



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ELLEN EDUARDA FERNANDES

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS
FRENTE À UTILIZAÇÃO DE COLUTÓRIO BUCAL
COM BASE ALCOÓLICA EM INDIVÍDUOS
FUMANTES E NÃO FUMANTES**

2014

ELLEN EDUARDA FERNANDES

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS
FRENTE À UTILIZAÇÃO DE COLUTÓRIO BUCAL
COM BASE ALCOÓLICA EM INDIVÍDUOS FUMANTES
E NÃO FUMANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientador: Prof. Dr. Sigmar de Mello Rode
Co-orientadora: Doutoranda Pamela Aparecida Diniz

São José dos Campos
2014

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 10 de Outubro de 2014.

Ellen Eduarda Fernandes

E-mail: ellen.fernandes@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular Dr. Sigmar de Mello Rode (Orientador)

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

Prof. Adj. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Profa. Assistente Dra. Marianne Spalding

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 04 de Novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Pai, que por seu infinito amor me permitiu chegar até aqui. Por me guiar e me fazer trilhar caminhos que jamais imaginei seguir; por me dar forças mesmo em meio às adversidades. Grata a ti, meu **Deus**, por tantas conquistas!

Aos meus pais, **Sidnéia e Edso**, que não medem esforços para me proporcionar o melhor sempre. Por acreditarem em mim e por me apoiarem em todos os momentos. Sou grata por vocês, que mesmo em meio às dificuldades, lutam diariamente pelo meu bem-estar. Minha eterna gratidão por tudo! Amo vocês!

Ao namorado, amigo e companheiro para todas as horas, meu profundo agradecimento por toda paciência e apoio. **André**, obrigada por estar sempre presente!

A amiga, dupla e hermana, **Bruna Fernandes do Carmo Carvalho**, pela amizade e companheirismo. Agradeço por todo apoio e pelos momentos de estudos juntas. Ao longo desses seis anos partilhamos de momentos difíceis e desanimadores, mas estes não superaram os momentos divertidos, envoltos de alegrias que pudemos dividir. Fui agraciada por tê-la como amiga; obrigada por tudo, Brunete!

A **Pamela Aparecida Diniz**, amiga e co-orientadora, por toda assistência e ensinamentos. Pelos momentos agradáveis em que estivemos juntas desenvolvendo nossas pesquisas. Obrigada Pam!

Ao meu orientador, **professor Sigmar de Mello Rode**, pelo auxílio e pela oportunidade de conhecer a vida científica. Sou grata por ter me proporcionado um maior crescimento acadêmico.

Aos tantos bons mestres com quem puder aprender durante esta trajetória, mas em especial, aos **professores Estevao Tomomitsu Kimpara** e **Marianne Spalding**, com quem tive o prazer de trabalhar. Agradeço por todos os ensinamentos, que não se restringiram apenas à odontologia. Obrigada pelo convívio agradável, vocês são pessoas muito queridas!

Aos **funcionários** dedicados, de setores diversos que ao desempenharem suas funções com carinho, auxiliaram em nosso desenvolvimento e tornaram esta caminhada mais agradável. Os pequenos gestos fizeram a diferença e tornaram nosso ambiente de convívio, um lugar aprazível. Muito obrigada!

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, meu segundo lar. Por ter me recebido antes mesmo de me tornar Unespiana e por ter me proporcionado experiências únicas. Sinto-me honrada por ter podido estudar em uma universidade de tamanha qualidade.

A cada **paciente** atendido, pela paciência e compreensão. Vocês foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional. Obrigada!

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

Análise da frequência de micronúcleos frente à utilização de colutório bucal com base alcoólica em indivíduos fumantes e não fumantes*

Analysis of the frequency of micronuclei front to using alcohol-based mouthwash mouth in smokers and non-smokers

RESUMO

Os micronúcleos (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. O estudo avaliou a frequência de micronúcleos em amostras citológicas após a utilização diária de colutório bucal com base alcoólica em indivíduos fumantes e não fumantes. Foram avaliados 30 indivíduos, com idades variando entre 17 a 42 anos e instituídos como critério de exclusão: ingestão de bebida alcoólica; 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. Para os indivíduos fumantes o critério de inclusão foi o consumo mínimo de 20 cigarros/dia, sendo o contrário obrigatório para os indivíduos não fumantes. A amostra foi dividida em 02 grupos experimentais: Grupo 1 Fumantes e Grupo 2 Não Fumantes, ambos os grupos realizaram bochecho com enxaguatório com álcool 21,6% e óleos essenciais (Listerine® Defesa dos Dentes e

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico Brazilian Dental Science (ISSN 2178-6011).

Gengivas), por 04 semanas foram realizadas a coleta citológica na mucosa jugal e porção mediana da borda de língua, sendo uma para controle inicial, semana 0, e três semanas subsequentes com uso contínuo do enxaguatório. 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. A frequência de micronúcleos na mucosa jugal foi de $1,6 \pm 1,75$ e de $1,46 \pm 2,06$ para o sítio língua para o Grupo 1 Fumantes, de mostrando uma ligeira elevação em comparação com o Grupo 2 Não Fumantes, que apresentou uma variação de $1,2 \pm 1,53$ para o sítio mucosa jugal e $0,86 \pm 1,41$ para o sítio língua. Entretanto, esta diferença foi estatisticamente não significativa. Os resultados sugerem que o enxaguatório bucal com base alcoólica testado não é indutor de alterações genotóxicas, não alterando dessa maneira a frequência de micronúcleos, porém estudos complementares são necessários para verificar a possibilidade de alterações citotóxicas.

PALAVRAS-CHAVE

Enxaguatórios bucais; Micronúcleo; Fumantes.

ABSTRACT

Micronuclei (MN) originate from chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during cell division can occur due to excessive exposure to harmful agents, defects in mitosis and / or DNA repair process. The study evaluated the frequency of

micronuclei in cytological samples after daily use of alcohol -based mouthwash mouth in smokers and non-smokers. We assessed 30 subjects, aged between 17-42 years and established as exclusion criteria: alcohol consumption; periodontal disease; systemic diseases that may interfere with the integrity of the oral mucosa; individuals with medical or pharmacological history that affect the performance of the study, family history of malignancies. For smokers the inclusion criterion was a minimum consumption of 20 cigarettes / day, and the contrast required for non-smokers. The sample was divided into 02 experimental groups: Group 1 Smokers and Group 2 Non-Smokers, both groups performed mouthwash (alcohol 21,6%) with Listerine® Defense of Teeth and Gums for 04 weeks cytological collection were performed on buccal mucosa and portion median border of the tongue, one for initial, week 0 control, and subsequent three weeks with continued use of mouthwash. The collected material was stained by specific staining Feulgen / Fast Green. The analysis of 3000 cells / individual was performed by light microscopy statistics used Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests for frequency MN. The frequency of micronuclei in buccal mucosa was 1.6 ± 1.75 and 1.46 ± 2.06 for the site language to Group 1 Smokers of showing a slight increase compared with Group 2 Non-smoking, which showed a variation of 1.2 ± 1.53 for the buccal mucosa site and 0.86 ± 1.41 for the site language. However, this difference was not statistically significant. The results suggest that alcohol-based mouthwash tested is not an inducer of genotoxic changes, thus not changing the frequency

of micronuclei, but further studies are needed to verify the possibility of cytotoxic changes.

KEYWORDS

Mouthwashes; Micronucleus; Smokers.

INTRODUÇÃO

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 [1].

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 [2].

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 [3].

O álcool atua no processo de carcinogênese bucal como agente promotor, aumentando a permeabilidade da membrana celular a penetração de outros carcinógenos [4].

Estudos evidenciam que o tabagismo e o consumo de álcool em excesso aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas de boca e orofaringe em humanos [5,6,7].

O estudo realizado por Jindal et al. em 2013, mostrou que o tabaco e o álcool podem causar alterações nas células da mucosa oral, sendo que o álcool apresentou efeito menos grave quando comparado com o tabaco, mas que juntos causam um efeito sinérgico, o que pode levar a um aumento na chance de desenvolvimento do câncer oral. E defende a visão de que as alterações citológicas na mucosa bucal, como consequência do uso do tabaco e do álcool podem servir como um complemento no diagnóstico precoce de alterações pré -malignas orais e câncer [8].

O uso regular de bochechos contendo álcool, entre os não usuários de tabaco e álcool, tem sido discutido como fator de risco para o câncer bucal, e para comprovação desta hipótese diversas metodologias têm sido empregadas [9,10,11].

O teste do micronúcleo (MN) 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 [12,13]. Os MN 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 [14].

Desta maneira, a detecção de MN na citologia esfoliativa deve ser interpretada como exposição recente a carcinógenos ou como erros espontâneos durante a replicação de DNA [15]. Sua frequência elevada na mucosa oral é considerada um indicativo de efeitos genotóxicos e está relacionado ao provável desenvolvimento de carcinomas da mucosa oral [16].

Portanto, a utilização do teste de MN possibilita a análise das possíveis alterações genotóxicas decorrente do uso frequente de enxaguatórios bucais com base alcoólica. O objetivo deste trabalho é avaliar quantitativamente a frequência de MN em indivíduos fumantes e não fumantes, utilizadores de enxaguatórios bucais com base alcoólica, através de citologia esfoliativa, com a finalidade de verificar os efeitos genotóxicos na mucosa bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com a Resolução Brasileira nº 196/1996 para ética em pesquisa, e foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, protocolo número 094/2009-PH/CEP, atendendo aos princípios da Declaração de Helsink (2000).

Foram selecionados 30 indivíduos adultos, pacientes das clínicas do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (ICT

UNESP), estudantes universitários, pós-graduandos e pré-vestibulares frequentes aos cursos do ICT UNESP, voluntários para participação deste estudo. Todos os participantes foram submetidos à anamnese para avaliação de condições de saúde e hábitos de higiene oral, bem como a exame clínico extra e intra-bucal.

Os critérios de exclusão foram: consumo de bebida alcoólica durante o período de avaliação - quantidade máxima permitida semanal: 1 lata de cerveja (330 ml) ou 1 copo de vinho (140 ml), segundo critérios AUDIT, 2001, para bebedores de baixo grau; 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) e indivíduos com histórico familiar de neoplasias malignas em boca. Para os indivíduos fumantes o critério de inclusão foi o consumo mínimo de 20 cigarros/dia, sendo o contrário obrigatório para os indivíduos não fumantes.

Os participantes foram divididos em 02 grupos de n=15, subdivididos em indivíduos fumantes (Grupo 1) e outro de não fumantes (Grupo 2), ambos os grupos utilizaram enxaguatório bucal com base alcoólica e óleos essenciais. Estes realizaram 2 bochechos diários durante 3 semanas, com duração de 30 segundos, um pela manhã e outro à noite, após a higienização oral.

Quadro 1- Distribuição dos grupos experimentais

Grupos	Enxaguatório Testado	Dose	Tempo de Bochecho	Frequência	Duração do Tratamento
Grupo 1 Fumantes	Listerine Johnson&Johnson	20 ml	30 segundos	2x ao dia (manhã e noite)	3 semanas
Grupo 2 Não Fumantes	Listerine Johnson&Johnson	20 ml	30 segundos	2x ao dia (manhã e noite)	3 semanas

Citologia Esfoliativa

Foram realizadas 04 coletas (01 para controle inicial e 03 coletas nas semanas subsequentes, com uso do enxaguatório com base alcoólica). As coletas foram realizadas em dias e horários pré - estabelecidos, uma vez por semana.

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;

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

Após a coleta, os materiais foram dispostos suavemente sobre as lâminas de vidro e fixados em solução spray fixadora Vagispec® (Adlin Plásticos Ltda, Brasil) [17].

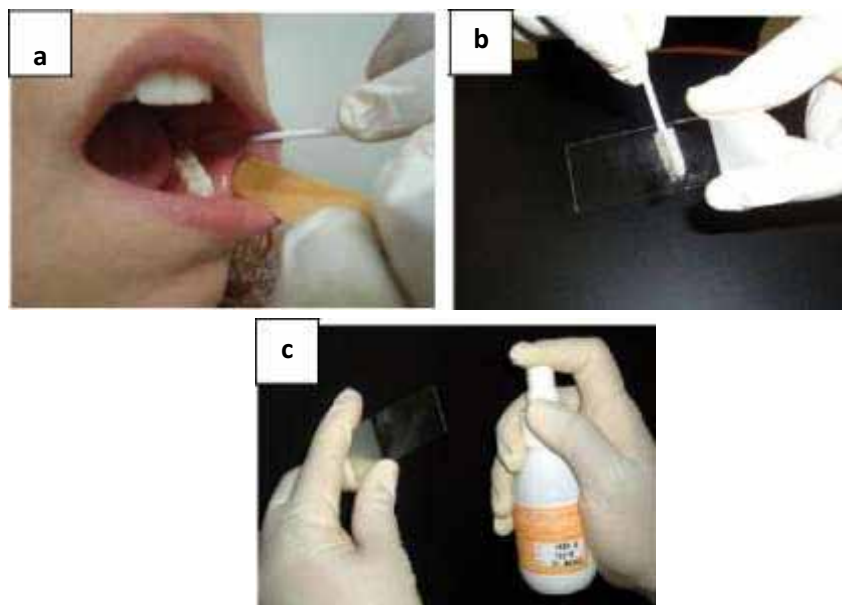


Figura 1 – a) Esfoliação do tecido epitelial da mucosa jugal do lado esquerdo; b) Aplicação do material coletado sobre a lâmina pré-identificada; c) Fixação do material coletado com solução spray Vagispec®.

As amostras foram então, encaminhadas ao Laboratório do CEBAPE - Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Especiais, procedendo à coloração. Os materiais citológicos foram processados de acordo com o método citoquímico de Feulgen contra corados com Fast Green [18].

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 [19], 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 sequencial de coloração para o método Feulgen

Sequência	Ação	Procedimento
01	Remoção da Solução Fixadora	Enxágue com álcool 95%
02	Hidratação	HCl 4N por 5 minutos em temperatura ambiente
03	Coloração Nuclear	Reagente Schiff – Merck®, por 90 minutos a 4°C, sem presença de luz
04	Lavagem	3 mergulhos seguidos em água destilada
05	Contra Coloração de Fast Green Coloração Citoplasmática	1 mergulho em solução de Fast Green Vetec®
06	Desidratação	3 mergulhos seguidos em álcool absoluto
07	Clareamento	Xilol, 6 a 8 mergulhos cada
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.	Entelan e lamínula

Análise das Lâminas

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

Para a análise de MN, observou-se no mínimo 3000 células/indivíduo, seguindo os padrões indicados por Holland et al. [14].

Os critérios adotados foram os estabelecidos por Tolbert et al. [20], para seleção, inclusão, número de células e identificação de micronúcleos. Para contagem das células o critério utilizado inclui somente as células que apresentavam os núcleos normais e intactos, com perímetro nuclear liso e distinto, e que apresentavam o citoplasma. Para contagem de MN o critério foi a presença de um halo circundante representativo de uma membrana, menos de 1/3 do diâmetro do núcleo associado mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor, inexistência de sobreposição ou ligação com o núcleo, intensidade da coloração com Feulgen semelhante ao núcleo e mesmo plano focal a microscopia.

Os dados coletados sobre a frequência de MN e células micronucleadas foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Mann Whitney. Para verificar a associação entre frequência de MN e a variável idade foi utilizada a correlação de Spearman.

RESULTADOS

Características da amostra composta por 30 indivíduos, divididos em 02 grupos:

Não Fumantes - enxaguatório com álcool

Constituído por 09 mulheres e 06 homens com média de idade de 29 anos (17-42 anos). Quanto à etnia 86,67% se declararam brancos e 13,33% pardos.

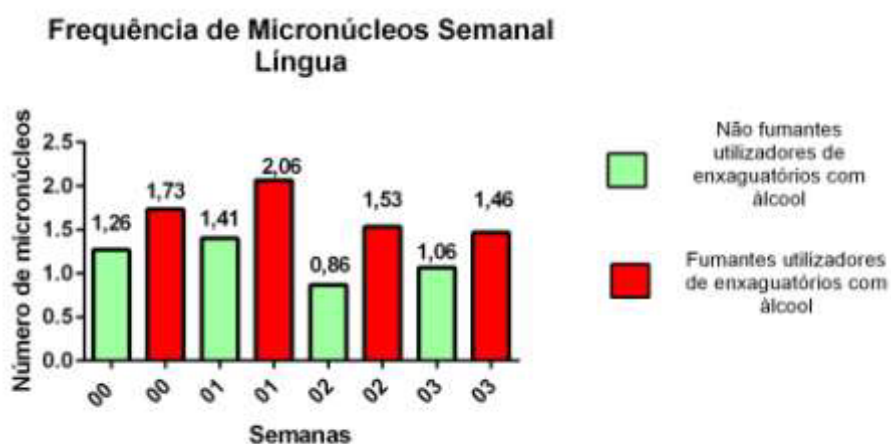
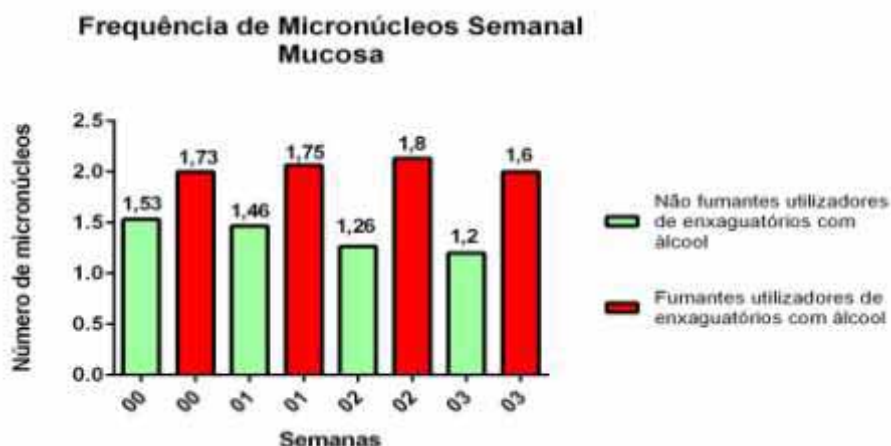
Fumantes - enxaguatório com álcool

Constituído por 08 mulheres e 07 homens com média de idade de 30 anos (18-38 anos). Quanto à etnia 93,34% se declararam brancos e 6,66% pardos.

Quando se indagou a respeito dos indivíduos que estavam sob tratamento médico 93,33% dos indivíduos responderam negativamente no grupo Não Fumantes enxaguatório com álcool e 87,3% no grupo Fumantes enxaguatório com álcool.

Quanto ao uso de medicamentos; no grupo não fumantes 86,67% responderam negativamente para o uso de medicamentos, 13,33% usavam anticoncepcionais e 6,67% antidepressivos, no grupo fumantes 73 % responderam negativamente para o uso de medicamentos, 18,36% usavam anticoncepcionais e 8% antidepressivos.

Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas: 13,34% do grupo não fumantes e 17,23% no grupo fumantes, consumiram durante a pesquisa a dose máxima permitida de bebidas alcoólicas.



Analisado o sítio mucosa jugal, o Grupo 1 Fumantes apresentou uma variação semanal de : $\pm 1,73$; $\pm 1,78$; $\pm 1,8$ e $\pm 1,6$ e, o Grupo 2 Não Fumantes apresentou uma variação semanal de: $\pm 1,53$; $\pm 1,46$; $\pm 1,25$ e $\pm 1,2$.

Quando analisado o sítio língua, o Grupo 1 Fumante apresentou uma variação semanal de: $\pm 1,73$; $\pm 2,06$; $\pm 1,53$ e $\pm 1,46$ e, o Grupo 2 Não Fumantes apresentou uma variação semanal de: $\pm 1,26$; $\pm 1,41$; $\pm 0,86$ e $\pm 1,06$.

Diante destes dados, pode-se constatar um ligeiro aumento do número de MN, quando comparado o grupo de fumantes ao grupo de não fumantes, porém esta diferença foi considerada estatisticamente não significativa.

A quantificação de associação entre a variável 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 variáveis. Dessa maneira, quando a correlação é positiva indica que a variável é diretamente proporcional. 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.

Quadro 3- Correlação de Spearman para Frequência de MN X Idade

Resultados				
Não fumantes	mucosa	Correlação	0,0135*	Correlação positiva
		p-valor	0,9680	Não significantes
	língua	Correlação	-0,313	Correlação negativa
		p-valor	0,9116	Não significantes
Fumantes	Mucosa	Correlação	-0,2022	Correlação negativa
		p-valor	0,9002	Não significantes
	Língua	Correlação	-0,454	Correlação negativa
		p-valor	0,9123	Não significantes

* Hipótese Significativa

Embora haja uma correlação positiva na correlação de Spearman para frequência de MN e idade dos indivíduos, este valor não foi estatisticamente significativo.

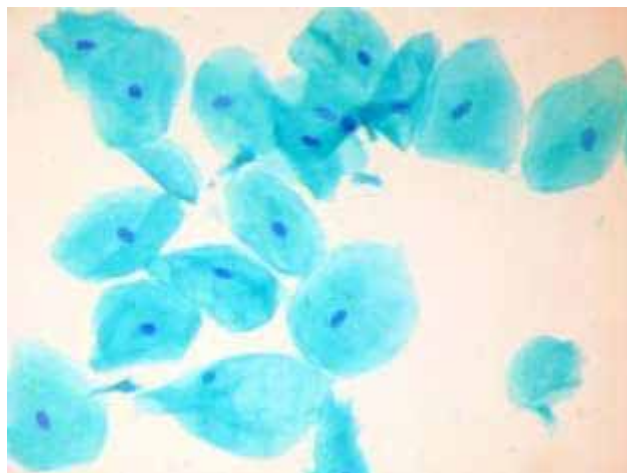


Figura 2 – Esfregaço corado pelo método Feulgen-Fast Green, apresentando citoplasma verde e núcleo magenta.

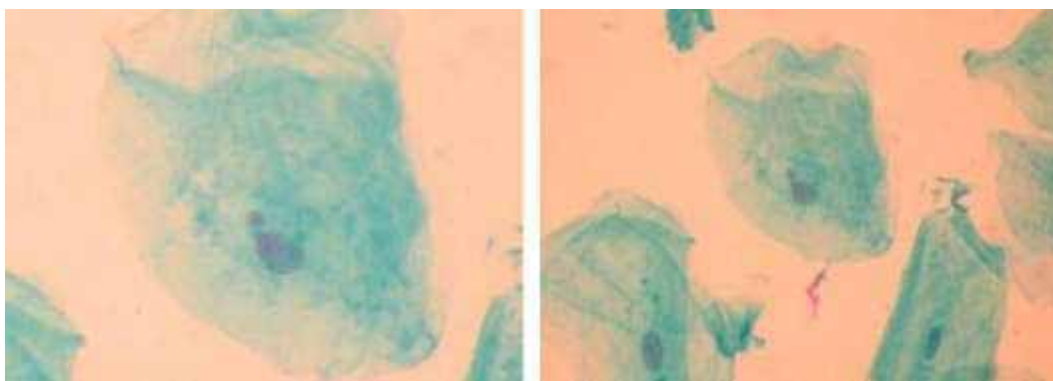


Figura 3 - Células apresentando micronúcleos.

DISCUSSÃO

É visível que a odontologia atual 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 para um bom relacionamento familiar e social [21]. Inserido neste contexto a placa bacteriana torna-se um possível facilitador das doenças periodontais e tem sido amplamente considerada o principal fator etiológico dessas doenças.

O controle dessa 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 [22].

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 [23]. 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 [24].

A utilização frequente de enxaguatórios bucais vem tornando-se essencialmente popular nos últimos anos. Estas soluções são eficazes no controle e redução da placa e das gengivites, seu uso aumentado tendeu-se devido a razões sociais e cosméticas [25].

No Brasil, a utilização de enxaguatórios bucais 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 [26].

Entre os compostos ativos mais utilizados em antissépticos bucais temos a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, além de óleos essenciais. A clorexidina, um dos biocidas mais utilizados em formulações anti-sépticas, é uma biguanida catiônica que age

principalmente sobre bactérias gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos, enquanto que o cloreto de cetilpiridíneo, sobre bactérias gram-positivas e leveduras. Entre os compostos fenólicos, o triclosan tem sido o mais utilizado em formulações para controle da placa bacteriana, apresentando ação principalmente contra bactérias gram-positivas; no entanto, este ativo tem sido utilizado em associação a copolímeros, que aumentam seu espectro de ação sobre bactérias gram-negativas e leveduras [27].

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 [27].

Muitos dos colutórios com propriedades antiplaca contém graus farmacêuticos de álcool, com os propósitos de solubilidades, preservação e atividade germicida, os enxaguatórios que contem álcool incluem compostos de óleos essenciais e clorexidina [3].

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 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% [28].

O álcool é muitas vezes utilizado nos enxaguatórios como solvente para outras substâncias e como conservante do preparo. O uso de colutórios orais aumenta o tempo de exposição da mucosa oral ao álcool, demonstrando que enxaguatórios bucais com alto teor de álcool produzem lesões hiperqueratinizadas tanto em homens quanto em animais de laboratório [29]. Além da exposição ao álcool, os indivíduos que fazem o uso de enxaguatórios cotidianamente reclamam a respeito do desconforto causado por este tipo de bochecho. Diniz et al., avaliaram a percepção do uso de enxaguatório com álcool em indivíduos que faziam seu uso de maneira rotineira, estes indivíduos citaram o aparecimento de sensações como queimação, gosto metálico e ardor na cavidade oral, após o uso contínuo de enxaguatório a base de óleos essenciais com álcool [30].

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 [31;32], porém o primeiro produto metabólico, o acetaldeído, tem sido reconhecido como uma substância cancerígena local [33], atuando genotóxicamente sobre as células [34]. O acetaldeído (AA) é formado endogenamente como produto principal da oxidação metabólica do etanol dependente da enzima álcool desidrogenase [32].

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). Segundo Dellarco [35], 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. Variações genéticas nas atividades dessas enzimas (ADH e ALDH) podem influenciar o resultado da exposição ao álcool e sua carcinogenicidade [36].

Diversas pesquisas evidenciaram que o tabagismo e consumo de álcool em excesso aumentam o risco de desenvolvimento de cânceres de boca e orofaringe em humanos [37,6,7].

Segundo a Organização Mundial de Saúde, atualmente cerca de 2 bilhões de pessoas fazem uso do tabaco e quase 2 bilhões de adultos em todo o mundo consomem bebidas alcoólicas regularmente [38,39].

Aproximadamente dois terços dos carcinomas de células escamosas e 75% dos cânceres de cabeça e pescoço têm sido associados ao consumo de tabaco. Estima-se que o tabagismo é responsável por cerca de 4-5 milhões de mortes por ano em todo o mundo. E este número deverá aumentar para cerca de 10 milhões por ano até o ano de 2030 [8].

O uso do tabaco em suas mais variadas formas pode funcionar tanto como agente iniciador quanto como promotor do câncer, e pode ter sua ação acentuada por situações como o alcoolismo, desnutrição, ação de irritantes mecânicos e outros; é capaz de alterar o grau de ceratinização na mucosa bucal [40,41] e, além disso, pode alterar a área nuclear das células de fumantes, e pode elevar a área nuclear

celular de não fumantes [42;43]. Os fumantes crônicos fazem parte de um grupo de alto risco que precisam ser orientados a ser submetidos ao exame bucal por cirurgiões dentistas [44]. Segundo Naderi et al., em um estudo realizado em 2012, afirmou-se não apenas que as diversas formas de se utilizar o tabaco levam a um aumento do número de micronúcleos como também o tempo que o indivíduo possui o hábito de fumar. Naderi et al. analisaram indivíduos com história de tabagismo com menos e com mais de 10 anos e relataram que o grupo de indivíduos que fumavam por mais tempo apresentou uma maior quantidade de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal, propondo que o maior tempo de exposição ao tabaco pode aumentar a frequência de micronúcleos [45].

O estudo realizado por Jindal et al. em 2013, mostrou que o tabaco e o álcool podem causar alterações nas células da mucosa oral, sendo que o álcool apresentou efeito menos grave quando comparado com o tabaco, mas que juntos causam um efeito sinérgico, o que pode levar a um aumento na chance de desenvolvimento do câncer oral. E defende a visão de que as alterações citológicas na mucosa bucal, como consequência do uso do tabaco e do álcool podem servir como um complemento de no diagnóstico precoce de alterações pré-malignas orais e câncer [8].

Há evidências experimentais substanciais para o efeito carcinogênico do tabaco. Vários estudos celulares e em animais de laboratório vêm demonstrando que o tabagismo inicia e promove o desenvolvimento tumoral, especialmente, aqueles que acometem o trato gastrointestinal superior [46,47].

A suposição de que a solução alcoólica presente nos colutórios bucais, pudessem ser considerada um fator de risco para o câncer bucal foi relatada primariamente por Weaver et al. [48] sendo o *odds ratio* da associação entre o uso do enxaguatório bucal e câncer bucal variando de um efeito protetor para uma elevação no risco do aparecimento de lesões neoplásicas. Blot et al. [49] concluíram que não existia um aumento significativo entre o risco daqueles que utilizavam colutórios contendo álcool. Mais posteriormente, Mashberg et al. [50] 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 tabagistas, 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.

Em 1989, Kabat et al. também consideraram a possibilidade que a exposição prolongada a certos compostos dos colutórios poderiam aumentar os risco de câncer oral, porém relataram que as razões iniciais para o uso de enxaguatórios bucais estavam diretamente associados à exposição ao tabaco e ao álcool [51].

Winn et al. em 1991, afirmaram diante de seus resultados, que o uso de regular de colutórios aumentou o risco de cânceres em boca e orofaringe em 40% em homens e 60% em mulheres. O risco em ambos os sexos aumentou proporcionalmente à duração e frequência de uso. O aumento do risco foi observado em usuários de colutórios com alta concentração de álcool, consistente com aumento de risco associado com consumo de bebidas alcoólicas [52].

Em 2001 os mesmos autores, conduziram uma análise semelhante em Porto Rico. Os dados demonstraram que aproximadamente 25% dos casos de cânceres 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. Ao final, os autores concluíram que não houve evidência de risco aumentado de cânceres de boca e orofaringe associadas ao uso de colutórios com álcool [53].

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 auto relataram este uso. Guha et al. concluíram nesta metodologia que o uso de enxaguatórios contendo álcool pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres de cabeça e pescoço independente do uso de tabaco e consumo de álcool. Quando somente considera-se os cânceres 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. Estes autores porém afirmaram não saber os tipos de enxaguatórios utilizados nem o teores alcoólicos dos mesmos [54].

Mais recentemente Marques et al. em 2008; em um estudo de caso controle, afirmaram veementemente que o uso diário de enxaguatórios bucais apresentou associação mais intensa de tumores de faringe do que tumores de boca, e afirmou ainda que o uso habitual de enxaguatórios bucais foram fatores associados com os cânceres orais, independentes do tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas [11].

Cullough e Faraht em 2008, afirmaram baseados em revisões literárias que já haviam 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 a longo prazo desses tipos de bochechos [10].

Em 2009 Vecchia, através de uma análise crítica dos dados publicados nas últimas três décadas, revela que não há estabelecido uma possível relação entre colutórios bucais contendo álcool e os cânceres 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 cânceres no aparelho digestivo devido às concentrações mínimas de álcool [55].

Múltiplos agentes influem de forma genotóxica nas células e estão relacionados aos vários estágios da carcinogênese. Com relação à cavidade oral, o tabaco tem sido descrito como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas [56,57,58]. O consumo de álcool, por outro lado, é citado como agente potencializador no desencadeamento de lesões cancerosas

[16]. Em indivíduos fumantes, o consumo de álcool apresenta um efeito sinérgico na indução de câncer bucal [59,16]. Porém, o efeito do álcool isoladamente na indução de lesões cancerosas ou pré - cancerosas parece permanecer mal esclarecido, ainda que a sua atividade mutagênica tenha sido descrita por vários autores [60,61].

Sitch e Rosin [16], 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. Em nosso presente estudo, a utilização do enxaguatório com base alcoólica deu-se ininterruptamente por 3 semanas e, foi possível constatar que houve um aumento na frequência semanal de micronúcleos quando comparado o grupo experimental composto por indivíduos fumantes que apresentou uma variação de : $\pm 1,73$; $\pm 1,78$; $\pm 1,8$ e $\pm 1,6$ para o sítio mucosa jugal e $\pm 1,73$; $\pm 2,06$; $\pm 1,53$ e $\pm 1,46$ para o sítio língua; ao grupo experimental composto por indivíduos não fumantes que apresentou uma variação de $\pm 1,53$; $\pm 1,46$; $\pm 1,25$ e $\pm 1,2$ para o sítio mucosa jugal e $\pm 1,26$; $\pm 1,41$; $\pm 0,86$ e $\pm 1,06$ para o sítio língua. No entanto, estas variações não foram estatisticamente significantes.

Diante dessas inconclusões, a importância de estabelecer uma relação causal ou não; de que o uso de enxaguatórios bucais contendo álcool poderia ser um agente de risco para o câncer bucal, torna-se mais importante quando analisamos os números relacionados a utilização dos colutórios bucais no Brasil, já que este encontra-se em franca ascensão na higiene oral, complementando o trio: escova, creme e fio dental. Entre 2001 e 2002 houve um aumento de 14,4%

nas vendas, representando uma parcela significativa da população [26].

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 enxaguatório com álcool em uso conjunto com o tabaco, 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.

CONCLUSÃO

Após a análise dos dados, os resultados obtidos sugerem que as ligeiras elevações numéricas de MN foram encontradas nos dois sítios avaliados quando comparados o Grupo 1 Fumantes com o Grupo 2 Não Fumantes, porém não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre eles, sugerindo que o enxaguatório com álcool não é indutor de alteração genotóxica, o que não exclui a possibilidade de alterações citotóxicas. Assim, novos estudos são necessários para comprovar tal hipótese.

REFERÊNCIAS

1. Rojas FJE, Santos-Aleman A. Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. RCOE 2005; 10(4):445-52.
2. Haq MW, Batool M, Ahsan SH, Qureshi NR. Alcohol use in mouthwash and possible oral health concerns. J Pak Med Assoc. 2009;59(3):186-90.
3. 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. Disponível em: <<http://www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/SA08-21014.PDF>>.
4. McCance KL, Huether SE. (Eds). Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children. 3. ed. St. Louis: Mosby; 1998.
5. Figuero-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.
6. Marshal 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.
7. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero Lapiedra R, Gonzales-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.

8. Jindal S, Chauhan I, Grewal HK. Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organiser regions and micronuclei. J Cytol. 2013 Jul-Sep; 30(3):174–8.

9. Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnus 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):730–5.

10. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol -containing mouthwashes. Aust Dent J. 2008;53:302-5.

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

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

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

18. 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):441–6.

19. 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.

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

21. 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.

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

23. Asadoorian J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. *Can J Dent Hyg*. 2006;40(4):1-13.

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

25. 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.

26. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos [Internet]. São Paulo; 2009. [citado em 05 Fev 2011]. Planilha com dados de consumo de produtos de higiene bucal no Brasil entre 2000 e 2004. Disponível em: <www.abihpec.org.br> .

27. 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.

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

29. 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;9:116-23.

30. Diniz PA, Fernandes EE, Lima CF, Pilli-Joias R, Rode SM. Percepção dos pacientes em uso de enxaguatórios bucais: óleos essenciais e cloreto de cetilperidíneo. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2014;68(3):245-9.
31. Boyle P, Autier P, Bartelink H. European code against cancer and scientific justification: third version (2003). Ann Oncol. 2003;14(7):973–1005.
32. World Health Organization. Global status report on alcohol. Geneva: World Health Organization; 1999. [acesso em 06 Out 2014]. Disponível em:
<http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/GlobalAlcohol_overview.pdf?ua=1>.
33. Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17(4):679–94.
34. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer Lancet Oncol. 2006;7(2):149–56.
35. Dellarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. Mutat Res. 1988;195(1):1-20.
36. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(3):306-11.
37. Figuero-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.

38. Organização Mundial da Saúde [Internet]. Cigarro mata mais de 5 milhões de pessoas, segundo OMS – [acesso em 06 Out 2014]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/08/cigarro-mata-mais-de-5-milhoes-de-pessoas-segundo-oms>.
39. Organização Mundial da Saúde [Internet]. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira [acesso em 06 Out 2014]. Disponível em: [m o alcool.pdf](#).
40. Mosadomi A, Shklar G, Loftus ER, Chauncey HH. Effects of tobacco smoking and age on the keratinization of palatal mucosa: a cytologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46(3):413-7.
41. Gangane N, Chawla S, Subodh A, Gupta S, Sharma SM. Reassessment of risk factors for oral cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8(2):243-8.
42. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med*. 1990;19(2):53-5.
43. Einstein TB, Sivapathasundharam B. Cytomorphometric analysis of the buccal mucosa of tobacco users. *Indian J Dent Res* 2005; 16(2):42-6.
44. Ling H, Gadalla S, Israel E, Langenberg P, Zhan M, Dwyer DM, et al. Oral cancer exams among cigarette smokers in Maryland. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(6):499-506.

45. Naderi NJ, Farhai S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012;55:433-8.
46. Lee HJ, Guo HY, Lee SK, Jeon BH, Jun CD, Lee SK, et al. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(7):436-43.
47. Patel BP, Rawal UM, Shah PM, Prajapati JA, Rawal RM, Dave TK, et al. Study of tobacco habits and alterations in enzymatic antioxidant system in oral cancer. *Oncology.* 2005;68(4-6):511-9.
48. Weaver A, Fleming SM, Smith DB, Park A. Mouthwash and oral cancer: carcinogen or coincidence. *J Oral Surg.* 1979;37(2):250-3.
49. Blot WJ, Winn DM, Fraumeni JF Jr. Oral cancer and mouthwash. *J Nac Cancer Inst.* 1983;70(2):251-3.
50. Mashberg A, Barsa P, Grossman ML. A study of the relationship between mouthwash use and oral pharyngeal cancer. *J Am Dent Assoc.* 1985;110:731-4.
51. Kabat GC, Herbert JR, Wynder EL. Risk factors for oral cancer in women. *Cancer Res.* 1989;49:2803-28.
52. 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;51:3044-7.
53. 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;12:419-29.

54. Guha N, Boffetta P, Wunsch 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;166:1159-73.
55. Vecchia, Carlo La. Mouthwash and oral cancer risk: an update. *Oral Oncol*. 2009;45:198-200.
56. 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.
57. 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.
58. Roberts DM. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytol*. 1997;41(4):1008-14.
59. 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.
60. Schottenfeld D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer*. 1979;43(5):1962-6.
61. 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.

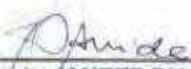
ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - M. São Diniz
CEP 12261-070 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / jmed@fod.usp.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. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

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: Análise da frequência de micronúcleos frente à utilização de colutório bucal com base alcoólica em indivíduos fumantes e não fumantes.

Pesquisador Responsável: Pamela Aparecida Diniz

Telefones para contato: (12) 98116-6980

♦ 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 4 semanas, Acompanhamento e coleta de material semanalmente (em dias pré estabelecidos), durante as 5 semanas.

- ♦ O período de participação será de 04 semanas.

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:

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?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
	Qual?			

6	Faz uso rotineiramente de cigarro?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
	Quantos cigarros/dia?			

7	Faz uso de drogas?	SIM ()	NÃO ()	NÃO SEI ()
---	--------------------	---------	---------	-------------

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

Outras informações que julgar importante

referir: _____

DECLARO que o respondido acima é verdadeiro.

São José dos Campos, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do paciente ou responsável