2010) num

estudo in vitro, utilizaram o enxaguatório Colgate Plax com e sem álcool para aferição de toxicidade, afirmaram que a citotoxicidade foi diretamente proporcional ao tempo de exposição às culturas de células, concluindo que haja visto que os enxaguatórios sem álcool apresentaram menor citotoxicidade que os com álcool, mas ainda apresentaram citotoxicidade quando comparado aos grupos controle de célula e negativo.

Os enxaguatórios bucais provavelmente não induzem alterações genotóxicas e por sua vez a formação de micronúcleos, o que não exclui a possibilidade de citotoxicidade, sendo necessário que grupos maiores sejam avaliados para confirmação de tal hipótese.

Já é estabelecida que a ação do álcool produz aumento na quantidade de micronúcleos, essa alteração é atribuída principalmente a quantidade alcoólica, Reis et al., 2002; consideraram que seja necessário níveis alcoólicos acima de 45ml de etanol/dia para ação carcinogênica do álcool, dessa maneira a quantidade alcoólica presente nos enxaguatórios é notoriamente inferior a este valor, se considerarmos os critérios AUDIT para mensurar a quantidade alcoólica, utilizando o fator de conversão de etanol (0,79 de etanol puro), que permite converter qualquer volume de álcool em gramas para mililitro de etanol, onde por exemplo:

- 1 lata de cerveja (330 ml) de 5% x (valor alcoólico) 0,79 (fator de conversão) = 13 gramas de etanol ou 1 copo de vinho (140 ml) em x 12% x 0,79 = 13,3 gramas de etanol (AUDIT, 2001)

Com base nessa premissa a quantidade alcoólica dos enxaguatórios seria próxima a 6,8 gramas de álcool/dia:

- 2 bochechos/dia= 40ml x 21,6% x 0,79= 6,8 gramas, abaixo do valor em que se promove a ação carcinogênica,

Justificativa esta para a baixa variação na frequência de MN do grupo Listerine (enxaguatório contendo álcool) para com os grupos Plax (cloreto de cetilperidínio) e Controle, porém Freita et al. (2005), afirmaram que contato do álcool com mucosa oral através de bochechos podem ser suficientes para a expressão dos efeitos genotóxicos desta substância, diferentemente do contato estabelecido na ingestão de bebidas alcoólicas que se dá, habitualmente de modo fugaz, obviamente que utilizando essa quantificação do teor alcoólico, não foi considerado o contato do álcool com a mucosa oral como citado por Freita et al. (2005).

Apesar do tempo de exposição dos tecidos orais ao álcool do enxaguatório, a quantidade alcoólica diária é menor do que aquela citada na literatura como promotora de alterações citogenéticas.

O grupo Listerine apresentou-se numericamente mais expressivo na mucosa jugal, e o grupo Plax mais expressivo na borda lingual, apesar desta variação na frequência numérica de células micronucleadas estatisticamente foi considerada não significativa.

O resultado estatisticamente não significativo para a frequência de células micronucleadas para todos os sítios estudados, de acordo com o encontrado por Reis et al. (2002), onde avaliaram a frequência de células micronucleadas em mucosa em indivíduos expostos a etanol, resultando em dados pouco significativos.

Analisando a frequência média de células com 1 micronúcleo na mucosa jugal, constatamos que o grupo Listerine ($1,22 \pm 1,20$) demonstrou maior ocorrência quando comparado com os grupos Plax ($1,02 \pm 0,97$) e Controle ($0,95 \pm 0,76$). Quando avaliadas células que apresentavam mais de 1 MN os valores foram: Controle ($0,15 \pm 0,36$), Plax ($0,11 \pm 0,32$) e Listerine ($0,06 \pm 0,25$), demonstrando mínimas diferenças numéricas, porém estatisticamente significantes.

Na língua, a frequência média de células com 1 micronúcleo, foi estatisticamente significativa para o grupo Plax ($1,02 \pm 1,19$) comparado ao Listerine ($0,91 \pm 1,10$) e Controle ($0,86 \pm 0,66$). Para células que apresentavam mais de 1 micronúcleo: Controle ($0,04 \pm 0,20$), Plax ($0,11 \pm 0,31$) e Listerine ($0,08 \pm 0,28$), evidenciando mínimas diferenças numéricas, corroborando com nossos resultados Sarto et al. (1987), em uma avaliação da presença de micronúcleos na mucosa oral de fumantes e não fumantes, constataram que as frequências de micronúcleos resultantes da quebra cromossômica (células com 1 micronúcleo), apresentaram cerca do dobro em fumantes, em comparação com os não-fumantes, e as frequências de células com distúrbios do fuso (células com mais de 1 micronúcleo) foram quase os mesmos nos dois grupos.

As células com um único MN, são advindas de rupturas cromossômicas, resultante da ação clastogênica direta e intensa, já as células com mais de 1 MN, tem o seu aparecimento devido a distúrbios do fuso, e a ação do agente genotóxico ocorre de maneira indireta e de mais suave.

Ramirez e Saldanha (2002), em seu estudo, afirmaram que o sinergismo entre os agentes genotóxicos (álcool e tabaco) atingem o núcleo das células da camada basal; estas células perdem imediatamente o controle apoptótico e desencadeiam um possível processo de carcinogênese, levando à formação de MN, sendo a ocorrência de mais de um micronúcleo por célula, indicativo que os agentes mutagênicos tornaram-se persistentes ou constantes. Lima et al., (2010), em seu estudo, observaram que o número de células com apenas 1 MN foi mais significativo no grupo exposto a carcinógenos, indicando que a ação do agente mutagênico foi interrompido ou atenuado.

Muitos autores relacionam além do tempo de exposição da mucosa aos enxaguatórios, a frequência de utilização, Guha et al. (2007),

diante das informações relacionadas ao auto-relato de sua amostra, afirmaram que o uso de enxaguatórios 2x ao dia indicou aumento na chance de desenvolvimento de carcinomas em quase seis vezes quando comparados aos pacientes que relataram nunca terem utilizados enxaguatórios bucais, porém sua metodologia é altamente questionável pois a metodologia aplicada não forneceu dados essenciais (enxaguatório utilizado, tempo de utilização e uso de bebidas alcoólicas), Werner e Seymour (2009), afirmaram que na melhor das hipóteses, o estudo conduzido por Guha et al., explora a associação entre álcool e câncer como facilitador ao invés de um fator causal ou de risco, alegaram também que a metodologia carecia de profundidade na análise de questões chave, o que coloca em questão a validade de suas conclusões. Stich e Rosin (1983) não observaram diferenças estatisticamente significantes na frequência de micronúcleos de indivíduos que consumiam freqüentemente bebidas alcoólicas, esses resultados foram contrários aos achados por Reis et al. (2002), onde a presença de micronúcleos revelou-se significativamente elevada na presença isolada do álcool em indivíduos que faziam uso freqüente de bebidas alcoólicas.

Sitch e Rosin (1983), afirmaram que a presença de MN em células esfoliadas da mucosa bucal reflete os eventos genotóxicos que ocorreram em células que estavam na camada basal do epitélio entre 1-3 semanas antes da obtenção dos esfregaços, partindo dessa premissa, em nosso estudo pudemos constatar variações na frequência de micronúcleos durante o tempo de utilização dos enxaguatórios, a maior frequência numérica de micronúcleos na mucosa jugal foi no grupo Listerine após a primeira semana (cerca de 07 dias de exposição), após o uso de enxaguatórios ($1,5 \pm 1,76$), quando comparado ao grupo Plax ($0,87 \pm 0,91$) e Controle ($1,06 \pm 0,96$).

No mesmo período, na borda lingual o Grupo Listerine ($1,4 \pm 1,72$) e o grupo Plax ($1,60 \pm 2,03$), apresentaram maior frequência numérica em relação ao Controle ($0,87 \pm 0,83$). Nossos resultados apesar de estatisticamente não significativos apresentou maior frequência numérica de micronúcleos em desacordo com os achados de Wiltgen (2007), este analisou dados obtidos pelo uso terapêutico dos enxaguatórios Cepacol (cloreto de cetilperidínio, 16,8% de concentração alcoólica), Periogard (digluconato de clorexidina a 0,12%, 11,6% de concentração alcoólica) e Plax (Triclosan, 6% de concentração alcoólica), afirmando que os três colutórios não foram indutores de mutações cromossômicas ou relacionados a perda de fragmentos em células esfoliadas da mucosa bucal, pois a frequência de micronúcleos observado após o tratamento foi no máximo, semelhante a taxa basal encontrada em diversas populações, ressalta porém que apesar da ausência de significância, os pacientes tratados com enxaguatório a base de cloreto de cetilperidínio apresentaram maior frequência de micronúcleos (0,06).

Utilizando então, os relatos de Stich e Rosin (1983), podemos justificar que a frequência numérica relatada não foi devida a exposição aos enxaguatórios, pois seria plausível que com a continuidade do uso o número de micronúcleos, no mínimo, se mantivesse constante e não houvesse um decréscimo como foi o ocorrido.

As correlações entre frequência de MN e idade também foram avaliadas, no Grupo Plax e Listerine houve uma correlação positiva ínfima entre a idade e micronúcleos na mucosa jugal, e no grupo Controle essa correlação foi encontrada na língua, porém todas as correlações foram estatisticamente não significativas, demonstrando que as variáveis são linearmente independentes ou não relacionadas. A correlação das idades e a frequência de micronúcleos ainda parecem ser confusas, porém os achados de Freita et al. (2005) corroboram com nossos resultados, apresentando

resultados não significativos entre os grupos de estudos em relação à idade e aumentos na frequência de micronúcleos em indivíduos alcoólatras e/ou fumantes, da mesma maneira Haveric et al. (2010), avaliaram a genotoxicidade de consumo de cigarro em fumantes jovens e correlacionou com a análise citogenética em linfócitos do sangue periférico e células bucais esfoliadas, não encontrando correlações significativas para a idade, duração e intensidade do hábito de fumar, e frequência de micronúcleos em linfócitos. Ladeira et al. (2011), através de seu estudo comparando a frequência de MN em linfócitos periféricos e em células bucais em indivíduos ocupacionalmente expostos e não expostos ao formaldeído e outros agentes como o tabaco e o álcool, afirmaram que apenas a frequência de micronúcleos em linfócitos foi estatisticamente maior em idosos do grupo exposto, apresentando evidência também da interação entre idade e sexo, em desacordo com os autores citados anteriormente, Bonassi et al. (2001), sugeriram que a grande maioria de dados relacionando MN e agentes genotóxicos demonstram um aumento uniforme de MN com a idade, especialmente acentuada após os 40 anos; podendo ser justificado pelo processo fisiológico de envelhecimento celular .

Bonassi et al. (2001) afirmaram também um aumento da frequência de MN em mulheres, sendo incompatível com nossos resultados, que apesar de estatisticamente não significantes apresentaram um discreto aumento numérico de micronúcleos em indivíduos do sexo masculino, maior aumento foi constatado na mucosa jugal e língua do grupo Listerine ($1,58 \pm 0,58$) e ($1,50 \pm 0,92$), respectivamente. Erdermir et al. (2007), afirmaram também não ter encontrado diferenças significativas entre os gêneros, assim como Lima et al. (2010), onde afirmaram não ter encontrado diferenças entre os sexos, não sendo observado efeito protetor hormonal para o sexo feminino.

Alguns fatores considerados como intervenientes (etnia, medicamentos, tratamento médico, suplementos vitamínicos, uso de bebidas

alcoólicas e atividade ocupacional), na contagem de micronúcleos, não foram passíveis de avaliação, pela mínima variação da amostra.

As mínimas variações da frequência de MN encontradas nesse estudo, não devem ser consideradas indicativo de ausência de probabilidade de alterações citogenéticas advindas do uso de enxaguatórios, principalmente aqueles que contêm álcool em sua formulação, para que tal hipótese seja confirmada mais estudos devem ser realizados. Concomitantemente a esses estudos outros possíveis fatores de influência na frequência de MN, devem ser observados como os outros componentes da fórmula, para isso novos estudos devem ser desenvolvidos considerando o possível potencial genotóxico dessas substâncias.

7 CONCLUSÃO

Após a análise dos dados, os resultados obtidos sugerem que:

- a) Ligeiras elevações numéricas de MN foram encontradas nos dois sítios avaliados quando comparados os enxaguatórios Plax e Listerine ao Controle, porém não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre eles;
- b) Considerando-se a frequência de MN dos grupos experimentais, em comparação com a progressão do uso semanal dos enxaguatórios, o aparecimento de MN manteve-se em decréscimo ou inalterado estatisticamente, sugerindo que os enxaguatórios não são indutores de alterações genotóxicas;
- c) Não foi verificada correlação positiva entre a frequência de MN e variáveis como idade e sexo, diante o uso de enxaguatórios bucais.

8 REFERÊNCIAS*

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Planilha com dados de consumo de produtos de higiene bucal no Brasil entre 2000 e 2004. São Paulo, 2009. Disponível em: www.abihpec.org.br. Citado em 05 de fevereiro de 2011.

Albuquerque JAP, Santos AA, Gonçalves SRJ, Bonfim AMA, Calado AA, Santos JA. A importância do Cirurgião-Dentista na prevenção, diagnóstico e tratamento da halitose. *Odontologia Clínica Científica*. 2004;3(3):169-72.

Akande OO. A laboratory evaluation of the efficacy of a herbal dentrifice on dental caries in the rat. *African J of Biomed Res*. 2004;7(1):89-92.

Almeida JD, Cabral LAG. Diagnóstico do carcinoma bucal: uso da citologia esfoliativa como método auxiliar. *Rev Gaúcha Odontol*. 1992;40(3):167-70.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – [Acessado em 01/04/2011] http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1185_04.pdf

Asadoorian J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. *Canadian Journal of dental hygiene*. 2006;40(4):1-13.

Au WW. Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. *Environ Mutagen Carcinog Teratogen*. 1991;23(1):236-45.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda US National Library; c2003 [disponibilidade em 2010 fev; citado em 02 fevereiro.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Autrup H, Seremet T, Arenholt D, Dragsted J, Jepsen A. Metabolism of benzo[a]pyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells. *Carcinogenesis*. 1985;6(12):1761–65.

Belien JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. 1995;16(4):2395-400.

Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger Ch, Berghaus A, Grummt TI. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the mn-assay. *Oral Oncol*. 2000;36(6):550-5.

Blot WJ, Winn DM, Fraumeni JF Jr. Oral cancer and mouthwash. *J Nat Cancer Inst*. 1983;70(2):251-253.

Boffetta P; Hashibe M. Alcohol and cancer *Lancet Oncol*. 2006;7(2):149–56

Bonassi S, Fenecha M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP, et al. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutag*. 2001;37(1):31–45.

Boraks, S. Diagnóstico Bucal. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

Boyle P, Autier P, Bartelink H. European code against cancer and scientific justification: third version (2003). *Ann Oncol*. 2003;14(7):973–1005.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio, MT. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(1):40-5.

Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. Clin Oral Investig. 2011 May 6.[Epub ahead of print]

Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. Sci Aging Knowl Environ. 2006;6(10):197–200.

Carrard VC, Souza-Filho M, Rados PV, Chaves AC, Lauxen SI. 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.

Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Sant'Ana Filho M. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os mecanismos relacionados Rev Bras Cancerol. 2008;54(1):49-56

Carretero Pelaez MA, Esparza Gomez GC, Figuero RE, Cerero LR. Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature. Med Oral. 2004;9(2):120-3.

Carvalho MB, Ramirez A, Gattás GJF, Guedez AL, Amar A, Rapoport A, et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. Rev Assoc Med Bras. 2002;48(4):317-22.

Chaves SR. Avaliação da frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos ao pó de mármore e granito. Estudos Vida e Saúde. 1999; 23[s.n.]:19-32.

Ceppi M, Gallo F, Bonassi S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. Review. Mutagenesis. 2011;26(1):247-52.

Chiapinotto GA, Meller D, Santos FB. Meios mecânicos de limpeza dos dentes: avaliação de indivíduos de uma clínica privada. Rev Gaúcha Odontol. 1998;46(3):142-4.

Ciancio SG, Lauciello F, Shibly O, Vitello M, Mather M. The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. J Periodontol. 1995;66(11):962-5.

Coutryman OI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. Mutat Res. 1976;41(2-3):321-32.

Da Cruz AD. Human Micronucleus counts are correlated with age smoking and cesium – 137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. Mut Res Envir. 1994;313(1):57-68.

Dellarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. Mutat Res. 1988;195(1):1-20.

Dey P, Samanta S, Susheilia S. Micronucleus assay in buccal smears of breast carcinoma patients. Diag Cytopat. 2010 Dec 31. [Epub ahead of print]

Divaris K, Olshan AF, Smith J, Bell ME, Weissler MC, Funkhouser WK, Bradshaw PT. Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina head and neck cancer study. Cancer Causes Control. 2010;21(4):567-75

Dong YJ, Peng TK, Yin SJ. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase in human mouth. Alcohol. 1996;13(3):257-62.

Erdermir OE, Sengün A, Ülker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. Eur J Dent. 2007;1(2):80-85

Ferreira AF, Machado NAG, Strini, PJSA; Fernandes Neto AJ, Magalhães, D. Agentes antissépticos e enxaguatórios na odontologia. Anais do Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Uberlândia. 2008. <http://www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/SA08-21014.PDF>

Figuerro-Ruiz E, Carretero-Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza-Gómez GC, Moreno-López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral*. 2004;9(1):14-23

Fine, D. Listerine: past, present and future-a test of thyme. *Journal of dentistry*. 2010;38(1): 2-5.

Fróes PIR, Costa MC. Análise de micronúcleos nas células da mucosa bucal após a exposição abusiva e crônica de indivíduos ao álcool. *Acta Monoghafica*. 2010;4(1):1-50.

Flores M, Yamaguchi ME. Teste de micronúcleos: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa*. 2008;1(3):337-40.

Freita VS, Lopes MA, Meireles JRC, Reis L, Cerqueira EMM. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública* 2005;29(2):189-99.

Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. [Review]. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1995;80(4):432-9.

Gattás GJF. Alterações Citogenéticas em indivíduos expostos a agentes mutagênicos do tabaco e do álcool. In: Carvalho MB. *Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.1491-8.

Gebran MP, Gebert AP. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti: Ciência e Cultura*. 2002;3(26):45-58.

Granjeiro, JM. O cloreto de cetilpiridínio e a placa bacteriana: uma revisão.R. Assoc Paul Cir Dent. 1993;46(5):857-60.

Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. Am J Epidemiol. 2007;166(10):1159-73.

Gurdal P, Ggniz Akdeniz B, Hakan Sen B. The effects of mouthrinses on microhardness and color stability of aesthetic restorative materials. J Oral Rehabil. 2002;29(9):895-901.

Hardie, DC, Gregory TR, Hebert, PDN. From pixels to programs a beginners guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J Histoc and Cytoc. 2002;50(6):735-49.

Haveric A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. Toxicol Mec Met. 2010;20(5):260-6.

Herrera D. Cetylpyridinium chloride-containing mouthrinses and plaque control. Evid Based Dent. 2009;10(2):44.

Holland N, Bolognesi C; Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmu, M et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res. 2008;659(1-2):93–108.

Homann N, Karkkainen P, Koivisto T, Nosova T, Jokelainen K, Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. J Nat Cancer Inst. 1997;89(22):1692-97.

Hsu TC. Genetic predisposition to câncer with special reference to mutagen sensitivity. Dev Biol. 1987;23(9):591-603.

Imle A, Polzer B, Alexander S, Klein CA, Friedl P. Genomic instability of micronucleated cells revealed by single-cell comparative genomic hybridization. *Cytol A*. 2009;75(7):562-8.

International Agency for Research on Cancer. Acetaldehyde IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two). Lyon:IARC;1999;71(2):319–35.

Jadhav K, Gupta N, Ahmed Mujib BR. Micronuclei: An essential biomarker in oral exfoliated cells for grading of oral squamous cell carcinoma. *J Cytol* 2011;28:7-12

Joshi MS, Verma Y, Gautam AK, Parmar G, Lakkad BC, Kumar S. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Arch Oral Biol*. 2011;56(1):63-7.

Kabat GC, Herbert JR, Wynder EL. Risk factors for oral cancer in women. *Cancer Res*. 1989;49:2803-06.

Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnius EM, Keck-Wilhelm A, Kratz E, Mildau G. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: A risk factor for oral cancer. *Int J Cancer*. 2009;125(3):730–35.

Ladeira C, Viegas S, Carolino E, Prista J, Gomes MC, Brito M. Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde-the case of histopathology laboratories. *Mutat Res*. 2011;721(1):15-20.

Lima CF, Oliveira LU, Cabral LAG, Brandão AAH, Salgado, MAC, Almeida, JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med*. 2010 39(6): 441–46.

Lippman SM, Peters E J, Wargovich M J. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int J Cancer*. 1990;45(2):811-5.

Liu Y, Sundqvist K, Belinsky SA, Castonguay A, Tjalve H, Grafstrom RC. Metabolism and macromolecular interaction of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in cultured explants and epithelial cells of human buccal mucosa. *Carcinogenesis*. 1993;14(11):2383–88.

Lorca-Sarañer A, Carrasquer-Burguesa A. Efecto de los colutórios com contenido alcohólico: revisión de la literatura. *RCOE*. 2005;10(4):407-12.

Maher JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res World*. 1997;21(1):5-12.

Maier H, Weidauer H, Zoller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18(2):387-91

Maito FDM, Rados PV, Souza Filho M, Barbachan, JJ, Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of or topical exposure to alcohol. *Alcohol*. 2003;31(1-2):25-30.

Mandel ID. Chematerapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Period*. 1988;15(1):488-98.

Marinho BVS, Araújo ACS Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. *Inter J Dent*. 2007;6(4):124-31.

Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RAO, Góis-Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, Abrahão M, Wüsch-Filho V. Oral health, hygiene practices and oral câncer. *Rev Saúde Publica*. 2008;42(3):471-9.

Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Oral Oncol Eur J Cancer*. 1992;28(1):9-15.

Martins RA. Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: Comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environment International*. 2009;35(2):1062–65.

Martinez M, Martinez FE, Cunha MR, Segatelli TM, Pinheiro PF, Almeida CC. Morphological effects on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2000;34(1):77-83.

Martinez M, Martinez FE, Watanabe I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) after chronic alcohol consumption. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998;30(3):379-84.

Mascarenhas AK. Inconclusive evidence to suggest that alcohol-containing mouthwash increases the risk of oropharyngeal cancer. *J Evid Base Dent Pract*. 2004;4(3):249-50.

Mascres C, Joly JG. Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. *J Biol Buccale*. 1981;9(3):279-95.

Mashberg A, Barsa P, Grossman ML. A study of the relationship between mouthwash use and oral pharyngeal cancer. *J Am Dent Assoc*. 1985;110(5):731-4.

McCullough MJ; Farah ES - The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Australian Dental J*. 2008;53(4):302-5.

Mendes MMSG. Agentes químicos para o controle da placa bacteriana. *Periodontia*. 1999;5(2):253-6.

Miller CS, Jhonstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(6): 622-5.

Monfrin, R.C.P.; Ribeiro, M.C. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. *R. Assoc Paul Cir Dent.* 2000;54(1):401-7.

Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernández MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case control study in Madrid Spain. *Oral Oncol.* 2000;36(2):170-4.

Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(10):1835-40.

Ottem MPT, Busscher HJ, Van der Mei HC, Van Hoogmoed CG, Abbas F. Acute and substantive action of antimicrobial toothpastes and mouthrinses on oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2011;115(2):151-55.

Pastor S, Creus A, Parron T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003;18(3):249–258.

Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of Periodontology.* 1998;3(1):108-20.

Peláez MAC, Gómez GCE, Ruiz EF, Lapiedra RC. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. *Análisis crítico de la literatura. Med Oral.* 2004;9(x):116-23.

Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):340-50.

Pithon MM, Santos AM, Freitas LM, Souza RL, Martins FO, Romanos MTV. Avaliação in vitro da citotoxicidade de enxaguatórios com e sem álcool. Rev Cir Traumatol Buco Maxilo 2011;11(1):9-12.

Popp W, Schell C, Kraus R, Vahrenholz C, Wolf R, Radtke J, et al. DNA strand breakage and DNA adducts in lymphocytes of oral cancer patients. Carcinogenesis.1993;14(11):2251-6.

Ramirez A, Gattás GJF, Carvalho MB, Saldanha PH. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. Oral Oncol.1999;6(2):199-204

Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. Genet Mol Res. 2002;1(3):246-60.

Reidy J, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. The Surgeon. 2011;9(5):278-83.

Reis, SRA, Soares, LP; Rocha, D; Setúbal MG Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos Feulgen e Papanicolau. Rev. Odonto Ciênc. 2004;19(46):367-71.

Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. Journal of Clinical Periodont.1999;26(2):474-6.

Roberts DM. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. Acta Cytol. 1997;41(4):1008-14.

Rojas FJE, Santos-Alemany A. Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. RCOE. 2005;10(4):445-452.

Rösin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res.* 1992;267(2):265–76.

Saba-Chujfi E. A eficácia da formulação contendo o anti-séptico triclosan associado ao copolímero gantrez e ao flúor, utilizada através de bochecho para controle químico da placa bacteriana. *R Assoc Bras Odontol São Paulo.* 1998;6(3):164-70.

Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17(4):679–94.

Sanchez-Siles M, Ros-Llor I, Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P. A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Arch Oral Biol.* 2011; May 13 [Epub ahead of print]

Sarto F. The MN assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987; 2(1):11-7.

Schottenfeld D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer.* 1979;43(5):1962-6.

Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(3):306-11.

Sharma NC, Charles CH, Qaqish JG, Galustians HJ, Zhao Q, Kumar LD. Comparative effectiveness of an essential oil mouthrinse and dental floss in controlling interproximal gingivitis and plaque. *Am J Dent.* 2002;15(6):351-5.

Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;44(2):381-89.

Souza PC, Storti-Filho A, Souza RJS. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. *Arc of gynecology*. 2009;279(5):625-9.

Souza RR, Abreu MHNG. Análise crítica da indicação da clorexidina no controle da placa bacteriana e doença periodontal. *Arq. Odontol*. 2003;39(3):163-254.

Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy, J.F, Kaminsky, L.S. Gene-environment interaction signatures by quantitative mrna profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res*. 2004;64(2):6805–13.

Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer*. 1992;50(1):172-6

Stich HF, Rosin MP, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int J Cancer*. 1988;42(2):195-9.

Stich HF, Rosin MP, Vallejera MO. Reduction with vitamin A and betacarotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet*. 1984;1(1):1204-6.

Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer*. 1983;31(2):305-8.

Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer*. 1982;30(2):553–9.

Stich HF, San RH, Rosin MP. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells, *Ann. N.Y. Acad Sci.* 1983;407(3):93–105.

Stich W, Stich BB, Parida, A. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Lett.* 1982;17(2):125–34.

Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res.* 2004;561(1-2):15-21.

Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Braz Oral Res.* 2009;23(1):39-48.

Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis.* 2011;26(1):69-76.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69–77.

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res.* 2009;681(1):93-109.

Vecchia, CL. Mouthwash and oral cancer risk: an update. *Oral Oncol.* 2009;45(1):198-200.

Versteeg PA, Rosema NAM, Hoenderdos DE, Van der Weijden GA. The plaque inhibitory effect of a CPC mouthrinse in a 3-day plaque accumulation model-a cross over study. *International J Dent Hyg.* 2009;8(2):269–275.

Vondracek M, Xi Z, Larsson P, Baker V, Mace K, Pfeifer A, Tjalve H, Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Grafstrom RC. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa, Carcinogenesis. 2011;22(3):481–8.

Walsh LJ. The mouthwash question. Aust Dent J. 2008;54(1):77-8.

Weaver A, Fleming SM, Smith DB, Park A. Mouthwash and oral cancer: carcinogen or coincidence? J Oral Surg. 1979;37(2):250-3.

Wen-Jiun L, Rong-San J, Shang-Heng W, Fun-Jou C, Shih-An L. Smoking, alcohol, and betel quid and oral cancer: A prospective cohort study. J Oncol. 2011; Apr 5 [Epub ahead of print]

Werner OW, Seymour RA. Are alcohol containing mouthwashes safe? Brit Dent J. 2009;207(10):488-9

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer– a review. Oral Oncol. 1998;34(6):441-7.

Wiltgen, A. Investigação do potencial genotóxico de antissépticos bucais in situ [dissertação]. Local: Ulbra – Diagnóstico Genético Molecular; 2007

Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Mouthwash Use and Oral Conditions in the Risk of Oral and Pharyngeal Cancer. Cancer Res. 1991;51(4):3044-7.

Winn DM, Diehl SR, Brown LM, Harty LC, Bravo-Otero E, Fraumeni JF et al. Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. Cancer Causes Control. 2001;12(2):419-29.

Wynder EL, Kabat G, Rosenberg S, Levenstein M. Oral cancer and mouthwash use. J Natl Cancer Inst. 1983;70(2):255-60.

Woods KV, Shillito EJ, Spitz MR. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(3):101-8.

World Health Organization. Global status report on alcohol. Geneva: World Health Organization, 1999.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Lembrando que este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José dos Campos – Faculdade de Odontologia.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto:

Pesquisador Responsável:

Pesquisadores participantes:

Telefones para contato :

♦ Esta pesquisa terá como objetivo o seguimento de marcadores genéticos denominados micronúcleos. Temos como objetivo principal verificar a possível atuação de enxaguatórios bucais na mucosa bucal.

♦ Nenhum risco poderá ser agregado com a participação na pesquisa.

Os métodos para realização serão da seguinte maneira:

1. Resposta ao questionário (perguntas sobre a saúde e hábitos gerais e hábitos de uso de enxaguatórios bucais).

2. Abstenção de álcool, cigarro e enxaguatórios por 1 mês anterior ao início das pesquisas.

3. No mês subsequente: recebimento do material para enxágüe bucal diário para 3 semanas, formulário específico para anotação de possíveis modificações na mucosa bucal. (Queimação, ardência, entre outros)

4. Acompanhamento e coleta de material semanalmente (em dias pré estabelecidos), durante as 3 semanas.(4 coletas)

Lembramos que todos os dados serão mantidos em mais absoluto sigilo, e o participante desta pesquisa terá direito assegurado de retirar este consentimento a qualquer tempo.

♦ Nome e Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/
 n.º de matrícula _____, abaixo assinado,
 concordo em participar do estudo
 _____, como sujeito. Fui
 devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador
 _____ sobre a pesquisa, os procedimentos
 nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de
 minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a
 qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção
 de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data

—

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

**Presenciamos a solicitação de consentimento,
 esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar:**

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Observações complementares

APÊNDICE B- Ficha de Anamnese

Ficha de Anamnese:

Identificação do Paciente:

Nome:	
Idade:	
Data de Nascimento:	
Telefone:	
Documento:	
Endereço:	
Sexo:	() M () F

Questionário:

Responda às questões abaixo, marcando a resposta com um X:

1	No momento está em tratamento médico ? Qual?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
2	Está tomando alguma medicação no momento? Qual?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
3	Tem ou teve alguma doença como hepatite, sífilis,... Qual?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
4	Você é diabético?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
5	Faz uso de enxaguatórios bucais? Qual?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
6	Regularmente?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
5	Tem algum tipo de alergia? Qual?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
6	Faz uso rotineiramente de cigarro? Quantos cigarros/dia?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()

7	Faz uso de drogas?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
8	Faz uso rotineiramente de álcool? Quantidade:	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()

Outras informações que julgar importante

referir: _____

DECLARO que o respondido acima é verdadeiro.

São José dos Campos, ____ de _____ de 2011.

 Assinatura do paciente ou responsável

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

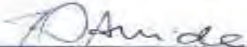
unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / jimeto@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **094/2009-PH/CEP**, sobre **"Análise da frequência de micronúcleos frente à utilização de colutórios bucais"**, sob a responsabilidade de **PAMELA APARECIDA DINIZ**, tendo como orientador o Prof. Adjunto Sigmar de Mello Rode, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 08 de dezembro de 2009



Profa. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora