



UNIVAG CENTRO UNIVERSITÁRIO
GPA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E ENGENHARIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM INDIVÍDUOS FUMANTES E
MASCADORES DE FUMO (RAPÉ) COMO BIOMARCADOR PARA A
PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER BUCAL

RAPHAEL DE LIMA MESQUITA

VÁRZEA GRANDE – MATO GROSSO

2014



UNIVAG CENTRO UNIVERSITÁRIO
GPA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E ENGENHARIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM INDIVÍDUOS FUMANTES E
MASCADORES DE FUMO (RAPÉ) COMO BIOMARCADOR PARA A
PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER BUCAL

RAPHAEL DE LIMA MESQUITA

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas do UNIVAG - Centro
Universitário, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

VÁRZEA GRANDE – MATO GROSSO

2014

Orientadora

Profa. Dra. Luciana Marques da Silva
UNIVAG Centro Universitário – GPA de Ciências Médicas
Curso de Medicina

MONOGRAFIA APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – GPA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS,
BIOLÓGICAS E ENGENHARIAS

Título: INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM INDIVÍDUOS
FUMANTES E MASCADORES DE FUMO (RAPÉ) COMO
BIOMARCADOR PARA A PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER BUCAL
Autor: RAPHAEL DE LIMA MESQUITA

Banca Examinadora

Profa Dra Luciana Marques da Silva
Orientadora
UNIVAG Centro Universitário – GPA de Ciências Médicas
Curso de Medicina

Profa Dra Rosa Maria Elias
Examinadora
UNIVAG Centro Universitário – GPA de Ciências da Saúde
Curso de Biomedicina

Profa MS Edilaura Nunes Rondon
Examinadora
UNIVAG Centro Universitário – GPA de Ciências da Saúde
Curso de Fisioterapia

Várzea Grande-MT, 2 de julho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário UNIVAG, junto com o GPA de Ciências Agrárias e Biológicas, em especial à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, pelo apoio e disponibilidade de atendimento.

À Profa Dra Luciana Marques da Silva que muito me apoiou em diversas situações durante a graduação, pela troca de conhecimentos e exemplo de profissionalismo, determinação e amizade.

Ao Laboratório de Mutagênese da UNIFRAN, pelo acolhimento quando da realização do meu estágio, disponibilizando a estrutura para a sua consecução.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese do Univag que muito me ajudaram na coleta e processamento das amostras.

Aos meus amigos de sala pela longa vivência e risadas nas aulas de Evolução e Zoologia, principalmente aos meus amigos Sulyvan e José Luiz que muito me apoiarem e pelos longos e infinitos debates, mas efetivamente pela amizade adquirida e consolidada

À Profa Dra Ermelinda Maria De Lamonica Freire e todos os mestres, em especial aos Professores Luiz Antonio Solino Carvalho e Edson Massoli Viana Junior, exemplos de empenho por uma Educação de qualidade e incentivo à busca pelo conhecimento.

Às pessoas que constituíram a amostra da pesquisa, sem as quais nada disso teria sido possível.

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Silvana e Eldair, pelo apoio
e conselhos dados desde a minha infância
até hoje.

RESUMO

A instabilidade genômica é um dos principais aspectos da mutagênese e está associada com a carcinogênese. Um aumento da permeabilidade da mucosa bucal facilita a passagem da N-nitrosornicotina, uma das nitrosaminas carcinogênicas do cigarro e, ainda, os resíduos deixados entre bochecha e língua, no ato de mascar o fumo, apresentam um contato mais prolongado, favorecendo, a ação das substâncias cancerígenas do tabaco sobre a mucosa bucal. Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou fragmentos não incorporados ao núcleo na divisão celular e que apresentam relação com agentes genotóxicos, podendo ser detectados nas células esfoliativas dos epitélios. Com o objetivo de determinar a presença e a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares, foram analisadas 112 amostras de voluntários, divididos em 4 grupos: sendo o GE1 composto por 30 indivíduos usuários de cigarro e bebidas alcoólicas, GE2 composto por 30 usuários de cigarro; GE3 composto por 22 mascaradores de fumo (rapé) e Grupo controle (GC) composto por 30 indivíduos abstêmios do uso de bebida e cigarros. Os resultados obtidos indicaram que o GE1 apresentou maior número de indivíduos com frequência de micronúcleos de aproximadamente 74% entre dois e seis MN por indivíduos, seguido do GE2 que apresentou 72% entre um e cinco MN, e GE3 com 87% dos indivíduos com frequência entre um e quatro MN. O GC apresentou 88% de MN entre zero e três por indivíduo. Quanto às alterações nucleares: brotos nucleares, núcleos interligados, células binucleadas, apoptose e necrose, observou-se que a variação de presença nas células foi de 94% do grupo controle, com variação entre zero a três alterações, para 73%, 90% e 89% para os demais grupos, respectivamente, com variação de frequência de zero a cinco alterações. As alterações indicativas de apoptose são potenciais marcadores genéticos na prevenção do câncer, uma vez que apontam efeitos genotóxicos, destacando os resultados neste trabalho, em que a incidência de apoptose foi elevada em todos os grupos. A análise estatística revelou associação significativa entre o hábito de fumar e a presença de micronúcleos e outras alterações nucleares, demonstrando a importância desse teste como biomarcador para o câncer bucal.

Palavras-Chave: Fumantes, alterações nucleares, genotóxicos, necrose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos do tabaco na carcinogênese oral.	13
Figura 2- Mecanismo de formação do Micronúcleo.	14
Figura 3 - Após sofrer danos no DNA, a célula que não conseguir repará-lo pode seguir diretamente para a necrose, apoptose ou expressar o dano na forma de MN, PNP ou BrN.	15
Figura 4 - Alterações nucleares degenerativas que devem ser computadas adicionalmente a micronúcleos.	16
Figura 5 - Tipos de bebidas do GE1.....	22
Figura 6 - Anos de consumo de bebidas do GE1.....	22
Figura 7 - Tempo em anos do consumo de cigarro do GE2.....	22
Figura 8 - Tempo em anos do consumo de rapé do GE3.....	23
Figura 9 - Média de MN entre os grupos.....	23
Figura 10 - Outras alterações no GE1.....	26
Figura 11 - Outras alterações no GE2.....	26
Figura 12 - Outras alterações no GE3.....	265
Figura 13 - Outras alterações no GC.....	265

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos gêneros entre os Grupos.	21
Tabela 2 - Comparação da frequência de MN entre os grupos.....	24
Tabela 3 - Comparação da frequência de outras alterações entre os grupos.	27
Tabela 4 - Frequência de MN nos grupos.....	25
Tabela 5 - Frequência de alterações nos grupos.	25

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
DEDICATÓRIA
RESUMO
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 O Teste de Micronúcleo em mucosa oral	18
2.2 Amostra.....	19
2.3 Caracterização da amostra	19
2.4 Análise estatística	19
2.5 Análise Citológica	20
2.6 Aspectos éticos	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Características da amostra	21
3.2 Comparação entre os grupos.....	23
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se verificado um aumento na quantidade de pessoas que fumam e/ou mascam fumo (rapé).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês “International Agency for Research on Cancer”), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo (INCA, 2014).

No Brasil, em 2012, cerca de 9.990 novos casos de câncer da cavidade oral, em homens, e 4.180, em mulheres foram diagnosticados. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e quatro a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

De acordo com o INCA (2014), houve um aumento de 1.290 casos de câncer de boca, em homens, e uma redução de 190 casos, em mulheres. O que indica que a população masculina continua aumentando o consumo de substâncias carcinogênicas.

A maioria dos casos de câncer (80%) é relacionada à fatores externos, ambientais, e dependem da intensidade e duração da exposição das células a esse agente causador, sendo um dos principais fatores a exposição à fumaça do tabaco, em que já foi detectada mais de 60 substâncias carcinogênicas, além de pesticidas e elementos radioativos. A alteração que ocorre na mucosa bucal decorre da presença dessas substâncias associadas à exposição contínua ao calor despreendido pela combustão do fumo ou o fato de mascá-lo (SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

De acordo com esses autores, vários produtos da combustão do ato de fumar tabaco são carcinogênicos, dentre os quais os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares que são os predominantes.

Um aumento da permeabilidade da mucosa bucal facilita a passagem da N-nitrosornicotina, uma das nitrosaminas carcinogênicas do cigarro e, ainda, os resíduos deixados entre bochecha e língua, no ato de mascar o fumo, apresentam um contato mais prolongado, favorecendo, a ação das substâncias cancerígenas do tabaco sobre a mucosa bucal, conforme Silvestre; Jeronimo (2007).

O tabagismo é um fator de risco independente para o desenvolvimento do câncer bucal, aumentando o risco relativo em 7 a 10 vezes em comparação com os não

fumantes (LEITE et al., 2005). O aumento do risco de aparecimento do câncer bucal, associado ao tabagismo, tem uma relação que varia tanto com a intensidade do consumo de cigarros por dia, como pela duração em longo prazo do hábito de fumar. (DANESI; MARCONATO, 2000).

Células bucais são a primeira barreira para a inalação ou ingestão e são capazes de metabolizar carcinogêneos centesimais (SPIVAK et al, 2004; AUTRUP, et al., 1985). Aproximadamente 90% dos cânceres humanos se originam de células epiteliais (ROSIN, 2002). Portanto, pode-se argumentar que as células epiteliais orais representam um alvo preferencial para o início de eventos genotóxicos induzidos por agentes carcinogênicos que entram no organismo por inalação e ingestão (HOLLAND et al., 2008)

O câncer é considerado doença genética, uma vez que resulta de alterações (mutações gênicas e aberrações cromossômicas) em genes que estão comprometidos com o controle da proliferação e diferenciação celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor) e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores). A figura 1 apresenta o esquema resumida da formação de carcinogênese da cavidade oral, com indicação de alterações genéticas relacionados ao uso do tabaco.

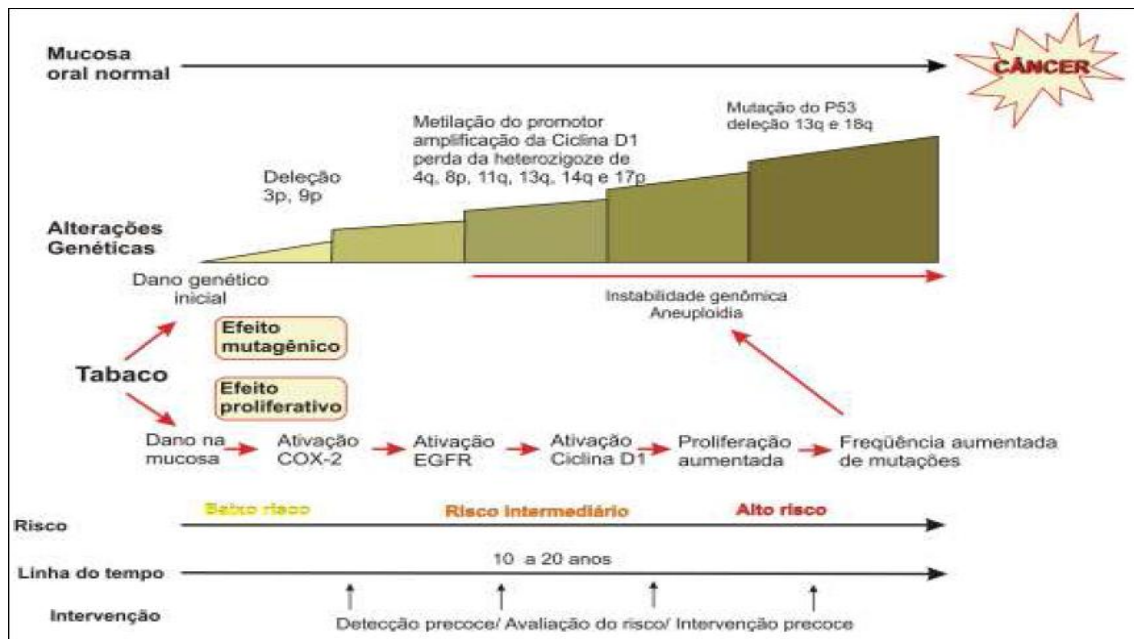


Figura 1 - Efeitos do tabaco na carcinogênese oral.

Fonte: Miranda, 2006.

Durante a divisão celular o material genético contido no núcleo se replica e divide-se igualmente pelas duas células filhas recém formadas. Durante este processo, mais especificamente na duplicação e divisão celular, podem ocorrer erros, causados

por agentes genotóxicos, que levam a danos cromossômicos. Esses eventos podem levar a separação desigual do material genético e, existindo material que é excluído ou que não se incorpora corretamente no núcleo da célula-filha, origina-se um núcleo de menores dimensões designado de micronúcleo (MN) (FENECH, 2002). É importante ressaltar que os MNs são formados durante a mitose independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo (Figura 2).

Por esse motivo, os danos causados no DNA, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo da divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de MNs entre populações de células em divisão só seria seguro quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997).

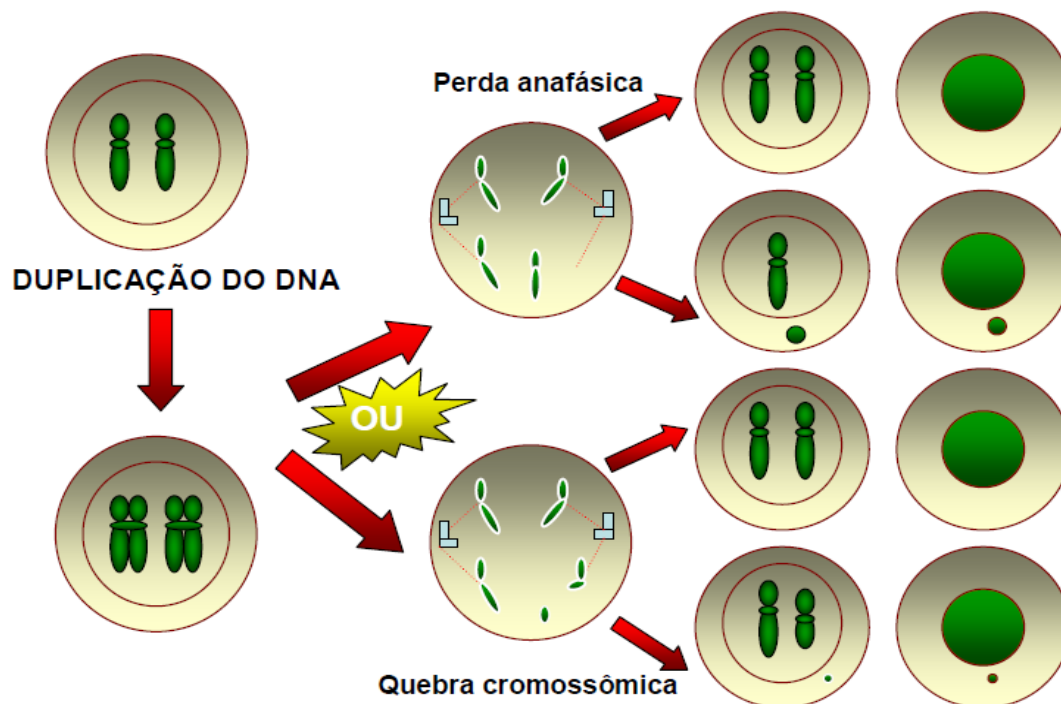


Figura 2- Mecanismo de formação do Micronúcleo.
Fonte: Rocha, 2011.

Desta forma, a detecção de micronúcleos representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho, sendo considerados como mutações que são transmitidas às células, pois o dano genético se manifesta nas células filhas.

A eficácia do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral para a detecção de efeitos genotóxicos consequentes à exposição à mutágenos tem sido muito

reconhecida, apontando este teste como valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese oral, vez que frequências elevadas de micronúcleos indicam uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer, além que inibirem a morte celular programada (SARAN et al., 2008).

Além disso, também é possível, ainda, aferir danos através da presença de outros biomarcadores, como: pontes nucleoplasmáticas (PNP) biomarcador de rearranjo cromossômico, brotos nucleares (BrN) biomarcador de amplificação gênica. (FENECH, 2007). (Figura 3).

- Brotos nucleares – Corpos arredondados de coloração semelhante a do núcleo, lembrando um MN, porém mantendo-se ligado ao núcleo por um filamento de cromatina. O significado e sua presença permanece incerto, mas segundo alguns autores os brotos poderiam ser precursores dos MN.

- Apoptose é induzida por mutágenos tanto de natureza física quanto química, atuando como mecanismo de proteção do câncer eliminando células com danos genéticos. Sua ocorrência em níveis elevados pode ser evidência de insulto genotóxico e estaria iniciando o processo de transformação.

- Necrose é indicativa de citotoxicidade podendo estar associadas à promoção de câncer via estimulação da proliferação celular (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

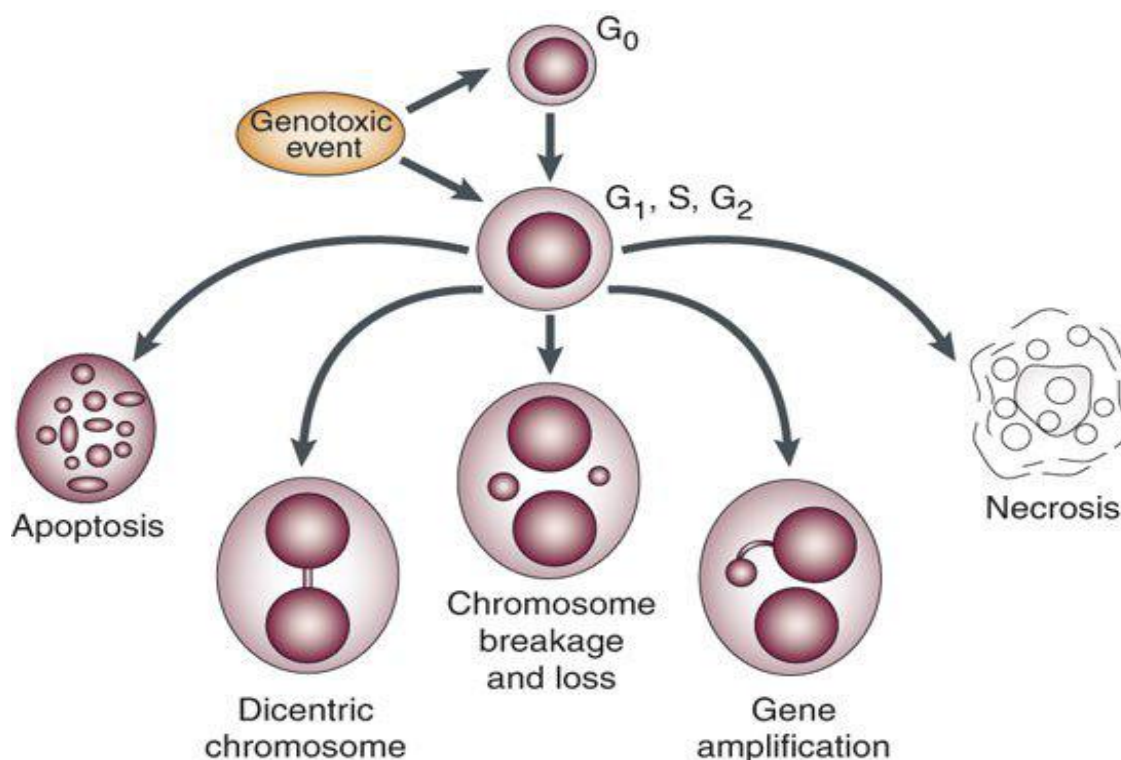


Figura 3 - Após sofrer danos no DNA, a célula que não conseguir repará-lo pode seguir diretamente para a necrose, apoptose ou expressar o dano na forma de MN, PNP ou BrN.

Fonte: Fenech, 2007.

Tolbert, Shy e Allen, (1991, 1992), sugeriram que outras alterações nucleares deveriam ser incluídas no computo, quando se realiza o Teste de Micronúcleo, que são próprias de um epitélio em renovação. Esses fenômenos sofrem influência de processos inflamatórios, do processo de reparo e até mesmo da intensidade da raspagem. Essas alterações, às vezes, se assemelham morfológicamente aos MNs, e não considerá-las poderia levar a interpretações incorretas (figura 4).

- Cromatina condensada/núcleo picnótico – Correspondem ao aumento de intensidade da coloração do núcleo e redução de volume respectivamente. São fenômenos próprios da diferenciação e maturação epitelial, processo que culmina com a morte celular e descamação. Sua ocorrência aumenta frente à injúria celular, como a resultante do trauma crônico ou consumo de fumo.
- Células binucleadas - Provavelmente não relacionadas a alterações do DNA, mas parecem estar envolvidas com atraso da divisão celular.
- Cariorrexe - Fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto. É uma das etapas da morte celular, seja por apoptose, seja por necrose.
- Cariólise - Dissolução do núcleo caracterizada pela sua ausência. Etapa do processo de morte celular por necrose.

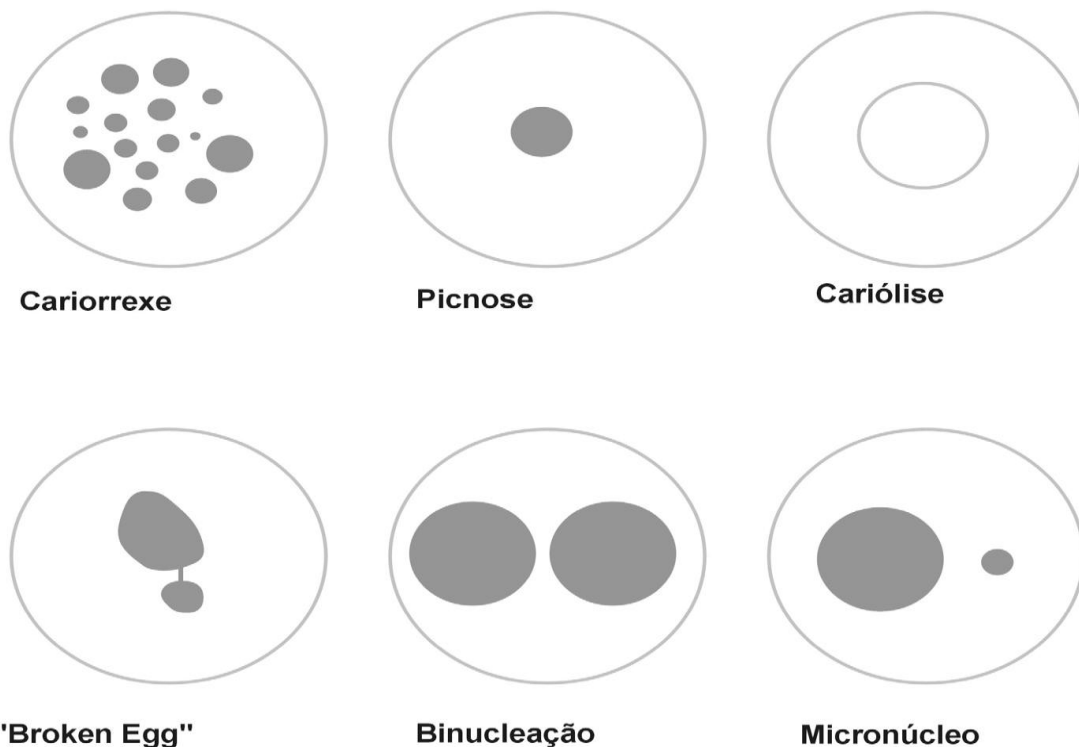


Figura 4 - Alterações nucleares degenerativas que devem ser computadas adicionalmente a micronúcleos.
Fonte: Tolbert, Shy, Allen. (1992).

O objetivo neste estudo foi identificar, através do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral, a ocorrência de danos cromossômicos em pessoas fumantes, não fumantes e mascadores de fumo, visando avaliar a eficácia de micronúcleos como biomarcadores de risco para o desenvolvimento do câncer oral nestes indivíduos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 O Teste de Micronúcleo em mucosa oral

A metodologia aplicada para obtenção das células da mucosa oral é um procedimento não invasivo (raspagem superficial da mucosa) e foi realizado com material descartável (SWAB) que não oferece risco de lesão e/ou contaminação aos voluntários.

Os indivíduos fizeram a assepsia da boca com água destilada por três vezes, e em seguida foram utilizados “swabs” para a esfoliação das células da mucosa oral, imergindo em solução salina a 0,9%, repassando novamente na mucosa e colocando-as em tubos falcon com 5mL de soro fisiológico a 0,9%. Após as transferências das amostras a tubos de ensaios, centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, deixando apenas 0,5mL, preservando o “Pellit”, e logo em seguida foi adicionado 5mL de fixador metanol e ácido acético (3:1) e deixadas 20 minutos para fixação. Após, colocou-se novamente na centrífuga, descartou-se o sobrenadante e gotejou-se o restante do material em lâminas geladas, úmidas e limpas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com a técnica de May-Grünwald Giemsa (MGG), por 20 minutos e submetidas à análise microscópica. As lâminas coradas pela reação de May-Grünwald Giemsa serviram para a avaliação da frequência de micronúcleos. Foram analisadas 2.000 células, distintas e não justapostas.

Foram considerados micronúcleos, os fragmentos com tamanho entre 1/16 e 1/3 dos núcleos principais, com coloração semelhante à coloração dos núcleos principais, em emissão de refringência e sem sobreposição a qualquer um dos núcleos principais (FENECH, 2000).

Em relação às outras alterações nucleares, considerando o critério de classificação proposto por Tolbert, Shy e Allen, 1992, e as modificações sugeridas por Manelli-Oliveira, 2000, optamos por pesquisar o porcentual de presença e de frequência de MN e das seguintes alterações nucleares: brotos nucleares, apoptose, necrose e células binucleadas.

As lâminas coradas pela reação de May-Grünwald Giemsa serviram para a avaliação da frequência de micronúcleos. Foram analisados um total de 2000 células por indivíduo para se obter o resultado total de cada grupo amostral.

2.2 Amostra

O grupo amostral incluiu 112 indivíduos, 47 do sexo feminino e 75 do sexo masculino, na faixa etária de 18 a 73 anos, distribuídos em quatro grupos, sendo:

- * Grupo exposto 1 (GE1), composto por 30 indivíduos usuários de cigarro e bebidas alcoólicas;
- * Grupo exposto 2 (GE2), composto por 30 usuários de cigarro;
- * Grupo exposta 3 (GE3), composto por 22 mascadores de fumo (rapé); e
- * Grupo controle (GC), composto por 30 indivíduos abstêmios do uso de bebida e cigarros.

2.3 Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada pela aplicação de questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, hábito de fumar, mascar fumo e ingerir bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, exposição à radiação e a outros genotóxicos.

Essa composição dos grupos serviu para realizar o levantamento da incidência de micronúcleos referente às características de cada grupo descrito, sendo caracterizado por voluntários de ambos os sexos e idade, pareando ± 5 com o grupo controle. Assim, calculou-se a influência do consumo de álcool e tabaco, sendo em cigarro ou em rapé sobre a frequência de MN.

2.4 Análise estatística

A análise das diferenças entre os grupos, feita com o uso do Teste de Análise de Variância (ANOVA). Os resultados e a análise estatística foram realizados pelo teste t pareado para comparações das alterações dentro do mesmo grupo. Para análise estatística e produção dos gráficos, foi utilizado o *software* Graph Pad Prism (v.5.1) para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) e valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

2.5 Análise Citológica

Estudos da década de 1980 (STICH, et al., 1982, 1983) sugeriam um número relativamente baixa número de células (500). Posteriormente, em 1991, Tolbert, Shy e Allen sugeriram pelo menos 1000 células, com um aumento de 2000-3000 se menos de 5 micronúcleos foram observados após a contagem 1000 células.

Cerca de 60.000 células foram analisadas em cada grupo, exceto no GC que foram analisadas 44.000 células.

2.6 Aspectos éticos

Todos os indivíduos voluntários para o trabalho foram previamente informados verbalmente e por escrito, pelo pesquisador, aceitando participar do estudo, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em duas vias, onde uma cópia ficou com o voluntário e outra com o pesquisador para futura separação dos grupos

Este trabalho foi submetido ao CONEPE e aguarda aprovação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Teste de Micronúcleo tem sido largamente empregado para avaliação dos efeitos genotóxicos do consumo do tabaco sob outras formas que não o cigarro industrializado e os resultados obtidos são muito consistentes e é uma forte ferramenta de biomarcador de alteração nucleares.

3.1 Características da amostra

3.1.1 Idade

As médias de idade calculados para os Grupos Expostos (GE) 1, 2 e 3 e para o Grupo Controle (GC) foram, respectivamente, 27.6, 40.9, 19.8 e 35, com variação de 0,27, significativa: R squared: 0,1910 ($P < 0,05$).

3.1.2 Gênero

Dados relativos à distribuição dos gêneros entre os grupos são apresentados na Tabela 1. A análise das diferenças de gênero entre os grupos, feita com o uso do Teste de Análise de Variância (ANOVA) revelou que não há diferença significativa na distribuição de homens e mulheres entre os grupos: R squared: 0,03114 ($P < 0,05$).

Tabela 1 - Distribuição dos gêneros entre os Grupos, onde GE1 (fumantes e alcoólicos), GE2 (fumantes), GE3 (mascadores de fumo) e GC (abstêmios).

Gênero do Grupo	GE1	GE2	GE3	GC
Masculino	22	13	21	9
Feminino	8	17	1	21
Total	30	30	22	30

3.1.3 Consumo de cigarros e bebidas alcoólicas

Baseado nos gráficos 5, a bebida mais consumida em GE1 foi a cerveja, depois o Whisky e depois o vinho, tendo maior tempo de consumo de 0 a 5 anos. Acredita-se que esses dados sejam devido a média amostral que é de 27,6, sendo voluntários jovens (figura 6)

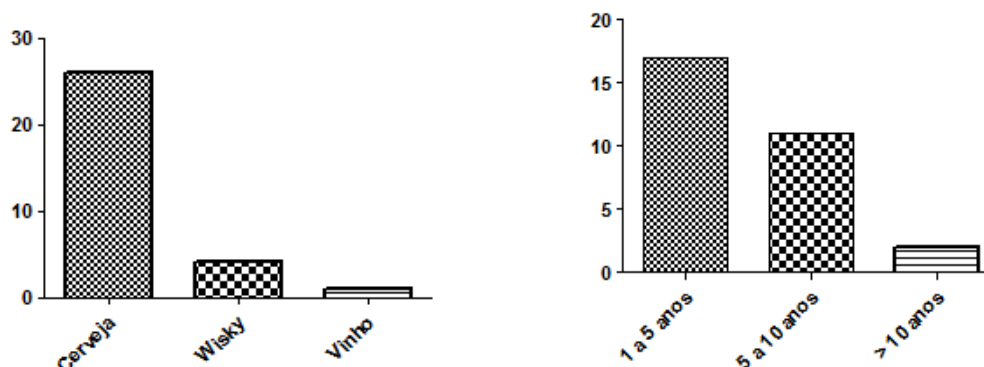


Figura 5 - Tipos de bebidas do GE1.

Figura 6 - Anos de consumo de bebidas do GE1.

3.1.4 Fumantes

Em GE2 a média foi um pouco acima de 40 anos, com média de consumo de cigarro de 16, 92 por dia. Em relação ao tempo de consumo de cigarro, nota-se que o maior tempo do hábito de fumar foi de 1 a 10 anos, seguido de 10 a 20 anos, e ao gênero, ambos ficaram iguais. (Figura 7).

3.1.4 Mascadores

No GE3, a média de idade foi relativamente baixa em comparação com os demais grupos, aproximadamente 19 anos, assim como o maior tempo do consumo do rapé de 1 a 2 anos. (Figura 8).

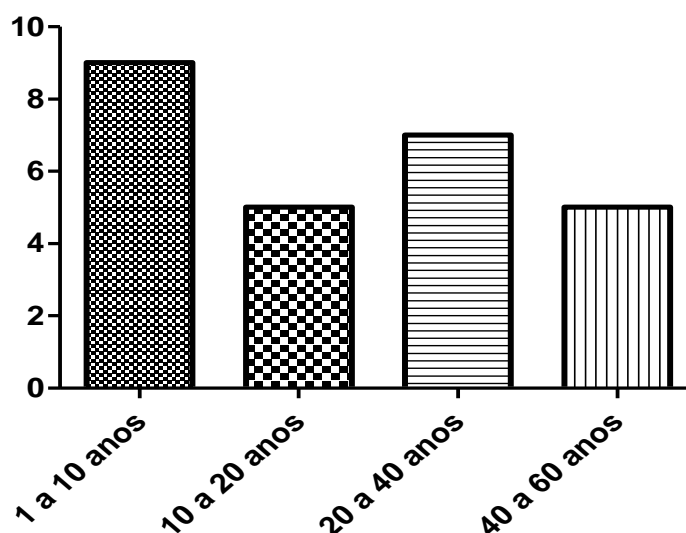


Figura 7 - Tempo em anos do consumo de cigarro do GE2.

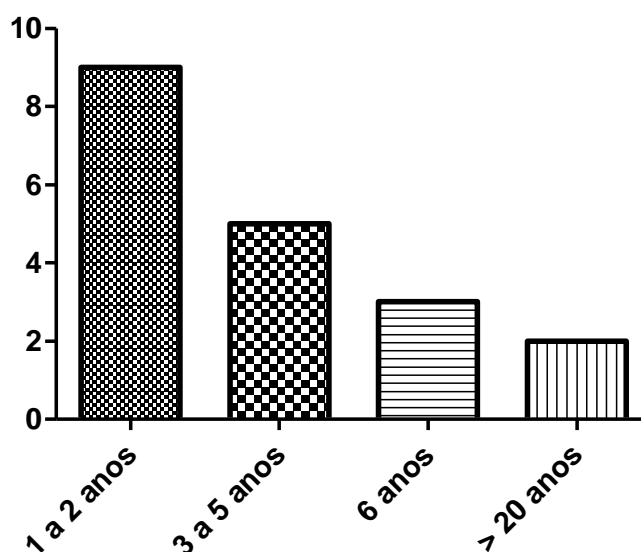


Figura 8 - Tempo em anos do consumo de rapé do GE3.

3.2 Comparação entre os grupos

A média de micronúcleos nas células analisadas dos indivíduos dos grupos GE1, GE2, GE3 e GC foram, respectivamente 5, 26; 4, 5; 3,18; e 2, apresentados na figura 9.

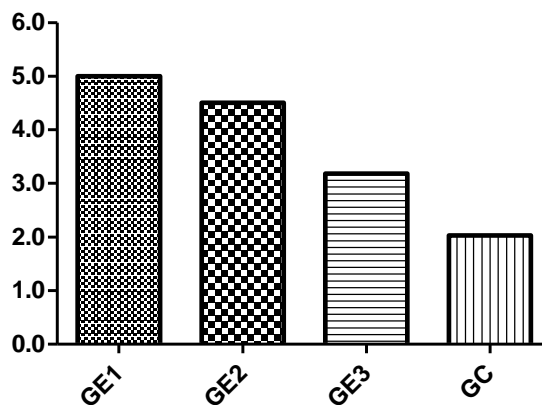


Figura 9—Médias de MN entre os grupos.

Destaca-se a diferença significativa na comparação do GE1 com o controle. As variações mais significativas para MN ocorreram entre os grupos expostos 1 e 2, quando comparados com o grupo controle, o que confirma os resultados obtidos por Martins e Boschini Filho (2003), o mesmo para outras alterações, em que se destaca o aumento da frequência de apoptose em todos os grupos estudados.

Stich et al., 1982, investigando a importância do teste do micronúcleo na avaliação da exposição de indivíduos aos agentes genotóxicos químicos - álcool etílico e tabaco - nas formas isolada e associada, demonstraram que a frequência de micronúcleos se apresenta maior na forma associada.

Em 1983, esses mesmos autores observaram que a frequência de micronúcleos em indivíduos fumantes se apresentava maior em relação a dos não-fumantes, mediante teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. Eles, ainda, avaliando também a ocorrência de micronúcleos entre consumidores de bebidas alcoólicas e/ou de tabaco descreveram maior ocorrência dessas estruturas apenas nos indivíduos em que havia concomitância destes hábitos, corroborando com o resultados aqui obtidos.

A ocorrência de apoptose entre homens e mulheres, em cada grupo amostral, foi estatisticamente mais elevada nos indivíduos do sexo masculino.

Possivelmente, este resultado se deve ao maior número de cigarros consumidos por dia e ao maior teor alcoólico das bebidas consumidas, ambos pelos homens. Estudos objetivando especificamente avaliar os efeitos genotóxicos desses hábitos poderão resultar em dados mais conclusivos a este respeito.

Em estudo similar, Meireles (2003) observou maior ocorrência de micronúcleos entre consumidores de tabaco e de bebidas alcoólicas quando comparados a não-fumantes e abstêmios dessas bebidas.

A análise realizada com o Teste T, mostrou que o número de micronúcleos nos indivíduos dos grupos expostos GE1 e GE2 é significativamente maior do que o observado nos indivíduos do grupo controle (GC), no entanto o número de micronúcleos nos indivíduos do grupo GE3 não diferiu estatisticamente do GC. O número de micronúcleos também não diferiu estatisticamente quando comparados entre os grupos GE1 vs GE2, GE1 vs GE3, ocorrendo diferença significativa entre o GE2 vs GE3. Dados relativos a essa análise são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação da frequência de MN entre os grupos.

Grupos	Diferença	Valor
GE1 vs GC	2.967 ± 0.4510	0,4273
GE2 vs GC	2.367 ± 0.5405	0,2484
GE3 vs GC	1.148 ± 0.368	0,0152
G1 vs G2	0.600 ± 0.633	0,1308
G1 Vs G3	1.818 ± 0.534	0,0013
G2 Vs G3	1.218 ± 0.638	0,0620

Analisamos o percentual de frequência de micronúcleos nas células da mucosa bucal dos grupos, observamos que 87% do GC apresentaram frequência variando entre zero e três micronúcleos, enquanto 67% do GE1 apresentou frequência variando entre um e cinco micronúcleos em 2000 células analisadas por indivíduo, e os outros grupos apresentaram frequência de 71% e 96%, respectivamente. (Tabela 5).

Tabela 3 - Frequência de MN nos grupos.

Frequência de MN	GE1		GE2		GE3		GC	
	Presença	% Presença	Presença	% Presença	Presença	% Presença	Presença	% Presença
0	0	0	1	3	0	0	2	7
1	1	3	4	13	2	9	10	33
2	2	7	5	17	7	32	7	23
3	5	17	6	20	4	18	7	23
4	5	17	4	13	5	23	4	13
5	7	23	3	10	2	9	0	0
6	3	10	0	0	2	9	0	0
7	2	7	4	13	0	0	0	0
8	2	7	2	7	0	0	0	0
9	3	10	1	3	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	30	100	30	100	22	100	30	100

Da mesma forma, investigando a variação do percentual de frequência das alterações entre os grupos, observamos que a variação do percentual da frequência dessas alterações observamos que 94% dos não-fumantes e abstêmios apresentaram a frequência variando entre zero e três, enquanto os outros grupos apresentaram, respectivamente, 73%, 90% e 89% de frequência variando entre uma e cinco alterações nucleares em 2000 células analisadas por indivíduo (Tabela 6).

Tabela 4 - Frequência de alterações nos grupos.

Frequência de MN	GE1		GE2		GE3		GC	
	Presença	% Presença	Presença	% Presença	Presença	% Presença	Presença	% Presença
0	26	22	28	24	22	28	43	37
1	16	13	27	23	17	19	33	29
2	10	12	27	23	10	11	23	20
3	14	9	15	13	8	9	9	8
4	14	9	6	5	10	11	6	5
5	9	8	4	3	8	9	1	1
6	7	6	4	3	4	4	0	0
7	12	10	6	5	2	2	0	0
8	6	5	1	1	3	3	0	0
9	6	5	1	1	4	4	0	0
10	1	0,8	0	0	0	0	0	0
Total	30	100	30	100	22	100	30	100

Para etilistas crônicos, os riscos para câncer bucal aumentam em 8,5 a 9,2 vezes em relação a um indivíduo não consumidor. O uso crônico do tabaco e álcool associados, potencializam, drasticamente, o risco de câncer bucal. (FREITA et al, 2005).

Em relação ao potencial genotóxico do rapé, pouco estudos foram realizados objetivando analisar a sua influência na formação de MN.

Martins e Boschini Filho (2003) realizaram a coleta do material a partir de células em suspensão salivar, modificando o protocolo de Tolbert, 1992, e obtiveram amostras mais homogênea de células esfoliadas, pois as células arrancadas através do raspado nem sempre se encontram no mesmo estágio biológico por pertencerem a estratos diferentes do epitélio bucal, aumentando e facilitando o grau de precisão da análise.

Em estudos realizados com a mucosa oral vários autores realizam o teste do micronúcleo com células esfoliadas a partir da raspagem da superfície para a preparação das lâminas, assim como foi realizado neste trabalho.

Em relação às outras alterações nucleares, foi verificada a frequência das seguintes alterações nucleares: células binucleadas, brotos nucleares, apoptose e necrose. A frequência de outras alterações (CBN, CB, AP, NE) dos grupos estão representados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

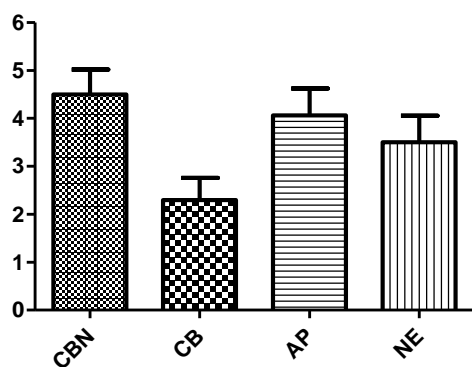


Figura 10 - Outras alterações no GE1.

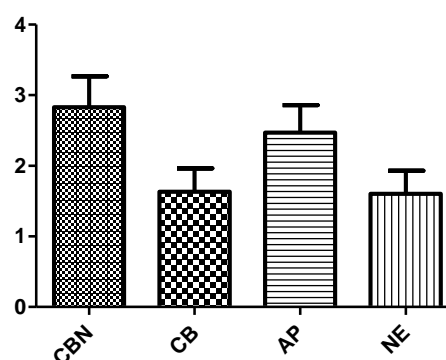


Figura 11 - Outras alterações no GE2.

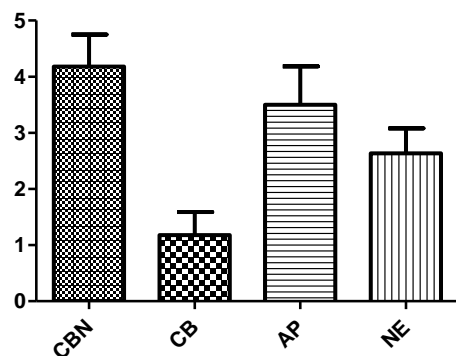


Figura 12 - Outras alterações no GE3.

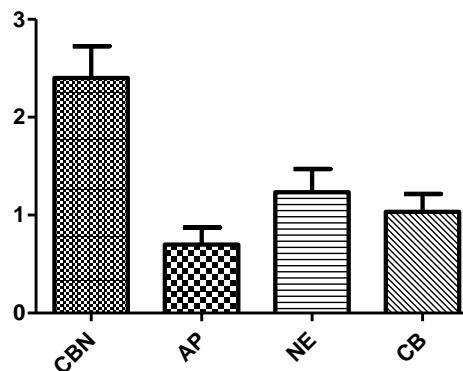


Figura 13 - Outras alterações no GC.

A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa à ocorrência CBN, CB, AP e NE, feita com o uso do mesmo teste foi significativamente maior entre os indivíduos dos grupos expostos (GE1, GE2 e GE3) quando comparados aos indivíduos do grupo controle (GC), não havendo diferença significativa quando comparados os grupos expostos entre si. Dados relativos a essa análise são apresentados na Tabela 3.

Tabela 5 - Comparação da frequência de outras alterações entre os grupos.

CÉLULAS BINUCLEADAS		
Grupos	Diferença	Valor
GE1 vs GC	2.221 ± 0.609	0,189
GE2 vs GC	0.427 ± 0.546	0,137
GE3 vs GC	1.782 ± 0.620	0,045
G1 vs G2	1.793 ± 0.681	0,395
G1 Vs G3	0.438 ± 0.777	0,859
G2 Vs G3	1.354 ± 0.710	0,541

CÉLULAS COM BROTO NUCLEAR		
Grupos	Diferença	Valor
GE1 vs GC	1.346 ± 0.4972	<0.0001
GE2 vs GC	0.600 ± 0.374	0,002
GE3 vs GC	0.140 ± 0.400	0,002
G1 vs G2	0.746 ± 0.568	0,070
G1 Vs G3	1.205 ± 0.632	0,154
G2 Vs G3	0.459 ± 0.506	0,806

APOPTOSE		
Grupos	Diferença	Valor
GE1 vs GC	3.367 ± 0.585	<0.0001
GE2 vs GC	1.767 ± 0.428	<0.0001
GE3 vs GC	2.430 ± 0.571	<0.0001
G1 vs G2	1.600 ± 0.682	0,060
G1 Vs G3	0.936 ± 0.834	0,860
G2 Vs G3	0.663 ± 0.698	0,111

NECROSE		
Grupos	Diferença	Valor
GE1 vs GC	2.233 ± 0.611	<0.0001
GE2 vs GC	0.366 ± 0.404	0,0925
GE3 vs GC	0.251 ± 1.978	0,0913
G1 vs G2	1.867 ± 0.651	0,005
G1 Vs G3	1.119 ± 0.724	0,014
G2 Vs G3	0.747 ± 0.500	0,916

Comparando o Grupo exposto 1 com o grupo controle, observa-se que em todos os casos o número de alterações nucleares foi mais elevado neste grupo, quando comparados com os outros grupos, sendo mais expressivo em apoptose.

Apesar da significância obtida na comparação da ocorrência de micronúcleos entre os usuários de bebidas alcoólicas e o grupo controle, efeitos genotóxicos deste hábito foram evidenciados através da análise da ocorrência de alterações nucleares degenerativas uma vez que a frequência dessas alterações foram significativamente maior entre os usuários, apontando para a indução da resposta apoptótica frente a danos ao DNA, o que poderia inclusive ter mascarado a real ocorrência de micronúcleos.

Esses resultados são concordantes com os descritos por Santos (2003) e Freita (2005) que observaram efeitos genotóxicos do hábito de ingerir bebidas alcoólicas traduzidos somente pela maior ocorrência de apoptose.

Maior ocorrência de apoptose foi observada também quando comparados quaisquer dos outros grupos expostos com o grupo controle, reforçando a genotoxicidade do tabaco já evidenciada na indução de micronúcleos, quer isoladamente ou em associação com a ingestão de bebidas alcoólicas.

Segundo Rocha (2003) os efeitos genotóxicos consequentes à ingestão de bebidas alcoólicas são traduzidos através do estímulo a apoptose, o que confere com os resultados obtidos no GE1, uma vez que o grupo foi constituído também por fumantes. Esse aumento de alterações nucleares se eleva pelo fato do álcool aumentar a permeabilidade das células da mucosa bucal aos agentes carcinogênicos, devido ao seu efeito solubilizante. O acetaldeído, principal metabólito do etanol, parece agir como solvente, facilitando a passagem de carcinógenos através das membranas celulares (JERONYMO; SILVESTRE).

5 CONCLUSÕES

a) O Teste de Micronúcleo tem sido largamente empregado para avaliação dos efeitos genotóxicos do consumo do tabaco sob outras formas que não o cigarro industrializado e os resultados obtidos são muito consistentes e é uma forte ferramenta de biomarcador de alteração nucleares;

b) As células da mucosa bucal respondem aos efeitos genotóxicos do tabagismo através do aumento da presença e frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares;

c) Existe associação significativa entre o hábito de fumar e a presença de micronúcleos e outras alterações nucleares nas células esfoliativas da mucosa bucal;

d) o micronúcleo é um indicador mais sensível aos efeitos do tabagismo nas células da mucosa bucal de fumantes quando comparado as demais alterações nucleares investigadas, ficando em semelhança com a necrose;

e) estudos adicionais se fazem necessários uma vez que pesquisadores relatam variação da frequência de micronúcleos em função da faixa etária, sexo e habito de fumar;

f) a frequência de MN e outras alterações podem variar com acordo com o gênero, idade, tempo de exposição a agentes genotóxicos, sendo necessário a realização de estudos para monitoramento específicos para cada caso;

g) o habito de mascar rapé também aumenta a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares, porém não houve diferença significativa entre os mascadores e o grupo controle; e

h) As alterações indicativas de apoptose são potenciais marcadores genéticos na prevenção do câncer, uma vez que apontam efeitos genotóxicos, destacando os resultados neste trabalho, em que a incidência de apoptose foi elevada em todos os grupos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTRUP, H. et al. Metabolism of benzo[a]pyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells, **Carcinogenesis**, Copenhagen, v.6, p. 1761–1765. 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer- INCA. Falando sobre câncer da boca. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

DANESI, C. C; MARCONATO, C. M. Câncer de Boca: um estudo no Hospital Universitário de Santa Maria. **Rev. Brasileira de Cancerologia**, Santa Maria, v. 46, n. 20, p. 179 – 82, abr/jun, 2002.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokineses-block micronucleus method. **Mutation Research** Adelaide, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Adelaide, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discov.**, Today, Kidlington, Adelaide, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002.

FREITA, V. S. et. al. Efeito genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Rev. Baiana saúde pública**, Salvador, v. 29, n. 2, p. 189-199, 2005.

HOLLAND, N, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, **Reviews in Mutation Research**, Adelaide, v.659, p. 93–108, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2012**. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER(INCA). **Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2014**. Rio de Janeiro: Inca, 2014.

LEITE A.C. et al. Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal, **Rev de Clín. e Pesq. Odontol.**, Curitiba, v. 1, n. 3, jan/mar, 2005.

MARTINS, K. F; BOSCHINI FILHO, J. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes, **Rev. Fac. Ciênc. Med.**, Sorocaba, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.

MANELLI-OLIVEIRA, R. **Citoesqueleto e Alterações Nucleares em Células Tumerais**: uma abordagem tridimensional ao microscópio confocal. Dissertação (Mestrado em Ciências), USP, São Paulo, 2000.

MEIRELES, J.R.C. **Danos genéticos em células esfoliadas da mucosa oral de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos**. Dissertação. (Mestrado em Genética) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

MIRANDA, M. A. S. P. **Micronúcleo e outras alterações nucleares: um teste de predisposição ao câncer bucal.** Dissertação. (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ROSIN, M. P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anticlastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents, **Mutat. Res.**, Vancouver, v. 267, p.265–276, 1992.

ROCHA, R. S, **Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e antissépticos bucais.** Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SARAN, R. et al. Avaliação de risco de câncer oral em pacientes com estados pré-cancerosas da cavidade oral por meio do teste de micronúcleos e ensaio desafio. **Oral Oncol.**, Adelaide v. 44, p. 354-360, 2008.

SILVESTRE, J. A. O; JERONYMO, D. V. Z. Câncer bucal e sua correlação com tabagismo e alcoolismo. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, Curitiba, jul.2007.

SPIVACK, S. D, et al. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells, **Cancer Res.**, New York, v. 64, p. 6805–6813, 2004.

STICH, H. F, et al. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers, **Int. J. Cancer.**, Denmark, v. 30, p. 553–559, 1982.

STICH, H. F, et al. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers, **Cancer Lett.**, Denmark, v. 17, p. 125–134, 1982.

STICH, H. F, et al. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells, **Ann. N.Y. Acad. Science.**, Denmark, v. 407, p. 93–105, 1983.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field-test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.**, Carolina do Norte, v. 134, p. 840-50, 1991.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat Res.**, Carolina do Norte, v. 271, p. 69-77, 1992.