

CELINA FAIG LIMA

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRONÚCLEOS NA
CITOLOGIA ESFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE
PACIENTES DEPENDENTES QUÍMICOS**

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

CELINA FAIG LIMA

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRONÚCLEOS NA
CITOLOGIA ESFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE
PACIENTES DEPENDENTES QUÍMICOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Janete Dias Almeida

**São José dos Campos
2007**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com :

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Lima, Celina Faig

Avaliação quantitativa de micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos.

Celina Faig Lima; orientadora: Profa Dra. Janete Dias Almeida. – São José dos Campos, 2007.

82p. , IL.

Dissertação (Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

1.Citodiagnóstico – 2. Mucosa bucal – 3.Micronúcleo – 4. Álcool
5. Tabagismo 6. Drogas.

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 28/ Maio / 2007

Assinatura :

e-mail: celinafaig@yahoo.com.br

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Fátima** e **Camilo**, que ofereceram todas as oportunidades para que eu realizasse meus sonhos, sempre apoiando minhas escolhas, e torcendo por mim. Mãe, obrigada por me escutar e ensinar a encarar as coisas de maneira clara e de forma positiva. Pai, agradeço pelas vezes em que me ajudou a encontrar as soluções para momentos difíceis de maneira tranquila. Unidos sempre partilhamos momentos de alegria e dificuldades e tenho certeza que esta união será sempre eterna. Amo vocês.*

*À minha avó **Celina**, minha segunda mãe, pelo amor e carinho dedicados a mim, incondicionalmente. A você, todo meu respeito e gratidão.*

*Ao meu noivo **Eduardo**, amor de quem me orgulho. Sem seu apoio e compreensão eu não poderia concluir este trabalho.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Dra. Janete Dias Almeida, que conduziu o desenvolvimento desta tese encaminhando com segurança as atividades e participando diretamente delas quando necessário. Professora exemplar que transmite seus conhecimentos com sabedoria e dedicação, empenhada na boa qualidade do ensino. Profissional humana, que trata a todos com dignidade, e pessoa íntegra que realiza toda sua atividades da forma mais correta possível. Este aprendizado, levarei comigo eternamente.

Aos pacientes do CAPSAD que me receberam com muito carinho. Obrigada pela confiança que vocês depositaram em mim. Este trabalho foi realizado com vocês e para vocês.

Ao Prof. Adj. Luiz Antônio Guimarães Cabral, por dividir comigo seu imenso conhecimento, e de transmitir, por exemplo próprio, sua filosofia de comprometimento e integridade com a profissão.

AGRADECIMENTOS

Ao diretor Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior em nome da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, pela oportunidade de realização deste curso;

À Prefeitura Municipal de São José dos Campos pelo consentimento para realização deste trabalho, mostrando como a pesquisa e a saúde pública podem caminhar juntos em benefício de todos;

Ao CAPSAD e toda sua equipe, em especial o enfermeiro José Augusto, pela receptividade e auxílio na captação dos voluntários para este trabalho;

À Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, pela oportunidade concedida;

Ao Prof. Tit. Horácio Faig Leite, professor, tio e amigo. Você foi o exemplo que me levou a iniciar a pós-graduação e para que eu continue perseguindo o sonho de tornar-me, como você, excelente professor um dia.

Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Castillo Salgado da disciplina de Histologia e Embriologia, pelo apoio e atenção nas orientações durante a realização dos procedimentos laboratoriais

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal; em especial a Prof. Dra. Adriana Aigotti Haberbek Brandão

e a **Prof. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho** pelo agradável convívio e conhecimentos transmitidos;

Aos professores da Disciplina de Semiologia **Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante** e **Prof. Tit. Walter Domingos Niccoli Filho** pela amizade conquistada;

Às bibliotecárias **Ângela e Silvana** pelo trabalho realizado com objetivo de facilitar e ajudar durante a revisão bibliográfica;

Aos técnicos de laboratório **Walter e Salete**, pelo ajuda oferecida durante a realização da coloração das lâminas, sempre dispostos a facilitar o trabalho e ajudando a obter as informações (desconhecidas) a respeito da técnica;

Ao enfermeiro **Ivan** do ambulatório da Disciplina de Semiologia pela serenidade e disposição em realizar seu trabalho;

Ao amigo e colega de mestrado **Vitor Hugo Farina**, parceiro desta caminhada, dos trabalhos apresentados, dos erros e acertos cometidos.

Aos amigos de **Pós-graduação**, especialmente **Renata Falcete** pela amizade construída, pelos bate-papos informais e **Vanessa**, pela solidariedade, apoio oferecido e conhecimento compartilhado;

Aos meus companheiros de ambulatório **Andréa Penteado, Liana** e **Luiz Felipe** pelas parcerias, amizade e crescimento juntos nas discussões dos casos e troca de opiniões durante os atendimentos.

À amiga **Lidiana Ubiña**, companheira dedicada de pesquisa (Iniciação Científica-FAPESP), juntas formamos uma dupla imbatível sobre os obstáculos da parte prática;

Aos meus familiares, meu amado **Avô Beraldo** que mesmo distante sei que torce e pede por mim em suas orações; meus primos **Luiz Roberto, Fabíola e Fernanda**, que sempre formaram uma torcida ao meu favor e minha

*querida **Tia Eliza** , pelo incentivo, apoio em todos os momentos e pelo exemplo de solidariedade e bondade;*

*À minha querida tia **Eneida** (in memoriam), pela nossa convivência tão intensa em carinho e alegrias. Você foi uma graça de Deus em minha vida, e será para sempre inesquecível;*

*À minha colega cirurgiã-dentista e amiga **Fernanda Mollica**, exemplo de determinação e honestidade, por ter me ensinado que nada é impossível para àqueles que perseguem seus objetivos da maneira correta;*

*Às minhas amigas **Camila, Carol e Gabriela**, minhas irmãs postizas, e **Aline Farkuh** e **Lídia Mota** eternas amigas do peito, pelos momentos de descontração e risos que revitalizam minhas forças;*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Carcinoma epidermóide x fatores de risco.....	15
2.2 Citologia esfoliativa como método diagnóstico complementar.....	17
2.3 Avaliação de micronúcleos.....	22
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODO	38
4.1 Seleção da amostra.....	38
4.2 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras.	39
4.3 Realização da coloração de <i>Feulgen</i>	40
4.4 Avaliação das lâminas.....	40
4.5 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Caracterização das amostras.....	43
5.2 Frequência geral de micronúcleos.....	44

5.3 Frequência de micronúcleos x variáveis quantitativas.....	46
5.4 Frequência de micronúcleos x variáveis qualitativas.....	48
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	66
8 REFERÊNCIAS	67
ANEXO	78
APÊNDICE	79
<i>ABSTRACT</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR = região organizadora nucleolar corada pela prata

CAPSAD = Centro de Apoio Psicosocial Álcool Drogas

CE = carcinoma epidermóide

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

DNA = ácido desoxiribonucléico

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

LAP = Laboratório de apoio à pesquisa

MN = micronúcleo

OMS = Organização Mundial de Saúde

UNESP = Universidade Estadual Paulista

°C = graus Celsius

g = grama

N = normal

ml = mililitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Gráfico 01: Avaliação e distribuição de MN nos grupos CAPSAD e controle.....	46
FIGURA 2	Gráfico 02: Associação para destilados e fermentados e MN.....	49
FIGURA 3	Gráfico 03: Frequência de micronúcleos x utilização de drogas ilícitas.....	49
FIGURA 4	Gráfico 04: Utilização de medicamentos e frequência de MN.....	50
FIGURA 5	Gráfico 05: Condição bucal x frequência de MN.....	51
FIGURA 6	Apresentação das células do grupo CAPSAD a) Esfregaço mostrando células coradas pelo método <i>Feulgen</i> , com citoplasma verde e núcleo acastanhado; b) Célula binucleada com apenas 01 MN.....	53
FIGURA 7	Células do grupo CAPSAD e controle: a) Célula micronucleada do grupo controle com apenas 01 MN; b) Célula micronucleada com 03 MN do grupo CAPSAD.....	54
FIGURA 8	Células micronucleadas do grupo CAPSAD nas figuras a e b célula com apenas 01 MN.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência de MN para o grupo CAPSAD e controle.....	45
Tabela 2	Total de MN e frequência de células micronucleadas.....	45
Tabela 3	Matriz de correlação entre a frequência de micronúcleos e idade, cigarro e bebidas alcoólicas..	47
Tabela 4	Atividade profissional exercida pelo grupo CAPSAD e controle.....	52

LIMA CF. Avaliação quantitativa de micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007. 82f.

RESUMO

O presente trabalho avaliou quantitativamente micronúcleos (MN) na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes com dependência química. Os MN contêm material genético perdido durante a mitose em eventos clastogênicos e aneugênicos e ocorrem antes de qualquer mudança histopatológica pré-neoplásica tornar-se evidente. Foram triados 24 pacientes dependentes químicos, do CAPSAD (Centro de Apoio Psicosocial Álcool Drogas) da Prefeitura de São José dos Campos e 24 pacientes não fumantes, ou que não fumassem há 10 anos, com ingestão semanal inferior a 03 doses de bebidas alcoólicas e não usuários de drogas ilícitas, nas clínicas da FOSJC-UNESP. O critério de inclusão para os grupos foi ausência de lesões bucais. Foi realizada citologia esfoliativa do bordo lingual lateral esquerdo e aplicado teste de MN com coloração de *Feulgen*. A análise de 600 células/paciente foi realizada por microscopia óptica e a estatística utilizou os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para frequência de MN e células micronucleadas, e correlação de Spearman para a quantidade e anos de consumo (IC 95%, nível de significância 5%). No grupo CAPSAD a frequência média de MN foi de $3,08 \pm 3,20$ e a média do grupo controle foi $2,08 \pm 1,93$; e para células micronucleadas foi $2,38 \pm 2,57$ para o grupo CAPSAD e de $1,42 \pm 1,25$ no grupo controle. Os resultados mostram que a frequência de MN e células micronucleadas para o grupo CAPSAD foi numericamente superior mas a diferença entre os grupos não foi significativa estatisticamente. A quantidade diária ingerida de cigarro, álcool e drogas ilícitas mostrou maior influência na frequência de MN que os anos de ingestão.

PALAVRAS – CHAVE: Citodiagnóstico, mucosa bucal, micronúcleo, álcool, tabagismo, drogas.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias são a segunda causa de morte no Brasil, entre elas a de maior interesse na área estomatológica é representada pelo carcinoma epidermóide (CE) (Brasil⁹, 2005). As alterações epiteliais encontradas são derivadas de um processo de carcinogênese envolvendo iniciação, promoção e progressão.

Na carcinogênese atuam elementos intrínsecos e extrínsecos, participando deste processo, portanto muitos agentes etiológicos destacando-se o tabaco, álcool, dieta nutricional, radiações ionizantes, infecção viral além de alterações genéticas. O tabaco atua no processo de carcinogênese tanto como agente iniciador como promotor, sendo por este motivo o consumo de cigarro um dos fatores de risco mais frequentes para o desenvolvimento do câncer bucal. A atuação do álcool é somente como agente adjuvante deste processo.

Muitos têm sido os esforços para prevenção e detecção do carcinoma epidermóide (CE) através do diagnóstico precoce e campanhas de conscientização quanto ao tabagismo (Fontes et al.²⁰, 2004), ingestão de bebidas alcoólicas e exposição a outros agentes carcinógenos.

Quando a atuação através da prevenção falha, o diagnóstico precoce torna-se medida de extrema necessidade baseada na

atuação profissional pelo conhecimento das condições predisponentes, das lesões consideradas cancerizáveis e do CE propriamente (Faria et al.¹⁶, 2003), somando-se a realização de exames complementares. A biópsia é o exame complementar mais utilizado para diagnóstico, mas com indicação somente em casos de alterações clinicamente visíveis. A citologia esfoliativa seria um método de escolha, não invasivo e que pode ser aplicado em áreas onde ainda não existe evidência clínica de qualquer alteração.

A citologia esfoliativa foi preconizada como método de detecção precoce de câncer de colo uterino por Papanicolau e Traut⁴⁸, em 1941 e introduzida para diagnóstico do câncer bucal em 1951 por Montgomery e Von Haan³⁹, representando uma alternativa prática, de baixo custo e de grande interesse para a saúde pública. Apesar das vantagens sua utilização sofreu um declínio na detecção do câncer bucal por ser considerada de baixa sensibilidade, e com interpretação de caráter subjetivo, o que levaria a um elevado número de resultados falso negativo (Freitas et al.²³, 2004). Entretanto hoje se sabe que a baixa sensibilidade é conferida por erro de técnica, com coleta inadequada dos raspados, além de falta de experiência dos patologistas.

Para o ressurgimento da citologia esfoliativa o incremento de novas técnicas de avaliação dos raspados foi de fundamental contribuição como análise quantitativa, citomorfometria, análise de DNA, detecção de marcadores tumorais e análise molecular. Assim, a

citologia vem contribuindo ativamente para o estudo e diagnóstico de diversas patologias principalmente das neoplasias malignas.

As interações do DNA com substâncias químicas são sabidamente fatores iniciadores no processo de carcinogênese. Por este motivo maior ênfase vem sendo dada aos métodos que detectam a atividade genotóxica em humanos, como tentativa de biomonitoramento de grupos de alto risco. Devido à sua associação com aberrações cromossômicas os micronúcleos (MN) têm sido utilizados desde 1937 como uns dos indicadores da exposição genotóxica.

Os micronúcleos contêm material genético que foi perdido do genoma durante a mitose, como resultado de eventos clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) e ocorrem antes de qualquer mudança histopatológica pré-neoplásica tornar-se evidente.

Diante do exposto verifica-se a oportunidade de avaliar quantitativamente micronúcleos da mucosa de pacientes com dependência química de agentes carcinógenos propriamente como e tabaco e adjuvantes como o álcool, através da citologia esfoliativa, para verificar os efeitos genotóxicos causados e contribuir assim como alerta aos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide x fatores de risco

As neoplasias são a segunda causa de morte no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Brasil⁹, 2006). Para superação deste quadro cabe aos profissionais da área da saúde o investimento em prevenção e conscientização da população. A conscientização a respeito dos fatores etiológicos é de fundamental importância neste processo. O diagnóstico precoce também se enquadra nos métodos preventivos, uma vez que o tipo de tratamento e o prognóstico para esta patologia serão melhores.

Para Faria et al.¹⁶ (2003) é muito importante que o profissional esteja habilitado para realizar o diagnóstico precoce do câncer bucal, o que está diretamente relacionado ao conhecimento, atitude e prática do cirurgião-dentista.

O câncer bucal, quando detectado precocemente, apresenta um índice de sobrevida maior do que o de outros tipos de câncer (Mashber et al.³⁵, 1989). Além da importância epidemiológica o câncer bucal requer atenção pelo alto custo financeiro que representa ao serviço público (Brasil⁹, 2006). O risco de câncer bucal diminuiria em 30% se o fumante eliminasse este hábito entre 1-9 anos após o início do consumo,

e de até 50% se parasse de fumar após 9 ou mais anos (Macfarlane et al.³³, 1995).

Assim os esforços para prevenção e detecção precoce são cada vez maiores principalmente nas diversas áreas de pesquisa, entre elas a da biologia molecular. Os biomarcadores moleculares podem ser divididos em três tipos: de exposição, susceptibilidade e de resposta (Wünsch Filho e Gattás⁷¹, 2001). Os biomarcadores de exposição representam a expressão da ação de um agente ambiental ou de seus metabólitos em um indivíduo. Os de susceptibilidade indicam indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento de neoplasias malignas quando expostos a agentes carcinógenos; e os biomarcadores de resposta indicam alterações presentes tardiamente e permitem avaliar o prognóstico da doença.

Para os autores Wünsch Filho e Gattás⁷¹ (2001) a epidemiologia molecular e a citogenética representam um avanço tanto para a avaliação da exposição, quanto para a detecção de indivíduos susceptíveis, e possui imenso potencial para ampliar a compreensão dos mecanismos da carcinogênese e dos efeitos de fatores de risco para o câncer.

O consumo de substâncias de risco, ou seja, carcinógenos como o tabaco, e adjuvantes como o álcool, afetam não somente a saúde, mas também a qualidade de vida de seus consumidores. Fumantes habituais ingerem quantidade de bebida alcoólica em excesso, praticam atividades físicas com menor frequência, além de possuir dieta com

menores proporções de frutas e vegetais resultando em freqüentes queixas de dores e sono intranquilo (Strine et al.⁶³, 2005).

O consumo de álcool considerado de risco para saúde de um indivíduo por Moreira et al.⁴⁰ (1996) foi de 30g/dia em estudo realizado na cidade brasileira de Porto Alegre. Os autores também observaram a associação da bebida alcoólica com o ambiente familiar, sexo masculino, dependência do álcool após 30 anos, melanoderma e condição econômica baixa. Os tipos de bebida mais consumidos foram cerveja, vinho e cachaça.

O uso de álcool e drogas afeta não somente as classes sociais menos favorecidas como também jovens de classe média que freqüentam as universidades como mostra o estudo realizado por Underwood et al.⁶⁸ (2003) que investigaram o uso destas substâncias por estudantes de odontologia. O consumo de álcool era maior entre estudantes do sexo masculino (89%), ingerindo 21 doses por semana. O uso da droga *cannabis* foi de pelo menos 01 vez ao mês. Outras drogas menos utilizadas foram ecstasy (4%) e cocaína (2%). O consumo médio de cigarros foi de 10 cigarros/dia (9% dos alunos).

2.2 Citologia esfoliativa como método diagnóstico complementar

A citologia esfoliativa foi utilizada no princípio por Papanicolaou e Traut⁴⁸ (1941) para detectar precocemente alterações

celulares e contribuir para prevenção do câncer de colo uterino e até os dias de hoje é consagrado como método diagnóstico contribuindo para redução da mortalidade feminina. No entanto o primeiro relato da possibilidade de uso para diagnóstico de carcinomas surgiu realmente no século XIX, quando Beale⁶ (1860) descreveu os achados citológicos em escarro de uma paciente com carcinoma de orofaringe.

A utilização da citologia esfoliativa na área estomatológica iniciou-se com a detecção das alterações precoces de carcinomas bucais com Montgomery e Von Haan³⁹ (1951) em estudo utilizando a citologia esfoliativa em dez casos de leucoplasias, de diferentes regiões, encontrando aumento da queratinização das áreas leucoplásicas sem alterações sugestivas de malignidade.

Durante anos o método caiu em desuso pelo questionamento quanto à subjetividade da técnica e a quantidade de falsos resultados. Folsom et al.¹⁸ (1972) avaliaram 148 casos de lesões com suspeita clínica de malignidade. Encontraram 31% de resultados falsos negativos de malignidade, no entanto detectaram 03 casos onde não havia suspeita clínica. Sandler et al.⁵⁷ (1958) também verificaram bons resultados comparando a acuidade da citologia em relação à biópsia (92%). King et al.³¹ (1963) em estudo de diversas lesões bucais utilizando espátulas de madeira, metal e cotonete já constatavam que a citologia esfoliativa é um método rápido e indolor que permite melhor seleção dos casos a serem biopsiados.

O exame citológico seleciona e propõe diagnóstico para lesões que podem representar câncer ou seus precursores (Holland et al.²⁸, 2000). A utilização da citologia esfoliativa, além de contribuir para alertar pacientes que fazem uso de substâncias que atuam na iniciação e promoção do câncer bucal, como pacientes fumantes, diagnosticando alterações citológicas, ainda vem a ser um importante recurso de acompanhamento em casos de neoplasias já instaladas ou já tratadas (Almeida e Cabral², 1992; Almeida et al.³, 1994; Fontes et al.¹⁹, 2004; Freitas et al.²³, 2004).

A citologia esfoliativa pode ser amplamente empregada em estomatologia não só em processos neoplásicos, mas também em infecções virais, fúngicas e doenças auto-imunes como o pênfigo vulgar (Almeida e Cabral², 1997; Tommasi⁶⁷, 2002). Tavares⁶⁵ (2001) utilizou o estudo citológico para análise comparativa dos aspectos celulares da mucosa bucal de mulheres com o ciclo menstrual regular, homens adultos, meninas antes da menarca e mulheres com pelo menos dois anos de menopausa. Concluiu que existem diferenças entre o início e meio do ciclo quanto maturação e picnose nuclear.

O aprimoramento da técnica bem como novos métodos de análise dos raspados vêm sendo desenvolvidos (Felefli e Flaitz¹⁷, 2000; Ogden et al.⁴⁶, 1997). Ogden et al.⁴⁵ (1992) compararam a eficácia do *cytobrush* com a tradicional espátula de madeira através de duas coletas de raspados da mucosa bucal normal de 26 pacientes. Os locais de escolha foram: palato duro, mucosa jugal, dorso e ventre lingual. Para

análise dos dados obtidos foram utilizados critérios de dispersão e número de células por campo. O *cytobrush* estabeleceu superioridade sobre a espátula de metal nos dois critérios, exceto no palato duro. Jones et al.²⁹ (1994) compararam o *cytobrush* à tradicional espátula de madeira tendo como critérios a conveniência para prática clínica, o desconforto causado ao paciente, a qualidade e a distribuição das células epiteliais coletadas em cinco grupos constituídos por pacientes que apresentavam lesões vesico-bolhosas ou ulcerativas, candidíase, eritoplasia e carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças quanto à percepção a dor pelos pacientes entre os dois métodos avaliados, não sendo também observadas diferenças relacionadas à quantidade de células coletadas, mas sim quanto à distribuição que ocorreu de maneira mais uniforme pelo *cytobrush*.

Queiroz et al.⁵² (2006) também verificaram a superioridade da técnica com o *cytobrush* quando comparada à espátula metálica, onde os esfregaços obtidos pelo *cytobrush* apresentaram-se qualitativamente melhores quanto a celularidade e homogeneidade, resultando em maior acuidade de leitura das lâminas.

Acha et al.¹ (2005) discutem os aspectos da aplicação da biologia molecular na citologia esfoliativa da mucosa bucal como método diagnóstico predictivo e de monitoramento de lesões malignas e lesões cancerizáveis. O estudo genético permite detectar as alterações antes que se produzam mudanças na morfologia celular e que estas se tornem

visíveis clinicamente. A análise molecular permite identificar entre as células normais uma população de clones de células neoplásicas.

A citologia esfoliativa em boca, considerando os aspectos bucais preventivos, além do diagnóstico precoce de neoplasias, em especial do carcinoma epidermóide, tem sido utilizada também para evidenciar grupos populacionais de alto risco para agentes carcinógenos bem conhecidos como o tabaco. Pavanello et al.⁵⁰ (2005) observaram menor maturação epitelial nas células da mucosa jugal de jovens universitários que fumam pouco e ingerem bebidas alcoólicas, quando comparados aos não fumantes. Oliveira et al.⁴⁷ (2007) analisaram quantitativamente, através da citologia esfoliativa e técnica de Papanicolaou, as alterações que ocorrem na mucosa bucal pelo tabagismo crônico em 30 fumantes (20 cigarros/dia por 30 anos) e compararam com 30 não-fumantes, ambos os grupos sem alterações da mucosa bucal clinicamente evidentes. Concluíram que a mucosa bucal de pacientes fumantes apresentou maior presença de alterações inflamatórias e queratinização do que pacientes não fumantes, e menor maturação celular exceto pelas alterações nucleares (picnose nuclear).

Zimmermann et al.⁷² (1965) já haviam constatado que o hábito de fumar provoca um retardo na maturação das células epiteliais da mucosa bucal em diversos sítios intra-bucais.

Fontes²¹ (2005) verificou maior atividade proliferativa das células do bordo lateral da língua e soalho bucal, quantificada pela técnica histoquímica das AgNORs, através da citologia esfoliativa de 22

pacientes fumantes (30 cigarros/dia/durante 30 anos) sem qualquer alteração clínica da mucosa.

Ogden et al.⁴⁴ (1990) avaliou o efeito do cigarro sobre a mucosa bucal através da citomorfometria de raspados citológicos constatando um aumento da área nuclear e citoplasmática das células do grupo de pacientes fumantes.

2.3. Avaliação de micronúcleos

Os micronúcleos (MN) são formados por fragmentos de cromatina ou cromossomos com anormalidades que, durante o ciclo mitótico, são excluídos do núcleo propriamente dito, resultando em aneuploidia. São identificados na intérfase de células em divisão, correspondendo a fragmentos acêntricos resultantes freqüentemente de deleções cromossômicas, nos casos de neoplasias de cabeça e pescoço, ou cromossomos inteiros que atrasam durante a anáfase da divisão celular. São detectados nas células esfoliadas da mucosa bucal, de revestimento do trato urinário e do cérvix uterino e parecem refletir aberrações cromossômicas que ocorreram durante a proliferação da camada basal (Proia et al.⁵¹, 2006). Segundo Ramirez e Saldanha⁵³ (2002) a formação de MN antecede os processo de cariorréxis e cariólise, em uma célula apoptótica.

Sarto et al.⁵⁸ (1987) atribui uma subdivisão aos micronúcleos conforme sua formação. Os micronúcleos com mais que 1/5 do tamanho do núcleo celular ou a presença de vários micronúcleos em uma mesma célula pode ser atribuída aos distúrbios do fuso. Já os demais micronúcleos são derivados de quebras, rupturas cromossômicas.

A análise de MN deve ser criteriosa uma vez que existem alterações degenerativas e outros fenômenos que podem causar confusão durante a contagem, levando a resultados falsos. Tolbert et al.⁶⁶ (1992) estudou a citologia esfoliativa de três diferentes grupos para estabelecer critérios que diferenciasssem os micronúcleos de processo degenerativos que podem causar confusão quando da aplicação do teste de MN. Os grupos eram compostos de pacientes submetidos à radioterapia há três semanas e um grupo de usuários de *snuff* (tabaco não fumado). Como critério considerou que os MN representam estruturas com limites citoplasmáticos definidos, com no máximo 1/3 do tamanho equivalente ao núcleo, próximo a ele, porém sem possuir qualquer ponto de ligação.

Nersesyan⁴¹ (2005) em carta ao editor da revista *Mutation Research* questiona sobre os critérios utilizados na diferenciação entre micronúcleos, fenômeno *broken egg* e *nuclear buds*, reafirmando a definição de Tolbert et al.⁶⁶ (1992) para os MN. *Broken egg* trata-se de uma estrutura circular ligada ao núcleo por uma haste (ponte de cromatina), e *nuclear bud* uma estrutura circular que possui um ponto direto de ligação ao núcleo. Para o autor, apenas os micronúcleos estão

relacionados a efeitos genotóxicos enquanto *broken eggs* e *nuclear buds* relacionam-se a efeitos de processos degenerativos.

A realização dos procedimentos técnicos também deve ser cuidadosa. Nersesyan et al.⁴³ (2006) demonstraram que o uso de colorações não específicas para DNA, como Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, levou a contagem equivocada de MN nas células da mucosa bucal de 20 pacientes fumantes, 4-5 vezes maior quando comparada a contagem nas células coradas por corantes DNA específicos como 4',6-diamidino-2-phenylindole, *Feulgen*, *acridine orange*.

Ayyad et al.⁴ (2006) compararam o método de coloração Papanicolaou com May-Grunwald-Giemsa para visualização dos MN em 40 raspados citológicos obtidos de 20 pacientes fumantes. O método de Papanicolaou foi considerado prático, de fácil realização, sendo bactérias e debris que porventura poderiam mascarar a visualização dos MN eliminados.

O teste de MN vem sendo utilizado como método de biomonitoramento de grupos populacionais de risco para diversos agentes genotóxicos. O contato com tais agentes pode ocorrer de diversas formas: pela ingestão acidental de substâncias contidas na água ou em alimentos, consumo de carcinógenos como o tabaco, através da inalação de agentes poluentes, contato com metais pesados e outros produtos do cotidiano presentes em casa e no trabalho.

Montero et al.³⁸ (2003) verificaram pelo teste de MN na citologia esfoliativa da mucosa bucal, aumento da média da frequência de

MN nas células do epitélio bucal de adolescentes que residem em ambiente urbano, geralmente poluído com produtos resultantes da combustão de fontes de energia variadas. O grupo avaliado foi constituído por 37 mulheres jovens na faixa etária entre 11 e 16 anos, residentes na cidade do México. Os sítios intra-bucais de estudo foram a mucosa jugal e do palato mole.

A exposição ocupacional a substâncias genotóxicas tornou-se objeto de preocupação da comunidade científica. Çelik et al.¹³ (2003) avaliaram 50 trabalhadores (25 fumantes e 25 não-fumantes) em estações de petróleo através do teste de MN e outras anormalidades como células binucleadas, cariólise e cariorréxis. Também foram avaliados os níveis de fenol encontrados na urina. A análise de 1000 células permitiu concluir maior frequência de MN nos trabalhadores de estações de petróleo fumantes, média 20 cigarros/dia, quando comparado os não-fumantes e também o grupo controle, constituído por não fumantes que não trabalhavam com derivados do petróleo. Os níveis de fenol na urina também foram correlacionados com maior número de MN.

Gattás et al.²⁵ (2001) iniciaram uma avaliação pelo teste de MN na citologia esfoliativa da mucosa bucal, em frentistas do mesmo posto de gasolina em 1989 quando o combustível mais utilizado era apenas o etanol puro. Quando o metanol foi introduzido como alternativa em misturas de combustíveis na cidade de São Paulo, em 1991, através da mistura denominada MEG (contendo 33% de metanol) outra amostra dos trabalhadores foi coletada. A última amostra foi colhida em 1995,

período em que predominava o uso da mistura gasolina/etanol. A frequência de MN em 1991 foi significativamente maior comparado a 1989 e 1995. O tempo médio de trabalho dos frentistas era de 2-30 anos. Tais resultados alertam para o potencial genotóxico do metanol.

Cavallo et al.¹² (2006) não observaram diferenças na frequência de MN nas células da mucosa bucal e linfócitos entre trabalhadores da aviação civil expostos a vapores de combustíveis ou resultantes de sua combustão, comparados a pessoas comuns (não-expostas).

Pastor et al.⁴⁹ (2003) investigaram a relação entre a exposição ocupacional a pesticidas e danos citogenéticos, aplicando o teste de MN nas células da mucosa jugal e em linfócitos do sangue periférico de 239 agricultores europeus da Grécia, Espanha, Polônia e Hungria. Não encontraram diferenças estatisticamente significantes na frequência de MN, nem para os linfócitos nem para as células da mucosa jugal. A única alteração encontrada foi no índice de proliferação celular que esteve diminuído para os linfócitos. A utilização de medidas de proteção pela maioria dos agricultores e a baixa toxicidade dos pesticidas foram as causas atribuídas aos resultados.

Sailaja et al.⁵⁶ (2005) constataram ao avaliar 180 trabalhadores rurais expostos a 54 diferentes tipos de pesticidas durante aproximadamente 8.6 ± 2.5 anos de exposição, que houve aumento da frequência média de MN nas células da mucosa jugal (1.24 ± 0.72) dos

trabalhadores expostos aos pesticidas comparativamente a pessoas não expostas (0.32 ± 0.26).

Speit et al.⁵⁹ (2007) não observaram diferenças estatisticamente significantes no teste de MN para mucosa jugal de 22 pessoas expostas ao formaldeído (concentração 13.5 ppm, durante 10 dias de exposição). Foram comparadas as freqüências médias de MN uma semana antes da exposição (0.95), imediatamente após a primeira exposição (0.86), após os 10 dias de exposição (1.33), após 7 dias (0.94), 14 dias (0.85) e 21 dias (0.44). A diminuição da freqüência de MN foi considerada “efeito protetor do organismo”.

Cerqueira et al.¹⁴ (2004) não constataram diferenças através do teste de MN para células da mucosa jugal comparando pacientes submetidos à radiografia panorâmica e grupo controle. Os autores explicam que o turnover epitelial é rápido (de 7-16 dias) e os MN são notados apenas a partir de 3 semanas após a exposição ao agente genotóxico, enquanto neste estudo a avaliação foi feita após 10 dias. No entanto, avaliando anomalias metanucleares encontraram um aumento nas alterações indicativas de apoptose (cariorréxis e condensação de cromatina), o que provavelmente influiu de forma direta no resultado dos micronúcleos.

Para determinar o risco de danos citogenéticos causados pela exposição crônica ao arsênio, substância que encontra-se associada ao desenvolvimento de câncer de pele, pescoço e bexiga, Martinez et al.³⁴ (2005) avaliaram 105 pacientes de diferentes cidades do Norte do Chile

que ingeriam água com concentrações médias de 0.75mg/l de arsênio, enquanto os níveis preconizados pela OMS estão abaixo de 0.002mg/l. O teste de MN para células da mucosa jugal entre os grupos de estudo e controle não evidenciaram diferenças estatísticas. Ainda analisando os efeitos do arsênio, Ghosh et al.²⁶ (2005) observaram as variações genéticas em indivíduos suscetíveis ao câncer induzido por arsênio também pela ingestão de água. Aplicaram o teste de MN em três tipos de células diferentes sendo células da mucosa bucal, células uroepiteliais e linfócitos. Analisaram também as aberrações cromossômicas dos linfócitos, selecionando 244 indivíduos com lesões de pele em decorrência da exposição ao arsênio e 178 indivíduos assintomáticos. Verificaram danos citogenéticos mais elevados nos linfócitos e em células da mucosa bucal de indivíduos contaminados e fumantes comparados aos contaminados não fumantes. Vuyyuri et al.⁶⁹ (2006) verificaram aumento na frequência de micronúcleos em 200 trabalhadores da indústria de vidro expostos a arsênio com relação direta com hábitos tabagistas, idade e jornada de trabalho.

A investigação de micronúcleos aplicada a carcinogênese comprova o efeito sinérgico entre o cigarro e o álcool como demonstram os estudos de Stich e Rosin⁶⁰ (1983) em avaliação quantitativa em três centros de desintoxicação. Realizaram a citologia esfoliativa da mucosa jugal bilateralmente de 05 pacientes apenas fumantes (Grupo A), 09 pacientes que apenas utilizavam bebidas alcoólicas (Grupo B), 09 pacientes que fumavam e bebiam (Grupo C), e 21 pacientes que não

bebiam e fumavam (Grupo D). Pela avaliação de 500 células foram observadas respectivamente maior frequência de células micronucleadas e de MN por célula no grupo C, seguido pelo grupo A. Não foi observada diferença entre os grupos B e D. A frequência de MN esteve relacionada com a quantidade de cigarros por dia, porém esta mesma relação não foi observada para o consumo de álcool.

Sarto et al.⁵⁸ (1987), encontraram quase o dobro da frequência de MN resultantes de quebras cromossômicas nos pacientes fumantes (média 23cigarros/dia) quando comparados aos não fumantes em análise de 3000 células, enquanto a frequência para MN resultantes de distúrbios do fuso foi igual para ambos os grupos.

Bohrer et al.⁸ (2005) quantificaram a frequência de MN em diferentes regiões anatômicas: lábio inferior, bordo lateral da língua e soalho bucal de 28 fumantes de cigarros com filtro (Grupo A), 19 fumantes e que ingeriam em média 10 doses diárias de bebidas alcoólicas (Grupo B) e 21 pacientes que nunca fumaram e ingeriam menos que 01 copo de bebida alcoólica por dia (Grupo C) constituindo o grupo controle, todos com mais de 30 anos de idade. A média de cigarros/dia foi 20.83 ± 10 para o grupo fumante e 28 ± 14.96 para fumantes com uso do álcool. O grupo B apresentou maior frequência de MN do que o grupo A e C. O sítio anatômico com maior frequência de MN foi o soalho bucal seguido pelo bordo lingual lateral e vermelhão dos lábios respectivamente.

Reis et al.⁵⁴ (2002) avaliaram a frequência de MN em 1000 células esfoliadas da língua e da mucosa jugal de 40 indivíduos dependentes químicos do etanol, não-fumantes, internados no hospital psiquiátrico Ana Nery, Salvador/ Bahia; e de 20 abstêmios de álcool e fumo. Concluíram que o consumo excessivo de álcool promove alterações efetivas em células da mucosa bucal, mesmo na ausência de exposição ao fumo, sendo mais expressivas no bordo lateral de língua do que em mucosa jugal, sítio mais exposto à ação de carcinógenos. Os pacientes avaliados possuíam em média 25,5 anos de exposição ao etanol.

Freita et al.²² (2005) avaliaram 20 indivíduos expostos aos fatores de risco para desenvolvimento de câncer bucal (fumo e álcool) no Centro de Referência em Lesões Bucais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e 20 indivíduos em atendimento odontológico de rotina que constituíram o grupo controle. Além da comparação entre os dois grupos foi realizada comparação dentro de cada grupo quanto ao sexo, idade, uso de próteses e higiene bucal. O tratamento estatístico não revelou diferenças entre o grupo de estudo e o controle. A diferença intra-grupo mostrou-se significativa e maior para os indivíduos que faziam uso de enxaguatórios bucais.

Com o objetivo de correlacionar a frequência de MN em células da cavidade bucal com a presença de recidivas locais ou de segunda lesão primária em pacientes portadores de carcinomas epidermóides da boca e da orofaringe, Carvalho et al.¹¹ (2002) realizaram

estudo em 24 pacientes durante o período de tratamento e acompanhamento do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis no período de dezembro/94 a julho/97. O tempo médio de exposição ao álcool foi de 32 anos e ao tabaco de 37 anos. Dos casos avaliados 18 evoluíram para óbito devido à recidiva da neoplasia sendo que em apenas cinco casos os pacientes permaneceram vivos e livres de doença até o final do estudo. Quanto ao estadiamento houve maior frequência de MN nas lesões T4 e T3 respectivamente.

Bloching et al.⁷ (2000) comprovaram maior frequência de MN na citologia esfoliativa de 55 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço quando comparados a 16 pacientes com leucoplasia e 99 pacientes saudáveis. Mostrou-se altamente significativa a hipótese de um relacionamento entre o aumento da contagem de MN e o hábito de fumar, uma vez que os pacientes com neoplasias fumaram 24.3 cigarros/dia em média durante 32 anos.

Para determinar o risco de câncer esofágico através da contagem de MN Dietz et al.¹⁵ (2000) examinaram 245 pacientes, idade média 60,5 anos, 129 do sexo masculino e 116 do sexo feminino. Foram avaliadas 500 células/paciente, sendo que foram encontrados MN em material de apenas 160. Os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta e sem evidências de anormalidades esofágicas, foram colhidos materiais do esôfago médio. Concluíram que a frequência de MN na mucosa esofágica foi maior nos pacientes fumantes e que consumiam mate.

Ramirez e Saldanha⁵³ (2002) investigaram MN em pacientes alcolistas portadores de carcinomas bucais não recidivantes através da citologia esfoliativa. Para isto analisaram 2000 células ao redor da lesão, do lado oposto ao da lesão, da mucosa jugal e do fundo de saco superior. Verificaram na área ao redor da lesão, sete vezes maior incidência de MN comparado aos outros sítios avaliados.

A frequência de MN em células da mucosa bucal e linfócitos do sangue periférico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço não foi considerada marcador sensível de neoplasmas de cabeça e pescoço segundo Minicucci et al.³⁷ (2005). Os autores realizaram o teste de MN em 31 pacientes antes, durante e após radioterapia e em 17 pacientes saudáveis (grupo controle). Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos tanto para avaliação de MN de linfócitos quanto para células da mucosa bucal. Porém foi detectado um aumento da frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal de pacientes com mais de 60 anos de idade e nos pacientes que apresentavam tamanho da neoplasia > 4 cm.

Com o intuito de avaliar agentes quimiopreventivos como alimentos e seus micronutrientes, Stich et al.⁶² (1988) avaliaram a ação dos beta-carotenos e beta-carotenos mais vitamina A na redução de efeitos genotóxicos de agentes carcinógenos. Verificaram a diminuição da frequência de células micronucleadas em usuários de *betel quid* que apresentavam leucoplasias bucais. Três grupos receberam diferentes administrações. O grupo I recebeu 180mg/semana de beta-caroteno, o

grupo II 180mg/semana de beta-caroteno e 100.000UI/semana de vitamina A, e placebo foi administrado para o grupo controle (grupo III). Após 03 meses de tratamento, a frequência de células micronucleadas foi significativamente reduzida no grupo I (de 4.09% para 1.1% nas áreas de leucoplasias e 4.1% para 1.0% na mucosa normal). Somente após seis meses foi observada diminuição das leucoplasias especialmente no Grupo II.

Gabriel et al.²⁴ (2006) correlacionaram a diminuição dos níveis de folato, importante na síntese e reparação de DNA, com o aumento de aberrações genéticas através da frequência de MN/1000 células na mucosa bucal de 35 pacientes que fumavam mais de 10 cigarros/dia por no mínimo 01 ano, excluídos aqueles que ingeriam mais de duas doses de bebidas alcoólicas/dia. A frequência de MN encontrada para os pacientes fumantes (9.57 ± 0.41) representou o dobro daquela para os não fumantes (4.44 ± 0.52). Os pacientes fumantes apresentaram maior baixa de folato no plasma (20%), eritrócitos (32%), e células esfoliadas da mucosa bucal (50%) do que os pacientes não-fumantes bem como alterações de formação de vitamina B-6 e vitamina B-12. Nersesyan⁴² (2006) questionou estes resultados apresentados por Gabriel et al.²⁴ (2006), pois acredita que o cigarro leva a maior queratinização da mucosa bucal e que corpos de queratina acumulados no citoplasma podem ser confundidos com micronúcleos se uma coloração DNA-específica não for utilizada.

O efeito quimiopreventivo do chá verde foi avaliado em 32 casos de leucoplasias bucais por Li et al.³² (1999). Foi utilizado 40 % de extrato de chá verde, 40% de polifenóis de chá verde e pigmentos de chá para aplicação nas áreas leucoplásicas durante 06 meses. Houve uma diminuição de 37.9% no tamanho das lesões em 29 pacientes tratados com o chá. A frequência de MN nos pacientes tratados com o chá verde (5.4 MN/1000 células) foi maior quando comparado ao pacientes sem lesões bucais (1.4 MN/1000 células), mas menor do que o grupo com lesões leucoplásicas que utilizou placebo (11.3 MN/1000 células). A avaliação da proliferação celular em material de biópsia destas áreas pela técnica histoquímica das proteínas AgNORs e imunoistoquímica pelo PCNA indicou uma diminuição da proliferação celular.

Outros agentes carcinógenos também foram avaliados pelo teste de MN . Wu et al.⁷⁰ (2004) verificaram através do teste de MN, em células da mucosa bucal, os efeitos clastogênicos de usuários do *areca quid* (tipo de “gomas” mascaradas habitualmente pelas pessoas de Taiwan), cigarros e a interação entre os dois hábitos. A maior relação foi encontrada somente no consumo de cigarros e estava diretamente relacionada ao seu consumo diário.

Stich et al.⁶¹ (1982), observaram elevada frequência de MN na mucosa bual de 27 usuários de *Khaini tobacco* (mistura de fumo com lima), hábito difundido na Índia, comparados com não usuários do mesmo grupo étnico e com hábitos dietéticos similares. Em 1983, Stich et al.⁶⁰ verificaram aumento na frequência de MN ao aplicarem o teste de

contagem de MN em um grupo de 27 pacientes com alto risco para incidência de câncer na Índia que utilizavam esta mistura denominada *Khaini tobacco*.

Suhas et al.⁶⁴ (2004) averiguaram os danos citogenéticos dos fumantes de *beedi*, forma de tabaco muito consumida na Índia, avaliando células da mucosa jugal, palato e língua. A diferença entre a média de células micronucleadas foi relevante para mucosa jugal e palato, mas não para língua.

Kassie et al.³⁰ (2001) avaliaram o efeito do consumo das folhas da planta *Catha edulis* (kati), que possui um psicoestimulante natural muito consumido na África e países Árabes, através do teste de MN. Na primeira etapa do estudo, verificaram aumento de 8 vezes na frequência de MN nas células da mucosa bucal de 20 pacientes que consumiam o mínimo de 100g/dia de kati, quando comparado ao grupo que não consumia. Em uma segunda etapa do estudo verificaram que o consumo de cigarro (15-60/dia), álcool (15-80g etanol/dia) e kati (mínimo 100g/dia) provocou aumento de 4.5 vezes na frequência de MN nas células da mucosa bucal.

Outras doenças também foram avaliadas para seu potencial de dano citogenético pela frequência de MN. Investigando os possíveis danos que a doença de Behçet pode causar ao material genético, ou ainda o tratamento aplicado a estes pacientes, Hamurcu et al.²⁷ (2005) avaliaram pelo teste MN linfócitos e células esfoliadas da mucosa bucal de 30 pacientes com diagnóstico da doença sendo divididos em dois

grupos: o primeiro que recebia tratamento com colchicina e o segundo que não recebia tratamento de qualquer tipo. Não foram observadas diferenças na frequência de MN nos linfócitos entre os dois grupos, mas uma grande diferença foi estabelecida com superioridade comparando estes dois grupos ao grupo controle (sem a doença), para as células da mucosa bucal. Não foi possível estabelecer relação entre o uso de colchicina para tratamento da doença, nem para hábitos como tabagismo, bem como não houve associação com presença ou ausência de aftas e artrite reumatóide.

Rosin et al.⁵⁵ (1994) aplicaram o teste de MN nas células esfoliadas da mucosa jugal, dorso da língua e palato, em 04 pacientes com xeroderma pigmentoso. Verificaram aumento da frequência de MN comparado ao grupo controle (sem a doença), principalmente na língua.

Buajeeb et al.¹⁰ (2007) compararam a frequência de MN em 22 pacientes com lesões de líquen plano do tipo atrófico ou erosivo na mucosa jugal, gengiva e palato com duração média de 03 anos, recebendo as lesões scores de 1-5 conforme o tamanho das lesões e gravidade. A frequência de MN para 500 células avaliadas para cada lesão, maioria score 2 (presença de estrias brancas e áreas atróficas menores que 1cm²), foi de 3.79% e para as lesões onde o aspecto da mucosa estava próximo da “normalidade” foi de 0.37%. A frequência de MN em todas as lesões foi maior do que para as áreas adjacentes. Os pacientes encontravam-se sem uso de corticoterapia tópica ou sistêmica há 4 semanas.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar quantitativamente micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa de revestimento de pacientes com dependência química de agentes carcinógenos, e comparar com os resultados de pacientes não expostos a estes agentes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Seleção das amostras

Para este trabalho foram selecionados sessenta pacientes equivalentes em sexo e idade. A triagem foi realizada baseada nos seguintes critérios:

- a) inclusão para ambos os grupos: não apresentar histórico de neoplasia bucal maligna, nem sinais clínicos visíveis de anormalidades no bordo lateral lingual esquerdo;
- b) grupo experimental: constituído por trinta e seis pacientes que freqüentavam o Centro de Apoio Psicosocial Álcool Drogas (CAPSAD) para Dependentes Químicos da Prefeitura Municipal de São José dos Campos;
- c) grupo controle: constituído por trinta pacientes não fumantes, ou que não fumassem há pelo menos 10 anos, e que não consumissem semanalmente mais que 03 doses de bebidas alcoólicas e não fossem usuários de drogas ilícitas, que freqüentavam as clínicas da FOSJC-UNESP.

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal e responderam a um questionário sob forma de entrevista onde foram indagados sob frequência e quantidade ingerida de álcool, cigarros e drogas. Os dados obtidos foram anotados em uma ficha de coleta (Apêndice).

Este trabalho foi realizado de acordo com a Resolução Brasileira nº 196/1996 para ética em pesquisa, e foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, protocolo nº 030/2007-PH/CEP. Os indivíduos foram convidados a participar desta pesquisa após explicação e compreensão de todos os procedimentos e proposição, bem como da confidencialidade de suas identidades e informações fornecidas. Aqueles que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.2 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras

A citologia esfoliativa foi realizada utilizando-se o *cytobrush* na coleta de material da borda lateral esquerda da língua dos pacientes selecionados, sem utilização prévia de enxaguatórios bucais. As 06 lâminas obtidas foram imersas em um *container* com fixador Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) e fixadas por pelo menos 02 horas a temperatura ambiente. As amostras foram então levadas para o laboratório de apoio à pesquisa (LAP) do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC - UNESP.

4.3 Realização da coloração de *Feulgen*

Após fixação inicial as lâminas foram mantidas pelo mínimo de 50 min à temperatura de 4° C e então transferidas diretamente para o ácido clorídrico (HCL) 5N a temperatura ambiente, durante 5 min. O material foi transferido e ficou incubado no reagente de *Schiff* por 90 min a temperatura de 4° C .

Em seguida foram realizadas três lavagens consecutivas em água destilada para serem imersas no corante *Fast Green/Vetec*® 0,5% durante trinta segundos. Após imersão foram lavadas três vezes com álcool absoluto.

As lâminas foram clarificadas com xilol e sua montagem realizada com Entelan® e lamínula. As mesmas foram identificadas e então analisadas.

4.4 Avaliação das lâminas

As lâminas foram examinadas sob microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico modelo AXIOPLAN2/Zeiss® com sistema de foto AXIOPHOT2, inicialmente com aumento 40x e para confirmação dos micronúcleos aumento 100x. Foram analisadas 600 células que tinham o citoplasma corado de verde e o núcleo cor magenta.

A princípio foram contadas 100 células de cada uma das seis lâminas obtidas, mas quando uma lâmina apresentava células inadequadas para análise era contado um número maior de células na próxima lâmina em que a leitura fosse pertinente.

A contagem somente incluiu as células com os núcleos intactos, com perímetro nuclear liso e distinto, e que apresentassem citoplasma definido. Para contagem de micronúcleos o critério utilizado foi a presença de um halo homogêneo circundante, representativo de uma membrana, menos de 1/3 do diâmetro do núcleo associado, intensidade da coloração com *Feulgen* semelhante ao núcleo e mesmo plano focal à microscopia (Tolbert et al.⁶⁶, 1992), e que não tenham nenhuma ligação com o núcleo.

4.5 Análise estatística

Participaram deste trabalho 36 pacientes do grupo CAPSAD, dos quais 24 casos apenas apresentavam-se adequados para avaliação. O único teste paramétrico utilizado foi ANOVA para comparação das idades entre os grupos. Para as demais variáveis analisadas foram utilizados testes não-paramétricos, pois as suposições iniciais para se utilizar testes paramétricos, como a normalidade da distribuição e a homocedasticidade (homogeneidade das variâncias), não

foram satisfeitas. Foi definido um nível de significância de 5%. Todos os intervalos de confiança construídos ao longo do trabalho foram de 95%.

A frequência relativa de MN foi apresentada sob a forma de porcentagem de MN/ célula para 600 células avaliadas. Foram avaliadas as frequências de MN para os seguintes dados anotados na ficha de coleta durante anamnese e exame clínico:

- a- idade;
- b- sexo;
- c- quantidade de anos que fuma;
- d- número de cigarros fumados por dia;
- e- frequência que ingere bebidas alcoólicas;
- f- quantidade de bebida alcoólica ingerida;
- g- utilização de drogas;
- h- utilização de medicamentos;
- i- condição bucal;
- j- atividade profissional exercida;
- k- submissão a exames radiográficos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

Foram avaliados 24 pacientes do grupo CAPSAD e 24 do grupo controle, sendo cada grupo constituído por 20 homens e 4 mulheres. A média de idade foi de 44,04 anos para o grupo controle (variando de 22-56 anos de idade) e 41,33 anos (variando de 25-53 anos de idade) para o grupo CAPSAD.

No grupo CAPSAD o tempo de consumo de cigarros foi de 21.8 anos, com média de cigarros/dia de 19.9. Já o consumo de álcool foi em média de 8.3 doses diárias. Se considerarmos cada dose como 100ml de bebida alcoólica, o consumo foi de 830 ml/dia. Quando ingeriam bebidas alcoólicas os pacientes relataram aumento do número de cigarros consumidos de em média 20 cigarros com filtro a mais do que o consumo diário.

Três tipos de bebidas alcoólicas eram ingeridas: vinho, cachaça e cerveja, que foram agrupados em bebidas destiladas e bebidas fermentadas. Entre todos os pacientes avaliados a cachaça foi o tipo de bebida mais consumida no grupo CAPSAD.

Do número total de pacientes do grupo CAPSAD, 13 relataram consumir drogas ilícitas, sendo a mais consumida a maconha, seguida pela cocaína e crack. Outras drogas citadas foram cola e ecstasy.

Devido a doenças como hipertensão, depressão, ou pelo próprio tratamento, 19 pacientes do grupo CAPSAD faziam uso diário de medicamentos, principalmente anti-hipertensivos, antidepressivos e vitamina B.

A condição bucal do grupo CAPSAD foi considerada ruim para 18 pacientes (com presença de raízes residuais, perda de diversos elementos dentários e doença periodontal avançada), 3 regulares (presença de diversas cáries e tártaro mas sem perda de muitos elementos dentários), 2 boas (muitas restaurações, sem cáries e tártaro) e apenas 1 muito boa (sem cáries, restaurações ou tártaro).

O grupo controle foi constituído de pacientes que não ingeriam mais de 3 doses de bebidas alcoólicas por semana, não faziam uso de drogas ilícitas e não fumavam. Alguns pacientes faziam uso de anti-hipertensivos e antidepressivos. A condição bucal do grupo controle foi classificada como boa em 16 pacientes e regular em 08 casos.

5.2 Frequência geral de micronúcleos

As Tabelas 1 e 2 comparam os resultados para os dois grupos (CAPSAD e controle) através do teste de Kruskal-Wallis para MN e células micronucleadas.

Tabela 1- Frequência de MN/ célula para o grupo CAPSAD e controle.

MN	Um MN		Mais de 1 MN		Total de MN	
	CAPSAD	Controle	CAPSAD	Controle	CAPSAD	Controle
Média	1,46	0,75	0,88	0,75	3,08	2,08
Mediana	1	1	1	1	2	3
Desvio Padrão	1,53	0,74	1,33	0,79	3,20	1,93
p-valor	0,126		0,858		0,456	

Tabela 2 - Total de MN e frequência de células micronucleadas/600 células.

MN	Total de MN		Células micronucleadas	
	CAPSAD	Controle	CAPSAD	Controle
Média	3,08	2,08	2,38	1,42
Mediana	2	3	1,5	2
Desvio Padrão	3,20	1,93	2,57	1,25
p-valor	0,456		0,236	

Embora constatado maior número de MN no grupo CAPSAD, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Os resultados mostraram que no grupo CAPSAD a média do número total de MN foi de $3,08 \pm 3,20$ e para o grupo controle foi de $2,08 \pm 1,93$.

Para frequência de células micronucleadas os valores encontrados para o grupo CAPSAD variaram de $2,38 \pm 2,57$ e para o grupo controle de $1,42 \pm 1,25$.

A figura 1 ilustra a maior frequência de MN do grupo CAPSAD comparado ao grupo controle para células com somente 01

MN, células com mais de 01 MN, total de MN e total de células micronucleadas.

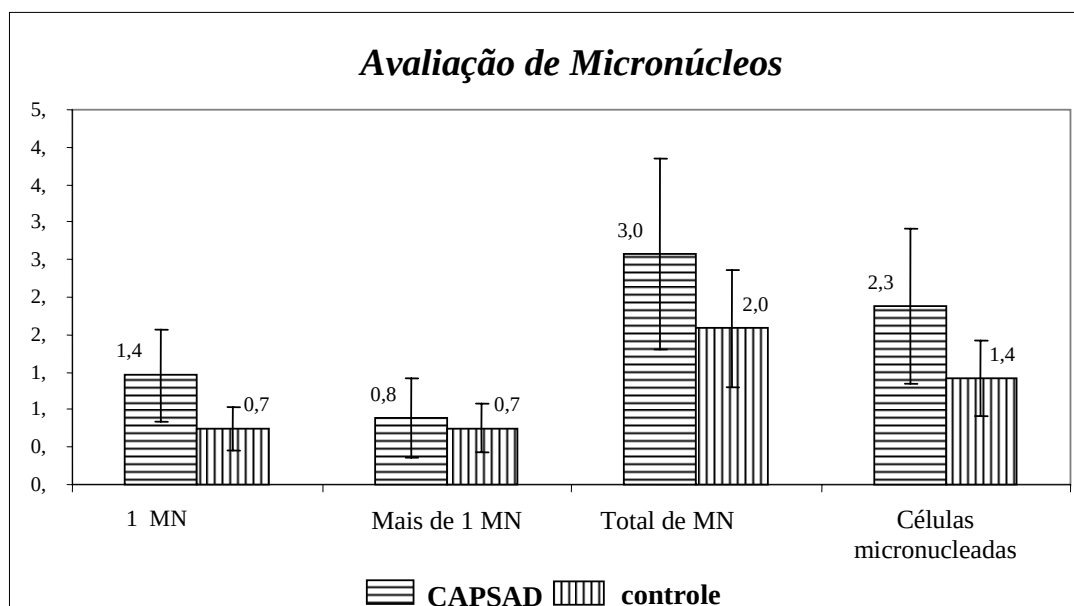


Figura 1 - Avaliação e distribuição de MN nos grupos CAPSAD e controle.

5.3 Frequência de micronúcleos x variáveis quantitativas

O grau de associação entre duas variáveis foi observado a partir da análise pela correlação de Spearman. Esta análise serve para mensurar o quanto as variáveis estão interligadas, ou seja, o quanto uma está relacionada com a outra. Quando a correlação é positiva significa que à medida que uma variável aumenta seu valor, a outra correlacionada a esta, também aumenta proporcionalmente. Através desta correlação a

freqüência de MN encontrada no grupo CAPSAD foi cruzada com as variáveis quantitativas: idade, anos que fumam, número de cigarros consumidos por dia, freqüência e quantidade de ingestão de bebidas alcoólicas.

Para validar a correlação, foi utilizado o teste para o coeficiente de correlação entre duas variáveis. O resultado de cada comparação possui uma estatística chamada de p-valor. Se este valor é menor que o nível de significância adotado 5%, concluímos que a hipótese avaliada é verdadeira. Os resultados destas análises configuram a matriz de correlação conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz de correlação entre a freqüência de micronúcleos e idade, cigarro e bebidas alcoólicas.

CAPSAD		Um MN	Mais de 1 MN	Total de MN	Células micronucleadas
Idade	Corr	17,3%	0,8%	1,6%	12,3%
	p-valor	0,419	0,971	0,941	0,568
Anos Fuma	Corr	-28,9%	-22,2%	-41,7%	-34,6%
	p-valor	0,171	0,298	0,043	0,097
N cigarro/dia	Corr	-6,4%	15,6%	4,3%	0,7%
	p-valor	0,768	0,466	0,840	0,972
Freqüência Bebe	Corr	-1,8%	3,1%	-10,6%	-4,8%
	p-valor	0,934	0,885	0,622	0,824
Quantidade bebe	Corr	-21,3%	11,5%	3,8%	-6,4%
	p-valor	0,318	0,593	0,859	0,765

Legenda: **Correlações positivas em negrito.**

Os resultados mostram que existe uma correlação positiva para idade, número de cigarros consumidos por dia e quantidade de bebida ingerida para a frequência total de MN encontrada no grupo CAPSAD. A frequência de bebida só foi correlacionada para as células com mais de 01 MN.

5.4 Frequência de micronúcleos x variáveis qualitativas

Analizando somente o grupo CAPSAD, foram comparados os resultados de MN entre as respostas qualitativas, utilizando o teste de Mann-Whitney e correlação de Spearman, ambos com nível de significância de 5%. O teste de Mann-Whitney é usado para pequenas amostras quando são independentes. Se p-valor é menor que o nível de significância adotado, as hipóteses avaliadas serão consideradas verdadeiras.

Os destilados foram as bebidas mais consumidas pelo grupo CAPSAD e, segundo os resultados para o teste de Mann-Whitney, apresentaram grande associação com as maiores frequências de MN total, células com 01 e mais de 01 MN e total de células micronucleadas conforme Figura 2.

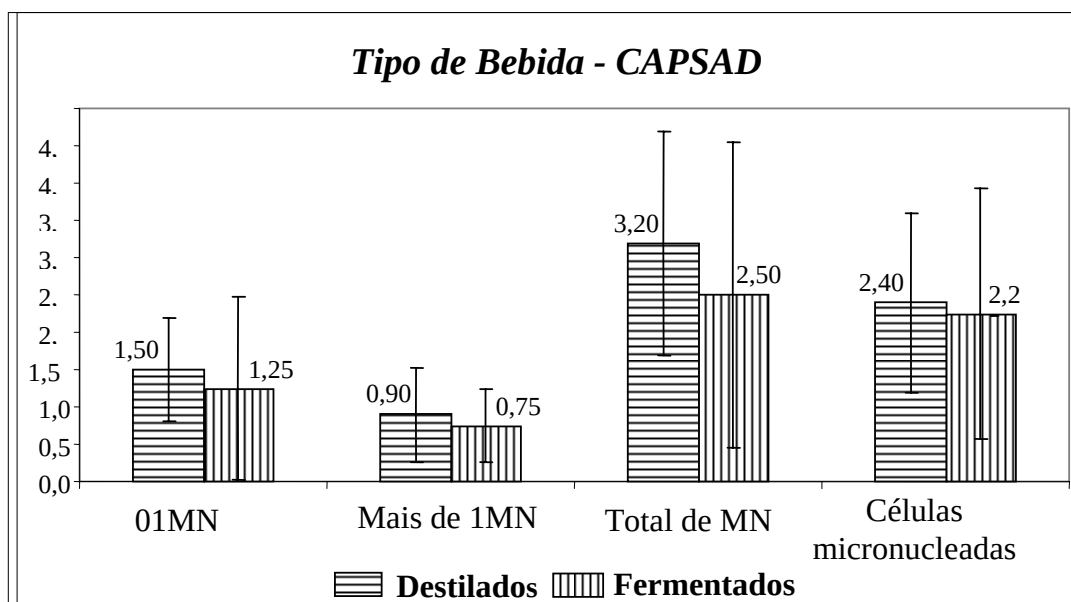


Figura 2 - Associação para destilados e fermentados e MN.

A utilização de drogas mostrou influência estatisticamente significativa na frequência de MN para células com mais de 01 MN ($p 0,039$) e para o total de MN ($p 0,039$), conforme a Figura 3.

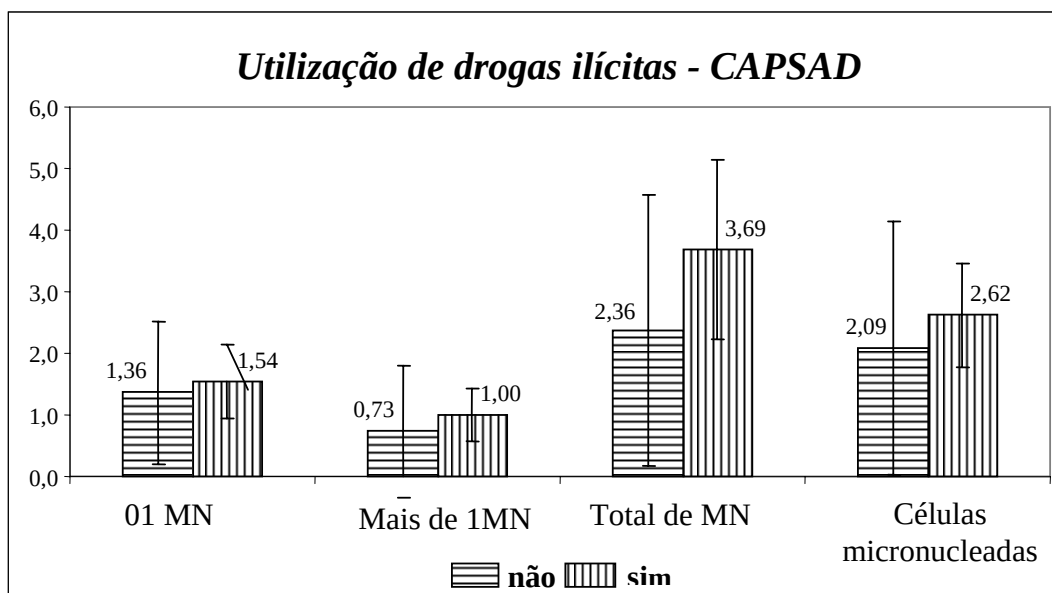


Figura 3 - Frequência de micronúcleos x utilização de drogas ilícitas.

A associação entre o uso diário dos medicamentos avaliados: anti-hipertensivos, antidepressivos e vitamina B e micronúcleos foi realizada pelo do teste de Mann-Whitney (Figura 4). Não foi observado efeito redutor na frequência de MN por ação da vitamina B.

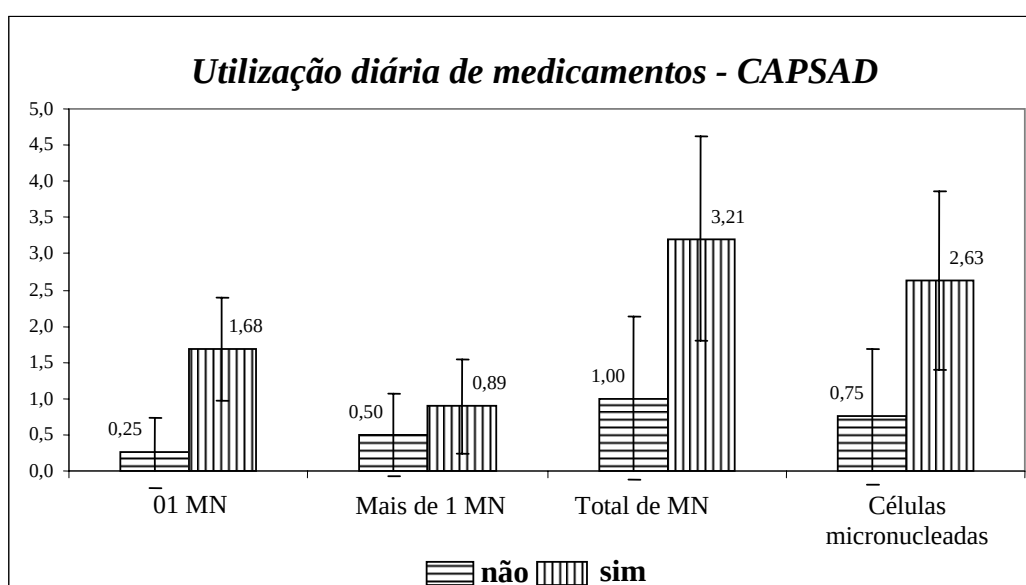


Figura 4 - Utilização de medicamentos e frequência de MN.

Foi verificado que no grupo CAPSAD existe correlação entre MN e os medicamentos antidepressivos (11,1%) e anti-hipertensivos (20,5%), onde pelo fato da correlação ser positiva, indica que pode haver um aumento do número de MN pelo uso dos mesmos. Quanto à utilização da vitamina B, não foi observada influência na frequência de MN com possível ação redutora dos efeitos genotóxicos para as substâncias avaliadas, mesmo com o uso diário ($p=0,59$).

Através da análise cruzada de MN com dados gerais do grupo CAPSAD, foram associados os MN às condições bucais dos pacientes. Esta comparação foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, não revelando associação entre condições bucais e frequência total de MN ($p=0,48$) (Figura 5). Comparando os dois grupos também foi observado que o grupo controle possui melhor condição bucal que o grupo CAPSAD, conforme caracterização das amostras.

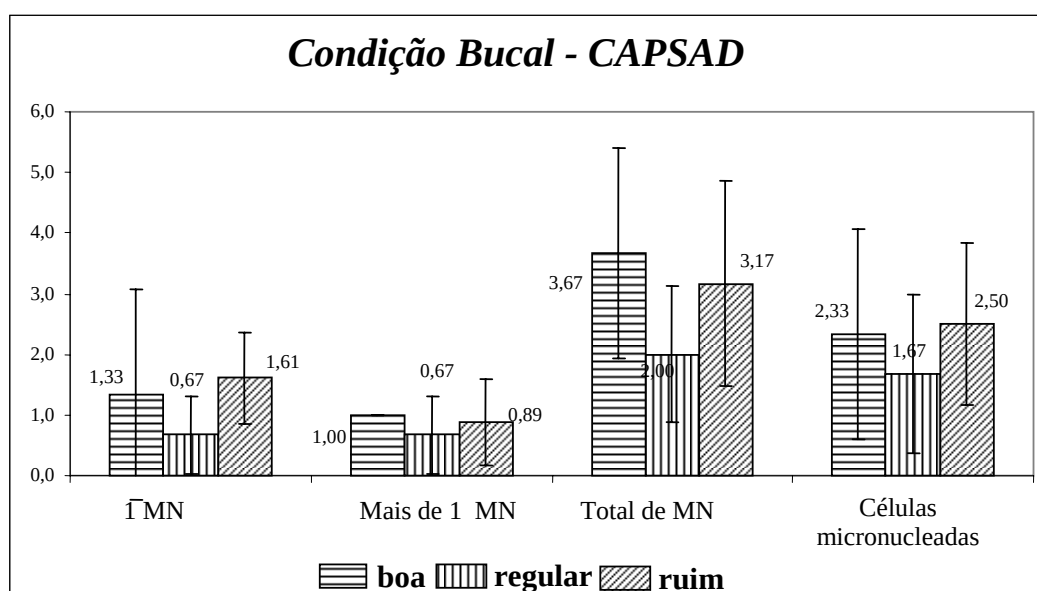


Figura 5 - Condição bucal x frequência de MN.

Embora existam diferenças de MN entre os sexos masculino e feminino, essas diferenças não foram consideradas estatisticamente significantes em nenhum dos dois grupos pelo teste de Mann-Whitney para o total de MN ($p=0,36$).

Como apenas um paciente tinha sido submetido a exames radiográficos por fratura da perna, este dado não pôde ser avaliado.

Também não foi possível avaliar a influência das atividades profissionais exercidas sobre a frequência de MN pela grande diversidade das profissões em ambos os grupos, conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade profissional exercida pelo grupo CAPSAD e controle.

Profissão	CAPSAD		Controle	
	Qtde	%	Qtde	%
Ajudante de pedreiro	1	4,2%	0	0,0%
Artesanato	1	4,2%	0	0,0%
Comerciante	0	0,0%	1	4,2%
Cozinheira	0	0,0%	2	8,3%
Criador de animais	0	0,0%	1	4,2%
Encanador	1	4,2%	0	0,0%
Enfermeiro	0	0,0%	2	8,3%
Estudante	0	0,0%	2	8,3%
Manutenção de Som	1	4,2%	0	0,0%
Militar	0	0,0%	1	4,2%
Pedreiro	2	8,3%	0	0,0%
Pintor	1	4,2%	0	0,0%
Professor Universitário	1	4,2%	3	12,5%
Professora	0	0,0%	1	4,2%
Serralheiro	1	4,2%	0	0,0%
Serviços Admnistrativos	0	0,0%	4	16,7%
Serviços Gerais	14	58,3%	2	8,3%
Seviços Admnistrativos	1	4,2%	2	8,3%
Técnico bioquímica	0	0,0%	1	4,2%
Técnico em histologia	0	0,0%	1	4,2%
Técnico microbiologia	0	0,0%	1	4,2%
Total geral	24	100,0%	24	100,0%

As figuras 06, 07 e 08 apresentam células com apenas 01 MN e células com mais de 01 MN por célula, bem como o resultado obtido pela coloração de *Feulgen*.

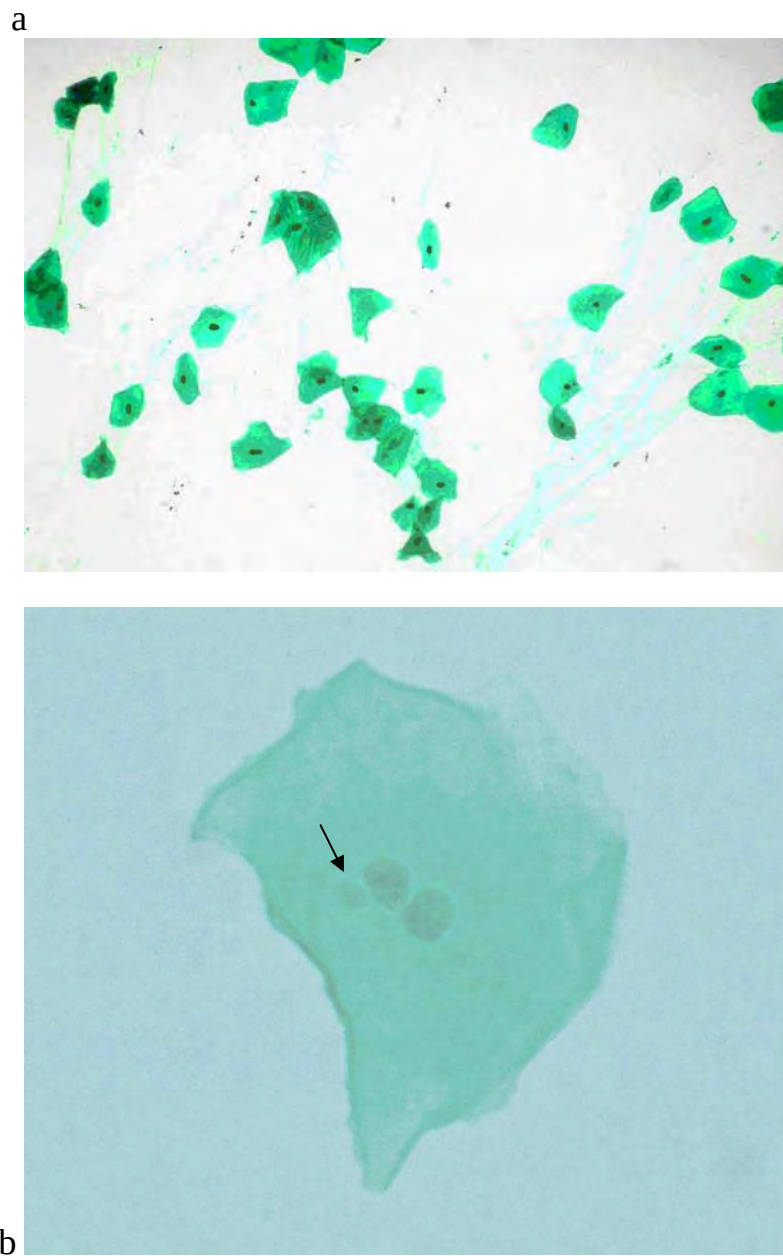
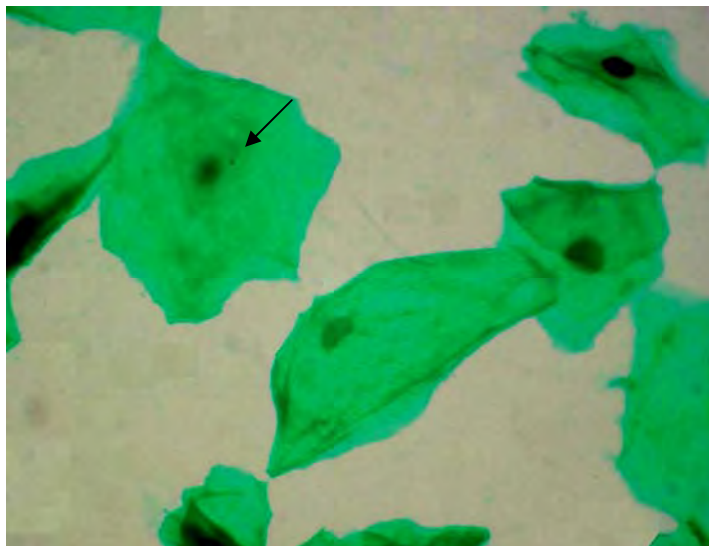


Figura 6: Apresentação das células do grupo CAPSAD a) Esfregaço mostrando células coradas pelo método *Feulgen*, com citoplasma verde e núcleo acastanhado (aumento original de 200x); b) Célula binucleada com apenas 01 MN (aumento original de 1000x).

a



b

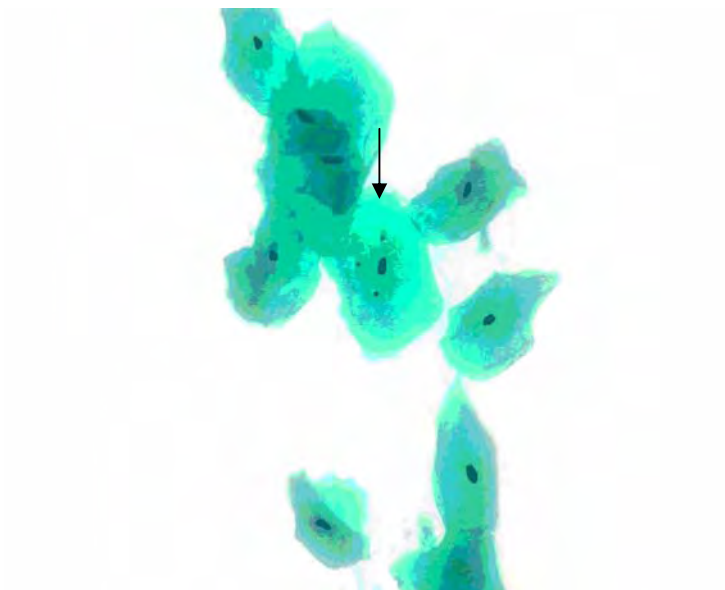


Figura 7: Células do grupo CAPSAD e controle: a) Célula micronucleada do grupo controle com apenas 01 MN (aumento original de 630x); b) Célula micronucleada com 03 MN do grupo CAPSAD (aumento original de 400x).

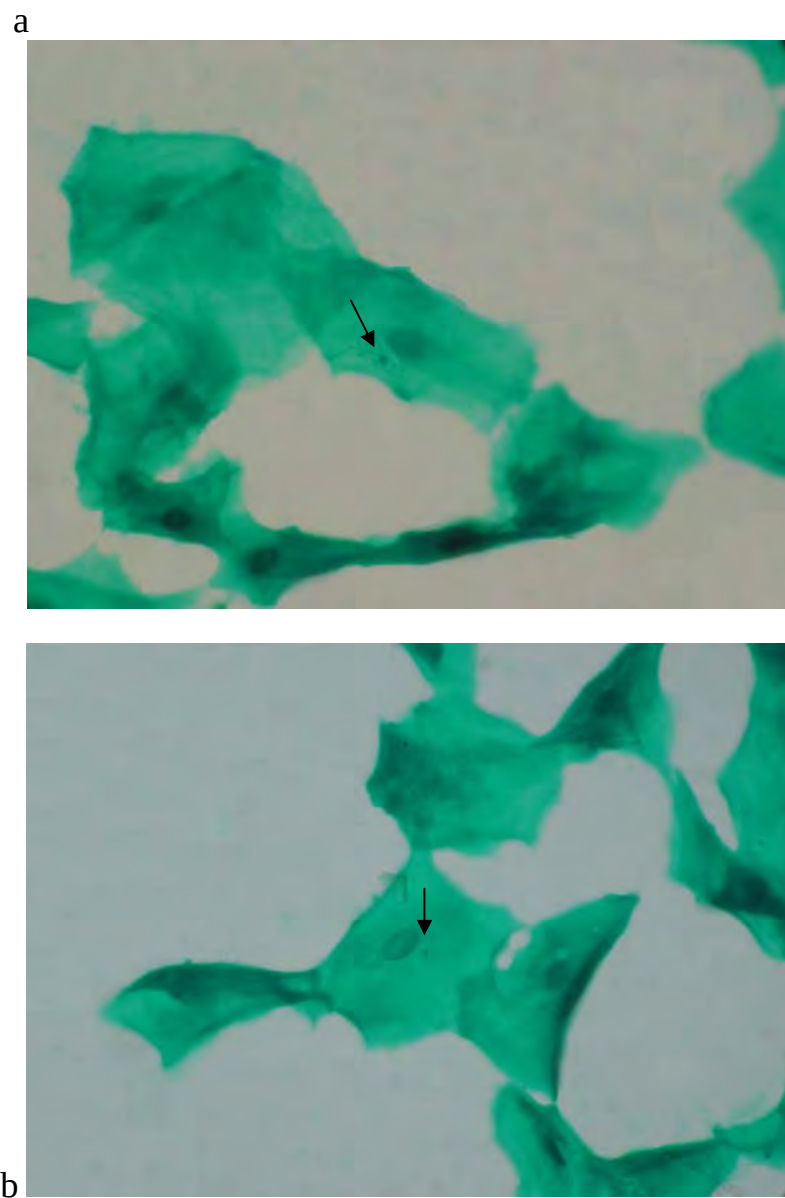


Figura 8: Células micronucleadas do grupo CAPSAD nas figuras a e b célula com apenas 01 MN (aumento original de 630x).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o total de micronúcleos (MN) entre os pacientes do grupo CAPSAD e do grupo controle. Entretanto foi observada pequena superioridade numérica nos pacientes dependentes químicos, indicativa de exposição a agentes genotóxicos (álcool, tabaco e drogas ilícitas).

A análise e cruzamento dos dados obtidos do grupo experimental avaliado, CAPSAD, foi dificultada pela heterogeneidade do grupo quanto à idade e ingestão de agentes químicos genotóxicos que variavam muito em intensidade e frequência.

Os agentes genotóxicos atuam provocando mutações gênicas ou aberrações cromossômicas que afetam os genes envolvidos no controle da diferenciação e proliferação celular, ou ainda no reparo do DNA. A identificação dos danos genéticos representa etapa primordial nas ações de prevenção do CE (Freita et al.²², 2005).

A prevenção da neoplasia depende fundamentalmente da identificação dos fatores associados ao seu desenvolvimento. Diversos são os testes utilizados neste biomonitoramento, destacando-se o teste de MN pela praticidade e baixo custo (Carvalho et al.¹¹, 2002). A avaliação

de MN tem sido utilizada como bom biomarcador de exposição para avaliar danos citogenéticos em estudos de biomonitoramento para grupos populacionais de risco.

No presente trabalho foram avaliados dois grupos: experimental e controle. O grupo experimental incluiu pacientes com dependência química de diversos agentes genotóxicos, dos quais alguns carcinógenos consagrados como o tabaco e o álcool, em tratamento no Centro de Apoio Psicossocial Álcool Drogas (CAPSAD), pertencente ao município de São José dos Campos, recebendo apoio de uma equipe multidisciplinar constituída por médicos, psicólogos, assistentes sociais e enfermeiros.

Este estudo foi conduzido dentro de um programa de reabilitação onde a severidade da dependência era reconhecida pela maior parte dos entrevistados, aspecto que reduz a subestimação das informações em relação ao consumo de diferentes substâncias pelos entrevistados.

Para garantir melhor fidelidade aos resultados do teste de MN foi utilizada coloração DNA específica de *Feulgen* (Freita et al.²², 2000; Carvalho et al.¹¹, 2002; Çelik et al.¹³, 2003; Bohrer et al.⁸, 2004; Cerqueira et al.¹⁴, 2004) conforme preconizado por Nersesyan⁴³, 2006. As colorações de Giemsa (Pastor et al.⁴⁹, 2003; Bloching et al.⁷, 2000; Gabriel et al.²⁴, 2006) e Papanicolaou (Ayyad et al.⁴, 2006) se utilizadas para o teste de MN podem levantar questionamentos quanto aos resultados, pois sendo a mucosa bucal de fumantes mais queratinizada,

corpos de queratina podem vir a ser confundidos com MN. A utilização da técnica de Giemsa ou Papanicolaou por outros pesquisadores pode ser atribuída à maior facilidade de realização de seus procedimentos laboratoriais (Ayyad et al.⁴, 2006).

A padronização da metodologia para hidrólise e coloração dos esfregaços deve ser sempre realizada. Inicialmente foi utilizada a técnica modificada descrita por Bancroft e Stevens⁵ (1989), onde a hidrólise das células era realizada sob aquecimento. Diversas células se romperam e os esfregaços tornaram-se inadequados para avaliação. Possivelmente houve influência do clima tropical do nosso país e as próprias oscilações de temperatura locais que ocorreram no decorrer do trabalho. Através do método descrito por Sarto et al.⁵⁸ (1987) e já testado sob influência do nosso clima por Ramirez e Saldanha⁵³ (2002), foram obtidos esfregaços de melhor qualidade.

O sítio bucal de escolha para investigação do dano citogenético foi o bordo lingual lateral esquerdo, considerado um dos locais de maior incidência do carcinoma epidermóide (CE) (Tommasi⁶⁷, 2002; Ramirez e Saldanha⁵³, 2002; Fontes²¹, 2005). Vuyyuri et al.⁶⁹, 2006; Stich e Rosin⁶⁰, 1983; Reis et al.⁵⁴, 2002 realizaram o teste de MN utilizando células da mucosa jugal como sítio de avaliação e Borher et al.⁸, 2005 utilizaram células do vermelhão dos lábios.

Embora alguns autores utilizem a citologia em base líquida (Gattás et al.²⁵, 2001; Ramirez e Saldanha⁵³, 2002; Martínez et al.³⁴, 2005; Nersesyan et al.⁴³, 2006), neste trabalho foi feita a opção pela

citologia tradicional por raspagem com *cytobrush* do local escolhido (Carvalho et al.¹¹, 2002) pela praticidade da técnica. Bloching et al.⁷, 2000; Çelik et al.¹³, 2003 e Bohrer et al.⁸, 2004 também realizaram a técnica convencional, porém com espátula de madeira, por vezes umedecida (Sarto et al.⁵⁸, 1987). O uso da espátula de madeira pode levar a alterações celulares por desidratação segundo Almeida e Cabral², 1992.

O número total de células avaliadas neste estudo foi de 600 células por paciente. O número de células quantificadas por outros autores nos testes de MN variam de 500 células (Stich e Rosin⁶⁰, 1983; Freita et al.²², 2005), 1000 células (Bohrer et al.⁸, 2005; Cerqueira et al.¹⁴, 2004; Wu et al.⁷⁰, 2004), 2000 células (Gattás et al.²⁵, 2001; Carvalho et al.¹¹, 2002; Martínez et al.³⁴, 2005; Cavallo et al.¹², 2006) a 3000 células (Çelik et al.¹³, 2003).

Durante a avaliação das lâminas foram identificados fenômenos degenerativos como *broken eggs*, *nuclear buds*, cariólise, que usualmente são confundidos com os micronúcleos, os quais não foram contabilizados.

A quantificação dos MN neste estudo para o grupo CAPSAD foi de $3,08 \pm 3,20$, mostrando superioridade numérica para a quantidade total de MN comparado aos pacientes do grupo controle que foi de $2,08 \pm 1,93$. Tal fato ocorreu também com o total de células micronucleadas que para grupo CAPSAD foi de $2,38 \pm 2,57$ e para o grupo controle foi de $1,42 \pm 1,25$. Estatisticamente, apesar da diferença numérica, os resultados não foram considerados significativos.

A frequência do número de células com apenas um MN foi bem maior para o grupo CAPSAD ($1,46 \pm 1,53$) quando comparado ao grupo controle ($0,75 \pm 0,74$). Nos casos onde uma única célula continha mais de um MN a frequência encontrada apresentou valores muito próximos (CAPSAD: $0,88 \pm 1,33$; Controle: $0,75 \pm 0,79$). Segundo Sarto et al.⁵⁸ (1987) este resultado pode ser explicado pela maior formação de MN por rupturas cromossômicas do que os formados por distúrbios do fuso. Isto porque a “quebra” cromossômica é resultante da ação clastogênica direta e intensa dos agentes genotóxicos avaliados como tabaco, álcool e outras drogas consumidas de forma intensa pelo grupo CAPSAD, culminando na formação de um único MN. Este efeito também foi observado por Sarto et al.⁵⁸ (1987), avaliando os efeitos genotóxicos do tabagismo. Os autores encontraram praticamente o dobro de frequência de MN derivados de rupturas cromossômicas para fumantes, enquanto que a frequência de MN derivados de distúrbios do fuso foi semelhante para fumantes e não fumantes, corroborando os resultados da presente pesquisa.

Para os casos de formação de MN por distúrbios do fuso, evidenciado pela presença de mais de um MN por célula, a ação ocorre de maneira indireta e de forma mais suave pelos agentes genotóxicos mencionados ou até pelos indetermináveis aos quais os sujeitos tanto do CAPSAD quanto do grupo controle estão frequentemente expostos, que podem ser: poluição, administração de medicamentos diária ou eventual.

Os fatores relacionados a maior ocorrência de células com apenas um MN no grupo CAPSAD são de difícil identificação. Isto porque a ação dos agentes carcinógenos álcool e cigarro ocorreu de forma mais acentuada nas células com mais de um MN através da quantidade e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas correlacionadas positivamente, o que também ocorreu para a quantidade de cigarros consumida diariamente.

A correlação positiva demonstrada para o total de MN evidencia ação direta e sinérgica para quantidade de cigarros consumidos por dia e quantidade de bebida ingerida de uma só vez e a frequência de MN. Estes achados estão de acordo com os resultados de Freita et al.²² (2005) os quais observaram ação sinérgica entre o álcool e o cigarro sobre a frequência de MN. Stich e Rosin⁶⁰, (1983) verificaram que a frequência de MN para pacientes que ingeriam frequentemente apenas bebidas alcoólicas não diferia do grupo de não fumantes e que não ingeriam bebidas alcoólicas.

A ação carcinogênica do álcool pode ser atribuída a quantidade, como propõe Reis et al.⁵⁴ (2002) que considera níveis superiores a 45ml de etanol por dia como efetivos para ação promotora no processo de carcinogênese. Nesta pesquisa, a quantidade de ingestão diária de bebidas alcoólicas pelo grupo CAPSAD foi em média 830 ml/dia. Este consumo é superior ao ingerido pelo grupo examinado por Sarto et al.⁵⁸ (1987), que foi de 50ml/dia; mas próximo do consumo do grupo avaliado por Stich e Rosin⁶⁰, (1983) que foi de 690ml/dia.

O álcool atua aumentando a permeabilidade da membrana celular das áreas em contato (McCance e Huether³⁶, 1998). Os sítios da mucosa bucal não queratinizados como língua e soalho tornam-se mais permeáveis a agentes carcinógenos.

A ação do álcool sob a permeabilidade é tão eficaz em pouco tempo, que o uso de enxaguatórios bucais contendo pequenas concentrações de álcool pode possibilitar o aumento na frequência de MN conforme os achados de Freitas et al.²² (2005). Por este motivo outros autores incluíram o uso de enxaguatórios bucais em sua avaliação (Sarto et al.⁵⁸, 1987; Cerqueira et al.¹⁴, 2004), no entanto não foi possível fazer qualquer relação entre o uso de enxaguatórios bucais com álcool e a frequência de MN.

A ingestão de bebidas alcoólicas foi constatada como fator incitante para o tabagismo uma vez que os entrevistados do CAPSAD relataram consumir praticamente o dobro de cigarros (aproximadamente 20) quando da ingestão de álcool. O mesmo foi observado por Pavanello et al.⁵⁰ (2005) onde 92,3% dos pacientes avaliados relataram consumir mais cigarros quando estavam ingerindo bebidas alcoólicas.

O potencial genotóxico do cigarro pode ser observado nos resultados obtidos para o grupo CAPSAD que demonstram a existência de uma correlação positiva para o tabagismo e o total de MN quando se considera a quantidade de cigarros fumados/dia, que foi em média 19.9. A relação entre a presença de MN e o consumo de cigarros também foi avaliada por Gabriel et al.²⁴ (2006) que constataram o dobro da

freqüência de MN em pacientes fumantes quando comparados a não-fumantes.

Esta mesma correlação positiva não pode ser observada quanto aos anos de tabagismo. Para interpretação dos resultados do teste de MN torna-se extremamente importante o conhecimento da cinética das células epiteliais (Cerqueira et al.¹⁴, 2004). Em migração pelas camadas epiteliais as células podem sofrer lise e serem eliminadas do epitélio antes de chegar à superfície, como efeito “protetor” do próprio organismo em impedir a proliferação da célula afetada (Speit et al.⁵⁸, 2007). Tais resultados contrastam com a avaliação comparativa de idade entre o grupo CAPSAD e controle onde com passar dos anos houve uma tendência de maior formação de MN nos dois grupos avaliados. O aumento da freqüência de MN com a idade pode ser explicado fisiologicamente, pois as células diminuem o seu *turn over*, seguindo para apoptose ou outro caminho (McCance e Huether³⁶, 1998) reduzindo o potencial de eliminação de células “defeituosas”.

Segundo Ramirez e Saldanha⁵³ (2002) quando uma agressão forte, como o efeito sinérgico de agentes genotóxicos (álcool e tabaco) atinge o núcleo das células da camada basal de maneira intensa, estas células perdem imediatamente o controle apoptótico de forma a desencadear o processo carcinogênico, levando à formação do MN e, por persistência dos agentes mutagênicos formação de mais de um MN. Assim o MN pode ser considerado como representativo de uma das fases do processo de apoptose uma vez que são estruturas nas quais o material

genético torna-se comprometido. Nesta pesquisa foi observado que o grupo CAPSAD possui maior número de células com apenas um MN, indicando que ação do agente mutagênico foi interrompida ou atenuada.

O agente protetor entretanto não pode ser identificado, excluindo a possibilidade inicial do efeito da utilização diária da complexo B, com ação quimioprotetora. Gabriel et al.²⁴ (2006) verificaram que nos pacientes fumantes crônicos existem alterações de formação de vitamina B-6 e vitamina B-12. Entretanto, no grupo CAPSAD a reposição por ingestão de complexo B não afetou a frequência de MN talvez pela regularidade de consumo, já que por vezes alguns pacientes abandonavam o programa de reabilitação; e tempo de ingestão curto. A utilização de outros medicamentos como anti-hipertensivos e antidepressivos esteve associada com a elevação na frequência de MN.

O uso de drogas pelos sujeitos do grupo CAPSAD esteve relacionado com o aumento da frequência de MN. Esta relação não foi exatamente clara, pois os usuários consumiam mais de um tipo de substâncias ilícitas. Não foi encontrado na literatura qualquer trabalho que possa elucidar alterações encontradas nos teste de MN para usuários de tais substâncias, o que requer mais estudos.

A comparação entre os sexos feminino e masculino não revelou diferença, não sendo observado efeito protetor hormonal para o sexo feminino. Tavares⁶⁵ (2004) em estudo citológico da mucosa bucal de mulheres durante o ciclo menstrual concluiu que os fatores hormonais

provocam maior maturação e picnose nuclear em mulheres com ciclo menstrual regular quando comparadas a meninas antes da menarca e mulheres na menopausa.

A condição bucal do grupo CAPSAD foi em grande maioria classificada como ruim (76%). Tal fato mostrou contribuição para a frequência de MN, explicado por Sarto et al.⁵⁸ (1987) pela constante inflamação da mucosa bucal.

Alguns fatores considerados interferentes para contagem de MN não puderam ser avaliados neste trabalho: a exposição à radiação ionizante (Cerqueira et al.¹⁴, 2004; Tolbert et al.⁶⁶, 1992), pois apenas 01 paciente foi submetido a exames radiográficos; e a atividade ocupacional (Çelik et al.¹³, 2003; Gattás et al.²⁵, 2001; Pastor et al.⁴⁹, 2003; Sailaja et al.⁵⁶, 2005), pela diversidade das profissões, impossibilitando a formação de grupos homogêneos e a identificação de um agente genotóxico.

O aumento da frequência de MN em pacientes com dependência química de agentes mutagênicos encontrados neste estudo, não deve ser considerado indicativo da possibilidade do aparecimento de lesões com potencial de transformação maligna, sendo apenas fator que evidencia um aumento na probabilidade da ocorrência de uma alteração genômica viável ou não, que pode revelar a expressão de um oncogene (Stich e Rosin⁶¹, 1982) relacionado à transformação neoplásica.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pela análise quantitativa dos micronúcleos (MN), análise dos dados obtidos através das fichas de coleta e do tratamento estatístico conclui-se que:

- a- a metodologia empregada revelou a necessidade da constituição de grupos mais homogêneos para os fatores intervenientes em pesquisas de biomonitoramento com teste de MN;
- b- embora exista superioridade numérica de MN para o grupo de dependentes químicos, CAPSAD, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo CAPSAD e o grupo controle;
- c- A utilização de antidepressivos e anti-hipertensivos contribuiu para o aumento na frequência de MN;
- d- para os agentes genotóxicos avaliados: álcool, cigarro de filtro e drogas ilícitas foi observada influência na frequência de MN;
- e- para o cigarro e o álcool foi observada influência sobre a frequência de MN mediante quantidade ingerida.

8 REFERÊNCIAS*

1. Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Pancorbo MAM, Aguirre JM. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cancer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Oct.; 10: 95-102.
2. Almeida JD, Cabral LAG. Diagnóstico do carcinoma bucal: uso da citologia esfoliativa como método auxiliar. *Rev Gaúcha Odontol*. 1992 mai/jun, 40(3): 167-70.
3. Almeida JD, Cabral LAG, Brandão AAH. Exfoliative cytology as a diagnostic method in estomatology. *J Dent Res*. 1994, 73(4): 765.
4. Ayyad SB, Israel E, El-Setouhy M, Nasr GR, Mohamed MK, Loffredo CA. Evaluation of Papanicolaou stain for studying micronuclei in buccal cells under field conditions. *Acta Cytol*. 2006 July/Aug.; 50(4):398-402.
5. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. London: Churchill Livingstone; 1994. p.96-8.

*** Baseado em:**

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 março.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

6. Beale LS. Results of chemical and microscopical examination of solid organs and secretions: examination of apudum from case of pharynx and adjacents parts. Arch Med. 1860, 2(1):44-6.
7. Bloching M, Hofman A, Lautenschlager CH, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. Oral Oncol. 2000 Mar.; 36(6): 550-5.
8. Bohrer LP, Sant' Ana Filho M, Paiva RL, Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. Acta Cytol. 2005 May/June; 49 (3): 265-72.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas de incidência e de mortalidade por câncer no Brasil 2005. [texto online].[citado em 04 out 2006] Disponível em : <<http://www.inca.org.br/estimativas/2005/index.asp.link=tabelae stados.asp&UF=SP>>.
10. Buajeeb W, Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. Mut Res. 2007 Dec.; 627: 191–6.
11. 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.

12. Cavallo D, Ursini CL, Carelli G, Iavicoli I, Ciervo A, Perniconi B, et al. Occupational exposure in airport personnel: Characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology*. 2006 Apr.; 223: 26-35.
13. Çelik A, Çavas T, Ergene-Gozukara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*. 2003; 18(5):417-21.
14. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res*. 2004 Jul.; 562: 111-7.
15. Dietz J, Diehel AS, Prolla JC, Furtado CD, Furtado AD. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2000; 46(3): 207-11.
16. Faria PR, Cardoso SV, Nishioka SA, Silva SJ, Loyola AM. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. *Clin Oral Invest*. 2003 Jan.; 7: 46-51.
17. Felefli S, Flaitz CM. The oral brush biopsy: its as easy as 1,2,3. *Texas Dent J*. 2000 Jun.; 117(6): 20-4.
18. Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby FH, Garrington GE. Oral exfoliative estudy. Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surg*. 1972 Jan, 33(1): 61-73.

19. Fontes PC, Sousa FACG, Brandão AAH, Rosa LEB, Almeida JD. Citologia esfoliativa: método de diagnóstico pouco utilizado pelos cirurgiões dentistas. *Braz Oral Res.* 2004; 18: 241 (Pb308).
20. Fontes PC, Sousa FACG, Rosa LEB. Correlação entre o consumo de tabaco e a incidência de câncer bucal. *Rev Bras Patol Oral.* 2004; 3: 132-6.
21. Fontes PC. Avaliação quantitativa das proteínas AgNORs na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes fumantes [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2005. 95f.
22. Freita VS, Lopes MA, Meireles JRC, Reis L, Cerqueria EMM. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Rev Baiana S Pub.* 2005 Jul/Dez.; 29(2): 189-99.
23. Freitas MD, Garcia AG, Abelleira AC, Martins Carneiro JL, Rey JMG. Aplicaciones de la citologia exfoliativa em el diagnóstico del cáncer oral. *Med Oral.* 2004 Jan.; 9: 355-61.
24. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 835-41.
25. Gattás GJF, Cardoso LA, Medrado-Faria MA, Saldanha PH. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup. Med.* 2001 Dec.; 51(2): 107-13.

26. Ghosh P, Basu A, Mahata J, Basu S, Sengupta M, Das JK et al. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *Int J Cancer*. 2006 Dec.; 118(10): 2470-8.
27. Hamurcu Z, Donmez-Altuntas H, Borlu M, Dermitas H, Asçioslu O. Micronucleus frequency in the oral mucosa and lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol*. 2005 Mar.; 30: 565–9.
28. Holland F. Role of the cytopathologist. In: *Cancer medicine*. 5th. London: American Cancer Society. 2000. 17f.
29. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Jan.; 77(1): 101-4.
30. Kassie F, Darroudi F, Kundi M, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Khat (*catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int J Cancer*. 2001; 92: 329–32.
31. King OH, Memphis T. Oral cytology for the general practitioner. *J Am Dent Assoc*. 1963 Apr.; 66: 451-6.
32. Li N, Sun Z, Han C, Junshi C. The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Apr.; 220(4): 218-24.

33. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshal JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Oral Oncol Eur J Cancer*. 1995; 31B(3): 181-7.
34. Martinez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW et al. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol Let*. 2005; 155: 319-27.
35. Mashber S. Early detection, diagnosis and management of oral and oropharyngeal cancer [abstract 2006]. *Cancer*. 1989; 67: 88-9.
36. McCance KL, Huether SE. *Pathophysiology*. 3th. Editora Mosby. 1998; Chap 02.
37. Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MAC, Pereira A, Ribeiro MA, Camargo JLVD et al. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Radiat Res* 2005; 46(2): 135-42.
38. Montero R, Serrano L, Dávila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen*. 2003; 42: 216-22.
39. Montgomery PW, Von Haam EA. Study of the exfoliative cytology of the oral leucoplakia. *J Dent Res*. 1951 Apr; 30(2): 260-4.

40. Moreira LB, Fuchs FD, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo S, Fuchs SC et al. Alcoholic beverage consumption and associated factors in Porto Alegre, a southern Brazilian city: a population-based survey. *J Stud Alcohol*. 1996, 57: 253-9.
41. Nersesyan AK. Nuclear buds in exfoliated human cells [Letter to the editor]. *Mutation Res*. 2005; 588: 64-08.
42. Nersesyan A.K. Does cigarette smoking induce micronuclei in buccal cells? [Letter]. *Am J Clin Nutr*. 2006; 946-7.
43. Nersesyan AK, Kundi M, Atefie K, Shuulte-Herman R, Knasmuller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Oct.; 15(10): 1835-40.
44. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med*. 1990; 19(3): 53-5.
45. Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology: a comparison. *Acta Cytol*. 1992 Sept/Oct.; 36(5): 706-10.
46. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med*. 1997 May.; 26(5): 201-05.
47. Oliveira LU, Lima CF, Issa JS, Fontes PC, Almeida JD. Avaliação comparativa quantitativa de fumantes crônicos e não fumantes [painel acadêmico]. *Anais 25^o Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo*; 2007. São Paulo: CIOSP. p.128-9.

48. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obst Gynecol.* 1941 Aug.; 42(2): 193-206.
49. Pastor S, Creus A, Párron T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperaski S et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis.* 2003; 18(3): 249-58.
50. Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AAH, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol.* 2006; 50(4): 435-40.
51. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MAS, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer- a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 June; 15(6): 1061-77.
52. Queiroz JB, Burim RA, Lima CF, Brandão AAH, Cabral LAG, Almeida JD. Avaliação qualitativa comparativa da citologia esfoliativa com cytobrush e espátula metálica [abstract Ib 209]. *Braz Oral Res.* 2006; 20 (supp.); 115. Trabalho apresentado na Annual SBPQO Meeting.
53. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinoma. *Genet Mol Res.* 2002; 1(3): 246-60.
54. Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Espírito Santo AR, Bôas DSV. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(3): 221-5.

55. Rosin MP, Ragab NF, Anwar W, Salama SI. Localized induction of micronuclei in the oral mucosa of xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Lett.* 1994 June; 81(1): 39-44.
56. Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mut Res.* 2006; 609: 74–80.
57. Sandler HC, Stahl SS. Exfoliative cytology as a diagnostic aid in detection of oral neoplasms. *J Oral Surg.* 1958 Sept; 16(3): 414-8.
58. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987; 2(1): 11-7.
59. Speit G, Schmid O, Frohler-Keller M, Lang I, Triebig G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mut Res.* 2007; 627: 129–35.
60. Stich FH, 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: 305-8.
61. 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: 555-59.

62. 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: 195-99.
63. Strine TW, Okoro CA, Chapman D, Balluz LS, Ford ES, Ajani UA et al. Health-related quality of life and health risk behaviors among smokers. *Am J Prev Med*. 2005; 28(2): 182-7.
64. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi, 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. *Mut Res*. 2004 May; 561: 15-21.
65. Tavares P.G. Avaliação do epitélio bucal, através da citologia esfoliativa em pacientes no pós-menopausa submetidas a reposição hormonal [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista; 2004. 148f.
66. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mut Res*. 1992; 271: 69-77.
67. Tommasi AF. Diagnóstico em patologia bucal. 3^{ed}. São Paulo: Pancast; 2002. Cap.2, p.48-51.
68. Underwood B, Fox K, Nixon PJ. Alcohol and drugs use among vocational dental practitioners. *Br Dent J*. 2003 Sept; 195(5): 265-8.

69. Vuyyuri BB, Isaac M, Kuppala D, Grover P, Ahuja YR. Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to Arsenic. *Environ Mol Mutagen*. 2006; 47: 562-70.
70. Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, Liou SH. Clastogenic effect of cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mut Res*. 2004; 562: 27-38.
71. Wünsch Filho V, Gattás GJF. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. *Cad Saúde Pub*. 2001 Maio/Jun.; 13(3): 467-80.
72. Zimmermann ER, Zimmermann AL. Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res*. 1965; 44(6): 627-31.

Anexo – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – São José dos Campos

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



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **030/2007-PH/CEP**, sobre “ **Avaliação quantitativa de micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos**”, sob a responsabilidade de **CELINA FAIG LIMA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo 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, 19 de março de 2007.

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Apêndice : Ficha de coleta sobre o estudo citológico da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos.

Nome:.....
 Sexo:.....Cor:.....Idade:.....Data nasc...../...../.....
 Residência:.....
 Profissão:.....
 Bairro.....Cidade.....Estado.....Fone.....

1. Você fuma? ☐ sim ☐ não

2. Se fuma, qual o tipo?

☐ cigarro de papel ☐ cigarro de papel sem filtro ☐ cachimbo
☐ charuto

3. Há quanto tempo?

.....

4. Qual a frequência do seu consumo de cigarros?.....

☐ 1 a 3 vezes por mês. Quantos cigarros no total do mês?.....

☐ 1 a 3 vezes por semana. Quantos cigarros no total da semana?.....

☐ 4 a 6 vezes por semana. Quantos cigarros no total da semana?.....

☐ todos os dias. Quantos cigarros no total de cada dia?.....

5. Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?

☐ sim ☐ não

6. Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?

- ☐ 1 ou menos de uma vez por mês ☐ 2 a 3 vezes por mês
☐ 1 a 3 vezes por semana ☐ 4 ou mais vezes por semana

7. Que tipo de bebida você consome quando bebe?

- ☐ cerveja ☐ batida ☐ caipirinha ☐ uísque ☐ vinho
☐ outras.....

8. Quantas doses você consome num dia típico em que está bebendo?

- ☐ 1 a 2 ☐ 3 a 4 ☐ 5 a 6 ☐ 7 a 9 ☐ 10 ou mais

9. Qual a frequência que você consome 6 ou mais doses de bebidas alcoólicas em uma só ocasião?

- ☐ nunca ☐ menos que mensalmente ☐ semanalmente
☐ mensalmente ☐ diariamente

10. Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?

- ☐ sim ☐ não

11. Quando você bebe, consome mais cigarro?

- ☐ sim ☐ não

Quanto a mais você

Consome?.....

12. Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas ?Quais?

- ☐ sim ☐ não

.....

14. Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias ?

- ☐ 1 ou menos de uma vez por mês ☐ uma vez ao dia
☐ 1 a 3 vezes por semana ☐ mais de uma vez ao dia

14. Faz uso de algum medicamento? ☐ sim ☐ não

Qual(is)?.....
.....
.....

15. Foi submetido a exame radiográfico recentemente?

- ☐ sim ☐ não

16.Exame clínico:

Extra-bucal.....
.....
.....

Intra-bucal.....
.....
.....

17. Procedimentos Realizados:

.....
.....
.....
.....

LIMA CF. Quantitative analysis of micronuclei in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from chemical dependent patients. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007. 83f.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate quantitative micronuclei (MN) in the lining oral mucosa from chemical dependent patients. The MN originated from small extranucleus separated from the main one during cellular division. MN may appear before any clinical change is evident. Patients were divided in two groups: 24 chemical dependent patients, from CAPSAD (Centro de Apoio Psicossocial Álcool Drogas) São José dos Campos city and 24 control group patients from FOSJC-UNESP. Inclusion criterion for control group was nonsmoking for last 10 years, alcoholic beverages consumption of 03 units maximum per week, no drugs and no visible clinical alteration of the oral mucosa. Exfoliative cytology from the left side of the border of the tongue and MN test were performed. *Feulgen* staining was used and 600 cells were evaluated for each subject and analyzed under optical microscopies. To determinate the frequency of MN and micronucleated cells the statistical analysis used Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, and Spearman correlation to determinate quantity and years of consumption (IC 95%). The incidence of MN in the CAPSAD group was $3,08 \pm 3,20$ and in the control group was $2,08 \pm 1,93$. The frequency of micronucleated buccal cells was $2,38 \pm 2,57$ to CAPSAD and $1,42 \pm 1,25$ to control group. The results showed that the micronuclei frequency and micronucleated buccal cells of CAPSAD group was increased but not statistically significant different from control group. The daily quantity consumption of cigarette, alcohol and drugs presented effect of MN frequency higher than years of consumption.

KEYWORDS: Cytodiagnosis, oral mucosa, micronuclei, alcohol, smoking, drugs.