

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

RICARDO KERN

**AVALIAÇÃO DE MICRONUCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS DE
ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA**

PONTA GROSSA
2006

RICARDO KERN

**AVALIAÇÃO DE MICRONUCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS DE
ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: **Profº. Dr Gibson Luiz Pilatti**

PONTA GROSSA
2006

K39a Kern, Ricardo
Avaliação de micronúcleos em células epiteliais bucais em
estudantes de odontologia / Ricardo Kern. Ponta Grossa, 2006.
68 f.; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Ponta
Grossa, curso de Mestrado em Odontologia – área de concentração
em Clínica Integrada

Orientador Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti

1-Micronúcleo. 2-Óleos essenciais. 3-Clorexidina. 4-Trauma
mecânico. IT.

CDD: 617.63

RESUMO

O constante aperfeiçoamento dos testes genéticos, como o Teste de Micronúcleos (MN), os tornaram importantes auxiliares na prevenção do câncer. Com o objetivo de melhor compreender a etiologia do desenvolvimento de neoplasias bucais, o presente trabalho se propôs a estudar a influência do fumo, álcool, trauma mecânico e de substância contidas em colutórios sobre a Frequência de Micronúcleos (FMN) em células epiteliais bucais de alunos do curso de Odontologia. Para tanto, 40 alunos foram divididos em 4 grupos assim caracterizados G1 – Abstêmios (controle); G2 Alcoolistas; G3 – Usuários de aparelho ortodôntico; G4 – Fumantes alcoolistas, e submetidos ao TMN. Posteriormente estes mesmos alunos receberam de forma aleatória, 4 diferentes tratamentos, por 10 dias, a base de colutórios: T1 (óleos essenciais), T2 (álcool 11%), T3 (álcool, 11% + clorexidina 0,12%), T4 (clorexidina 0,12%), sendo então novamente submetidos ao TMN. Os resultados da FMN demonstraram diferenças significativas entre os 4 grupos G ($p = 0,043$ *Kruskal-Wallis*), sendo indicado diferença entre G1 e G3 (*Mann-Whitney* $p \leq 0,01$) e entre G1 e G4 (*Mann-Whitney* $p \leq 0,05$), contudo, em relação aos tratamentos com colutórios, todos os tratamentos T não alcançaram resultados significativos (*Wilcoxon* $p > 0,05$). Os resultados sugerem que o trauma mecânico causado por aparelho ortodôntico assim como a associação de fumo com bebidas alcoólicas favorecem um aumento na prevalência de MN quando comparados ao controle. A utilização de colutórios bucais, em curto prazo, não foi capaz de causar aumento na frequência de Micronúcleos.

Palavras – chave: Micronúcleo. Óleos essenciais. Clorexidina. Fumo. Álcool. Trauma mecânico.

ABSTRACT

The constant perfecting of genetic tests, as the Test of Micronuclei (TMN), had become important in the cancer prevention. With the objective of better understanding the etiology of the development of cancer, the present work considered studying the influence of the tobacco, alcohol, mechanical injury and mouth rinses substances on Micronuclei Frequency (FMN) of buccal epithelial cells of Dentistry School's students. Forty (40) students had been divided in 4 groups thus characterized G1 - Abstemious (control); G2 Alcohol consumers; G3 - Orthodontic device's users; G4 - Smoking alcoolistas, and submitted to the TMN. These same pupils had later received from random form, 4 different treatments, per 10 days, based on mouth rinses substances: T1 (essential oils), T2 (alcohol 11%), T3 (alcohol, 11% + clorexidina 0.12%), T4 (clorexidina 0.12%), being submitted again to the TMN. The results of FMN had demonstrated significant differences between 4 groups G ($p = 0,043$ Kruskal-Wallis), being indicated difference between G1 and G3 (Mann-Whitney $p \leq 0,01$) and between G1 and G4 (Mann-Whitney $p \leq 0,05$), however, in relation to the treatments with month rinses substances, all treatments T had not reached significant results (Wilcoxon $p > 0,05$). We concluded that the mechanical injury caused by orthodontic device as well as the tobacco association with alcoholic beverages favors an increase in the prevalence of MN when compared with control. The use of mouth rinses substances, in short term, was not capable to cause increase in the FMN.

Key-words: Micronuclei. Essential oils. Chlorhexidine. Tobacco. Alcohol. Mechanical injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por câncer de boca, por 100.000 homens, nas Unidades da Federação, entre 1995 e 1999.....	12
Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por câncer de boca, por 100.000 mulheres, nas Unidades da Federação, entre 1995 e 1999.....	13
Figura 3 - Formação de micronúcleo.	14
Figura 4a - Célula contendo o MN	33
Figura 4b - Célula contendo o MN	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de contingência para o teste de concordância do operador para contagem de MN.....	35
Tabela 2 – Distribuição dos grupos, número da amostra pertencente ao grupo, idade e contagem do número de células micronucleadas por amostra.	36
Tabela 3 – Análise descritiva dos grupos com idade média, número de amostragem, mediana, média, desvio padrão e posto médio. Análise de variância não paramétrica entre os quatro grupos (<i>Kruskal-Wallis</i>) e grupo a grupo (<i>Mann-Whitney</i>).	37
Tabela 4 – Disposição das contagens absolutas de MN nos momentos inicial e final do experimento, organizadas em grupos distintos conforme o tratamento recebido.	38
Tabela 5 – Comparação inicial e final para cada modalidade de tratamento para Média e Desvio Padrão, Posto Médio, Soma dos Postos e valor de Z e <i>p</i> para o teste de <i>Wilcoxon</i>	39
Tabela 6 – Frequência de MN utilizadas como referências controles em diferentes investigações de mutagenicidade descritas na literatura.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE = *broken-egg*

CL = cariólise

CN = célula normal.

CMN = célula com micronúcleo.

CR = cariorréxe

H = valor do nível de significância do teste de *Kruskal-Wallis*.

MN = micronúcleo

P = probabilidade.

TMN = total de micronúcleo

U = valor do nível de significância do teste de *Mann-Whitney*

dn = desvio da normalidade.

gl = grau de liberdade.

$m \pm ep$ = média \pm erro padrão da média.

$m \pm dp$ = média \pm desvio padrão da média.

n = número de indivíduos.

t = teste t de significância da diferença das médias entre dois grupos.

Significância = $P > 0,05$ - não significante;

$P < 0,05$ - significante;

$P < 0,01$ - altamente significante;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 TESTE DE MICRONÚCLEOS.....	15
2.1.1 Definições.....	15
2.1.2 Utilização da análise de micronúcleos para monitoramento de processos carcinogênicos..	17
2.1.3 Análise de Micronúcleos em Linfócitos.....	18
2.1.4 Utilização da análise de micronúcleos para monitoramento de células epiteliais.....	19
2.2 AGENTES GENOTÓXICOS.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 FASE 1 – PREVALÊNCIA DE MICRONÚCLEOS.....	26
4.1.1 Caracterização da amostra.....	27
4.1.2 Técnica de coleta das células: teste do micronúcleo.....	28
4.2 FASE 2 – INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS.....	30
4.3 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.2 PREVALÊNCIA DE MN – FASE UM DO ESTUDO.....	35
5.3 INCIDÊNCIA DE MN – FASE DOIS DO ESTUDO.....	38
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	57
ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS.....	60
ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE HÁBITOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Câncer bucal é uma denominação genérica para referenciar qualquer lesão maligna dessa região. Os tumores malignos das regiões anatômicas que constituem a cavidade bucal – lábios, língua, assoalho de boca, mucosa bucal, gengivas, palato duro e mandíbula – perfazem cerca de 5% de todas as formas de câncer que ocorrem no corpo humano (DEL REGATO; SPJUT, 1977).

No Brasil, a estimativa de incidência de câncer para 2005 (Gráfico 1) aponta a manifestação bucal como a 8º forma mais freqüente entre os homens (com 9.985 casos estimados) e a 9º entre as mulheres (com 3.895 casos estimados); com distribuição da prevalência ocorrendo de forma não homogênea entre as unidades da Federação, tanto para o sexo masculino (Figura 1) como para o sexo feminino (Figura 2) (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER - INCA, 2005).

Embora as neoplasias malignas possam ter origem em todos os tecidos que compõe a boca, aquelas oriundas do tecido epitelial de revestimento são as mais comuns, por sua maior exposição à ação de agentes potencialmente carcinogênicos. Os tecidos epiteliais entram em contato direto com substâncias genotóxicas inaladas ou ingeridas, sendo ainda que pulmões e bexiga podem entrar em contato com substâncias tóxicas metabolizadas pelo próprio organismo, esta condição caracteriza que a maioria dos tumores é iniciada especificamente por células epiteliais (FENECH et al., 1999). Entre todos os tumores malignos da boca, de 90% a 95% são diagnosticados como epidermóide, também denominado espinocelular ou de células escamosas (INCA, 2005).

Diversos agentes são relacionados como fatores de risco para o desenvolvimento de lesões malignas na cavidade bucal. O potencial genotóxico –

potencial de causar dano ao DNA celular - existente em vários produtos como o fumo, álcool, mate, medicações e alimentos, têm sido bem descrito na literatura (DIETZ et al., 2000). Má higienização bucal, traumas mecânicos e exposição ocupacional também são relacionados como contribuintes ao câncer (HOMANN et al., 2000).

Fatores ambientais atuam como agentes etiológicos em cerca de 80% dos cânceres humanos (HEDDLE et al., 1983). A crescente introdução de compostos tóxicos nas áreas industrializadas torna cada vez mais urgente à utilização de métodos confiáveis capazes de detectar e medir o DNA lesado no homem.

As alterações do genoma humano geram uma preocupação quanto à adoção de mecanismos de proteção às gerações futuras, tornando os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes com potencial mutagênico.

Diversas formas de avaliação do dano genético tem sido desenvolvidas. Dentre elas, citamos como método clássico, a Análise de Células Metafásicas. Esta exige um técnico altamente especializado e requer o exame de um grande número de metáfases (a metáfase é uma das fases do processo de divisão celular), fundamental para a confiabilidade da análise estatística, o que demanda tempo e dificulta seu emprego em estudos populacionais (BREWEN; PRESTON, 1978).

Como alternativa à Análise de Células Metafásicas, propôs-se utilizar o Teste de Frequência de Micronúcleos, que é tido com um método sensível para medir o dano citogenético (referente ao material genético, DNA, da célula). Os micronúcleos são formações globulares de DNA, originados a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular (FENECH et al., 1999).

A presença de micronúcleos nas células serve como parâmetro para a determinação da extensão do dano que um agente do ambiente pode estar causando no processo de divisão celular do tecido acometido, afetando o DNA tecidual e, conseqüentemente, predispondo ao desenvolvimento de câncer bucal (VINE, 1990). Desta forma, podemos utilizar o Teste de Micronúcleos para identificarmos e avaliarmos diversos fatores que podem trazer algum dano ao DNA de diferentes tecidos.

Em odontologia, a aplicação deste teste consiste em uma ferramenta extremamente valiosa para avaliarmos, de modo sensível, a ação genotóxicas de substâncias que entram em contato com o epitélio bucal.

Agentes químicos (fumo, álcool, hábitos alimentares), físicos (trauma mecânico por próteses, aparelhos ortodônticos, má oclusão, radiação) ou biológicos (biofilme dental), são exemplos de fatores de presença comum ao ambiente bucal, e que podem representar um potencial de formação de micronúcleos às células epiteliais (FENECH et al., 1999).

A compreensão dessa interação de agentes químicos, físicos e biológicos, com potencial mutagênico, torna-se importante para que possamos melhor compreender e controlar os fatores que predisõem nossos pacientes a ocorrência do câncer bucal.

Neste sentido, a elaboração de estudos controlados e de caso controle, por meio de testes de micronúcleo, possibilita estudar a ampla interação de fatores que concebem a um paciente uma maior pré-disponibilidade para o desenvolvimento do câncer bucal.

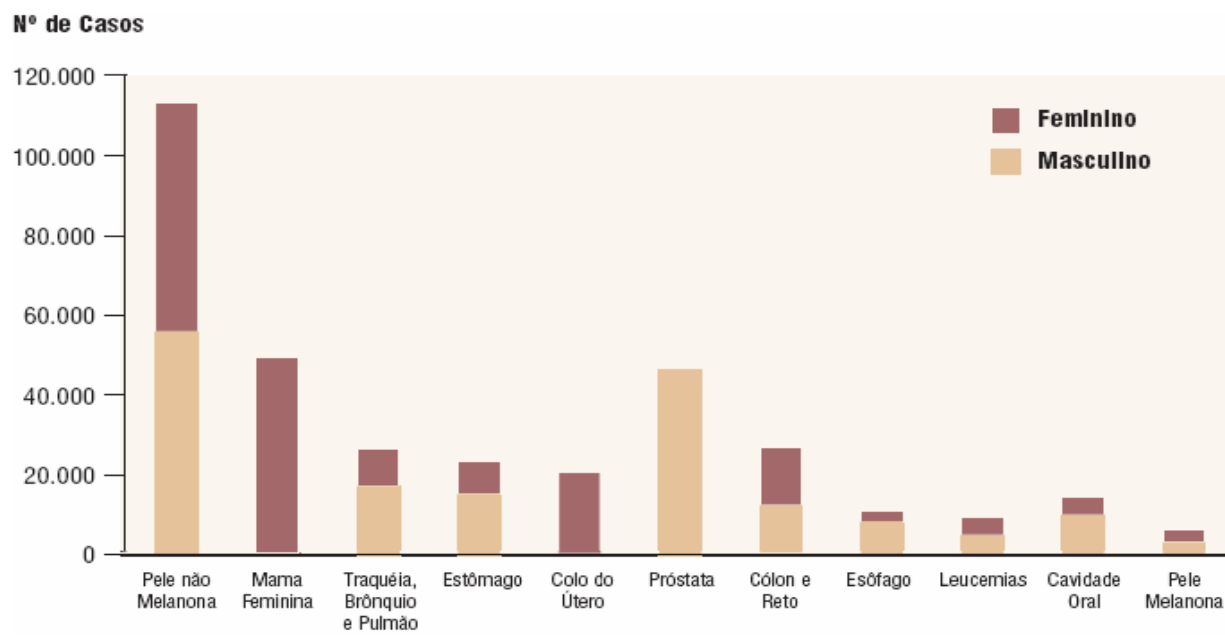


Gráfico 1 - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2005, na população brasileira

Fonte: INCA (2005)

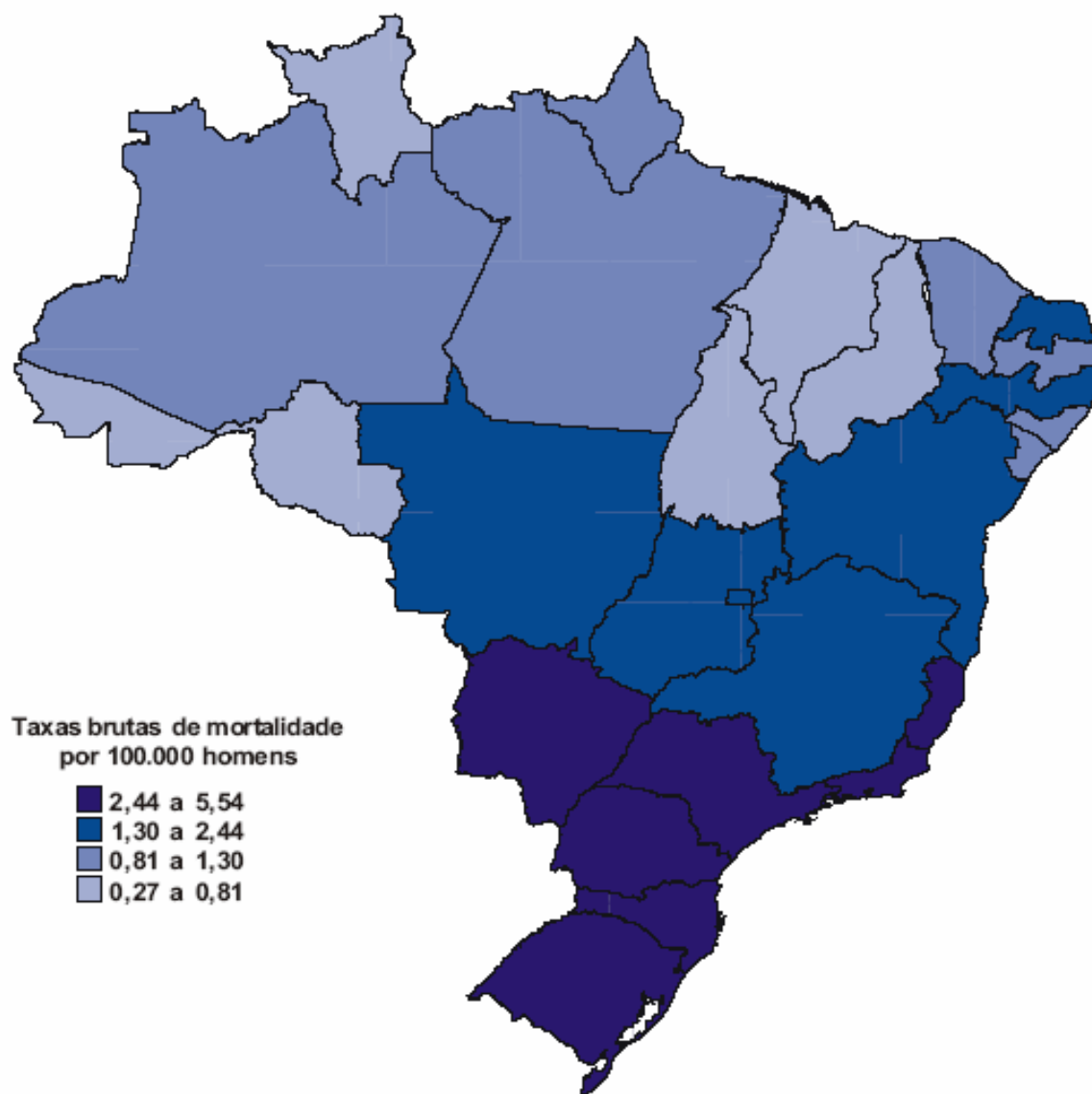


Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por câncer de boca, por 100.000 homens, nas Unidades da Federação, entre 1995 e 1999
Fonte: INCA (2005)

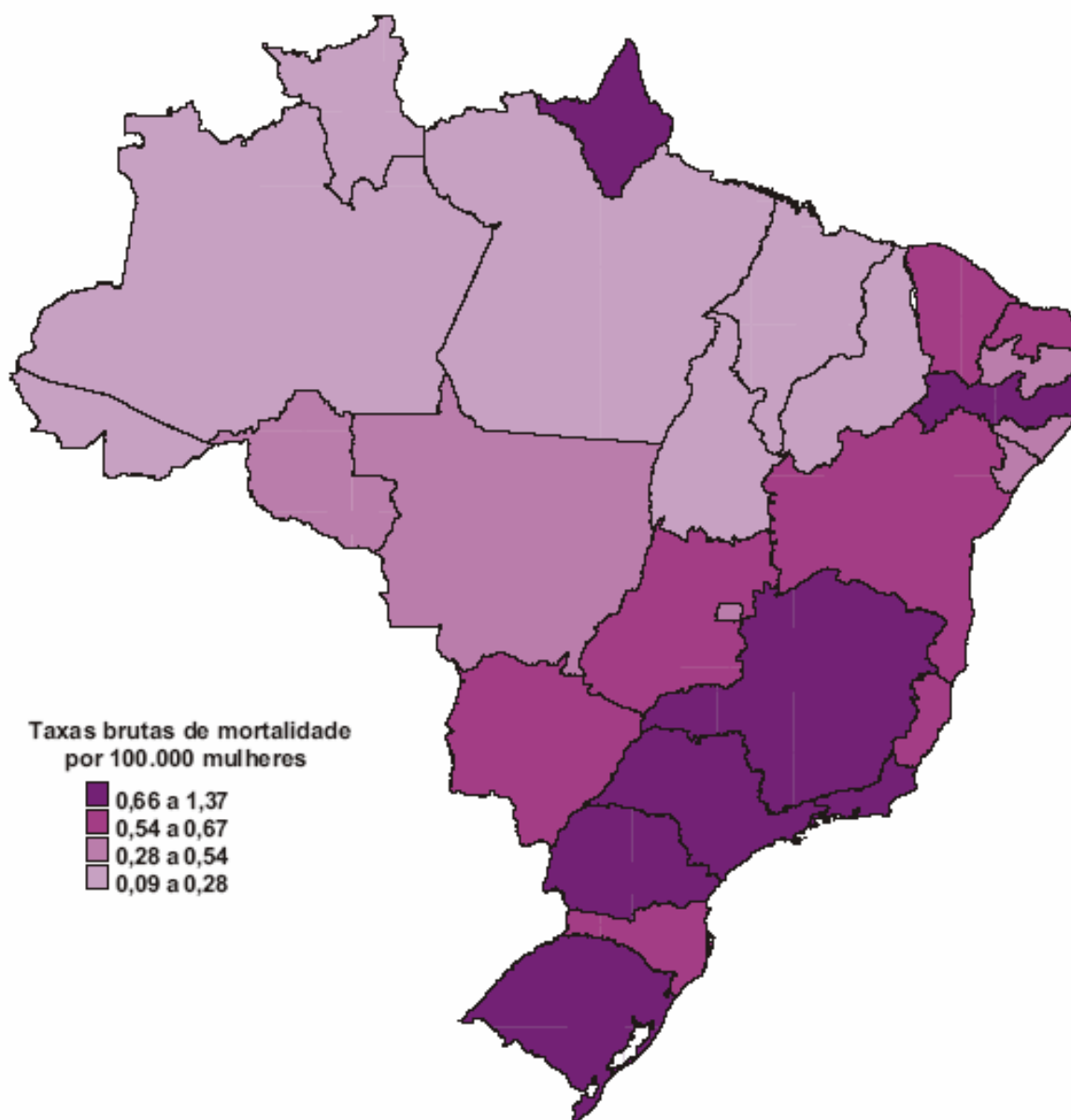


Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por câncer de boca, por 100.000 mulheres, nas Unidades da Federação, entre 1995 e 1999

Fonte: INCA (2005)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TESTE DE MICRONÚCLEOS

2.1.1 Definições

De acordo com Ramirez e Saldanha (2002, p. 140).

O Micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais [Figura 4]. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase.

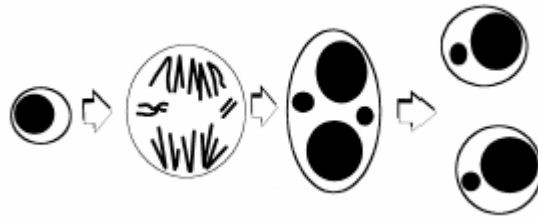


Figura 3- Formação de micronúcleo

Nota: No processo de divisão da célula durante a anáfase, na qual pode ocorrer a falha na incorporação de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros ao núcleo da célula filha.

Fonte: Fenech et al. (1999)

O Food and Drug Administration (FDA), nos EUA, em uma cartilha para aspectos regulatórios de testes de genotoxicidade para a indústria farmacêutica (Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals) define Micronúcleo como partícula microscopicamente detectável contendo DNA nuclear, podendo conter parte ou todo um cromossomo. (FDA, 2005)

O micronúcleo (MN) apresenta entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo e geralmente há um micronúcleo por célula (SCHMID, 1975). Devem ser analisados em

grupos celulares que estiveram em processo de divisão no momento da exposição ao agente agressor, ficando sua análise comprometida em populações de células que não estão em processo de divisão celular (HEDDLE et al., 1983).

Historicamente os micronúcleos foram descritos há mais de um século, sendo chamados de “fragmentos de material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” na terminologia utilizada por Jolly no início do século passado. O termo “Corpúsculos de Howell-Jolly” ficou conhecido entre os hematologistas para designar o aparecimento de eventos de micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

A primeira tentativa de utilizar os micronúcleos como indicadores de dano citogenético foi feita por Evans et al. (1959 apud EVANS, 1997) que usaram a frequência de micronúcleos para medir a dano induzido em raiz de cebola por neutros e raios-gama. Relatos prévios relacionados aos micronúcleos foram realizados por Thoday (1951 apud EVANS, 1997), referindo-se ao aparecimento de um “núcleo fragmentado” em seus estudos com raízes de *Vicia faba*.

O marco decisivo na utilização do teste de micronúcleo com um meio de monitorar a ação de agentes com potencial genotóxico veio dos trabalhos realizados por Boller e Schmid, (1970) que sugeriram o termo “teste de micronúcleo” pela primeira vez, e por Heddle (1977 apud EVANS, 1997) com seus trabalhos utilizando eritrócitos de ratos, nos quais quantificaram o DNA de micronúcleos e verificaram que esta quantidade correspondia a de cromossomos ou fragmentos de cromossomos acêntricos. (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Ainda em eritrócitos de camundongos, os pesquisadores aplicaram tanto o teste de micronúcleo como o de análise clássica de aberrações cromossômicas, com finalidade de comparar a sensibilidade do teste do micronúcleo (KLIESCH; ADLER,

1980). Trabalhos subseqüentes tentaram postular a relação entre o tamanho do micronúcleo e o tipo de alteração cromossômica. Os micronúcleos menores seriam formados por fragmentos cromossômicos, enquanto os maiores por cromossomos inteiros. Tal associação contribuiu para a classificação de agentes mutagênicos em clastogênicos ou aneugênicos (VANDERKERKEN et al., 1989).

Entretanto devemos entender; também, a terminologia “micronúcleo” na concepção zoologista, que se refere à ocorrência de pequenos núcleos presente no citoplasma dos ciliados. Caracterizados como pequenos corpos arredondados numa freqüência variada de um a vinte micronúcleos, dependendo da espécie de ciliado, sendo responsáveis pela recombinação genética, reorganização nuclear e pela origem do macronúcleo nestas espécies (BARNES; RUPERT, 1994).

2.1.2 Utilização da análise de micronúcleos para monitoramento de processos carcinogênicos

Aparentemente a ação de qualquer agente químico genotóxico pode induzir ao aumento na freqüência de micronúcleos. Diferentes tecidos, desde que realizem multiplicação celular podem ser acometidos pela ocorrência de aberrações cromossômicas. Em vista disso, o teste de micronúcleos tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada nos mais diversos campos da pesquisa para aferir a segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como carcinogênicos.

Há um esforço crescente em avaliar os impactos ambientais, genéticos e de mudança no estilo de vida sobre a estabilidade genômica na população humana. A importância do teste de micronúcleo vem de sua vantagem sobre os demais testes

existentes, pois é relativamente fácil de se realizar, fornecendo resultados com forte suporte estatístico. (FENECH et al., 1999)

A simplicidade de seu emprego leva a uma ampla adoção mundial como teste de genotoxicidade *in vitro* assim como no monitoramento da população humana. Como é de se esperar a adoção de uma nova técnica em várias partes do mundo acaba gerando pequenas divergências na padronização da técnica assim como nos resultados obtidos. Todavia, o estabelecimento de um protocolo consagrado para o emprego do teste de micronúcleo se encontra incompleto. Havendo inclusive um programa de colaboração mundial HUmAn MicroNucleus Project (HUMN) para se delinear e obter dados de diferentes centros e populações com o objetivo de se identificar as variáveis de confusão (viés) na metodologia empregada (FENECH et al., 1999).

As duas principais técnicas desenvolvidas para o teste de micronúcleo são realizadas em linfócitos sanguíneos ou em células epiteliais descamadas.

2.1.3 Análise de Micronúcleos em Linfócitos

Krepinsky e Heddle (1983 apud EVANS, 1997) demonstraram que o teste de micronúcleo poderia ser efetivamente usado para detectar danos em linfócitos de seres humanos expostos à radiação ionizante. Entretanto, em virtude da fragilidade dessas células durante a manipulação, e as respostas variadas dos linfócitos aos estímulos mitogênicos, novas alterações foram realizadas nos protocolos desses testes. A mais importante foi o uso da Citocalacina B para marcar a divisão celular, uma vez que essa droga é inibidora da cariocinese, ficando as células com o número de núcleos correspondentes ao número de divisões celulares à que foram submetidas.

Desde a descoberta da Citocalacina B, o teste de micronúcleo em linfócitos vem auxiliando os estudos da genética toxicológica no biomonitoramento de populações humanas expostas a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos de atuação sistêmicas (ANWAR, 1992; SAVOLDI-BARBOSA; SAKAMOTO-HOJO; TAKAHASHI, 1999). Paralelamente aos primeiros estudos da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos, alguns pesquisadores se interessaram pelo estudo da frequência de micronúcleos em outros tecidos, para que houvesse uma avaliação conjunta tanto do efeito sistêmico, como do efeito local das substâncias genotóxicas (AGOSTINI; OTTO; WAJNTAL, 1986) ampliando a relevância no monitoramento de populações expostas.

2.1.4 Utilização da análise de micronúcleos para monitoramento de células epiteliais

A pesquisa descrevendo danos citogenéticos em células epiteliais humanas teve um grande crescimento a partir da década de 80, com números cada vez maiores de laboratórios e pesquisadores utilizando o teste de micronúcleos (FENECH et al., 1999). As células esfoliadas possuem um grande potencial como ferramenta de biomonitoramento de populações humanas expostas a agentes genotóxicos pela facilidade com que se pode proceder a coletas de células. Mucosa epitelial da boca, nariz e bexiga são exemplos de regiões que podem fornecer material por meio de técnicas simples e não invasivas.

Para análise de MN em cavidade bucal, podemos utilizar a coleta de células da mucosa ou da borda lateral da língua, pois estes tecidos epiteliais estão em constante processo de divisão celular com renovação do tecido pela descamação das células superficiais. As células epiteliais esfoliadas não se dividem mais, mas refletem

anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células na camada basal. Na análise de micronúcleo a coleta das células deve ocorrer entre 5 a 24 dias após a exposição do tecido ao agente genotóxico (exposição aguda), uma vez que as células da camada basal têm um tempo de migração de aproximadamente 5-7 dias e as células expostas descamam totalmente em cerca de três semanas (VINE, 1990). A coleta é um procedimento rápido e não invasivo, realizada com o auxílio de uma pequena escova de cerdas macias (cytobrush) que é levemente friccionada de forma indolor contra a região de coleta.

Reis et al. (2002) realizaram um estudo por meio do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa jugal e da língua de 40 indivíduos alcoólatras não fumantes e de 20 abstêmios de álcool e fumo e observaram um aumento estatisticamente significativo da frequência de micronúcleos em células esfoliadas da língua no grupo exposto ao etanol em relação ao grupo controle. A frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal apresentou-se maior no grupo de indivíduos alcoólatras quando comparado ao grupo controle, porém sem diferença significativa.

Em estudos de radiação ionizante, o teste de micronúcleo tem sido utilizado para avaliar danos genéticos após exposição ocupacional a radiação X, medir a radio-sensibilidade celular, para estudar aberrações cromossômicas e células em divisão, para detectar efeitos genotóxicos em células de diferentes tecidos, assim como mediante a exposição a diferentes técnicas de radiologia (CERQUEIRA et al., 2004). Não houve diferença significativa na formação de micronúcleo, projeções nucleares ou alterações nucleares degenerativas nas medições realizadas antes e dez dias após a exposição.

Fatores ocupacionais, como a exposição ao etanol em frentistas de postos de gasolina foi pesquisada (GATTÁS et al., 2001) comparando a incidência de formação de micronúcleo, na mucosa bucal, em período de três anos, no qual ocorreu a introdução do etanol nas misturas de combustível (33% metanol, 60% etanol and 7% gasolina). Houve um aumento significativo na formação de micronúcleos nos funcionários expostos à formação de vapor do combustível.

A ação do fumo sobre as células da mucosa bucal foi estudada (SUHAS et al., 2004) que comparando a formação de micronúcleo na mucosa bucal, palato e língua, entre fumante e não fumantes. Tanto o grupo controle como o grupo teste possuíam 25 indivíduos. A diferença na media de micronúcleos foi significativa na mucosa bucal e palato do grupo de fumantes.

Outro estudo (BAGWE; BHISEY, 1993) com foco no efeito do fumo como agente carcinogênico foi realizado em trabalhadores da indústria do tabaco na Índia. A exposição ocupacional, com o contato direto ao fumo, foi estudada tanto em operários não fumantes das lavouras de fumo como nos operários que enrolavam fumo nas fábricas. Juntamente com a análise da frequência de micronúcleos das células epiteliais bucais, foi quantificado o percentual de nicotina existente na saliva. Os resultados demonstraram uma diferença do efeito e da exposição ocupacional, sendo que os indivíduos que trabalhavam no processamento do plantio do fumo obtiveram aumento significativo tanto nos níveis de nicotina salivares como na frequência de micronúcleo.

Aumento na frequência de micronúcleos também foi verificada em pacientes alcoolistas portadores de carcinomas orofaríngeos, sendo inclusive sugerido sua utilização como método para monitorar a evolução clínica da lesão, comparando

freqüência intra e inter indivíduos, tanto no processo pré-tratamento como pós-tratamento (RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

Deficiência de folato usualmente encontrado em mulheres no período pós-menopausa, mesmo sem sintomas clínicos de anemia, resulta em altos níveis de dano citogenético. Neste estudo (TITENKO-HOLLAND et al., 1998) foram acompanhados a freqüência de micronúcleos, em células da mucosa e em linfócitos, em nove mulheres durante três períodos distintos: antes da reposição com folato, durante e ao final da reposição. Durante os estudos houve melhora significativa nos níveis plasmáticos de folato e vitamina B-12, acompanhado pela queda na freqüência de micronúcleos.

2.2 AGENTES GENOTÓXICOS

Freqüentemente depara-se com populações expostas a vários fatores tidos como genotóxicos. Pacientes fumantes e alcoolistas acabam por constituir uma população com uma incidência maior ao câncer bucal (BOFFETTA et al. 1992). Em estudos epidemiológicos demonstrou-se que indivíduos alcoólatras apresentavam risco de câncer 6,4 vezes maior que indivíduos abstêmios de álcool, fato este decorrente do efeito sinérgico do álcool aos componentes do cigarro, como o Benzopireno e o 4-(methilnitrosamina)1(3-pyridyl), sabidamente agentes carcinogênicos (WELLS et al., 1997).

A ação tóxica local do álcool leva a uma injúria da membrana e da célula, com um subseqüente aumento na proliferação celular. A hiperproliferação por si só aumenta a exposição à outros agentes carcinogênicos e, em se tornando permanente, é

o primeiro passo para um processo de transformação maligna (SEITZ; PÖSCHL; SIMANOWSKI, 1998).

Com relação ao desenvolvimento de lesões malignas, o fumo tem sido relatado como um dos principais fatores de risco (ADHVARYU; DAVE; TRIVEDI, 1991). O consumo de álcool, por outro lado, é citado como forte agente potencializador no desencadeamento de lesões cancerosas, agindo de forma sinérgica com vários outros produtos com potencial citotóxico, devidamente por aumentar a permeabilidade dos tecidos a estas substâncias (BARAONA; GUERRA; LIEBER, 1981). Em indivíduos que fumam, o consumo de álcool apresenta comprovadamente um efeito sinérgico na indução do câncer bucal (FRANCESCHI et al., 1990). Porém, o efeito do álcool isoladamente parece ser mal esclarecido, ainda que sua atividade mutagênica tenha sido descrita na literatura (FEINMAN; LIEBER, 1988).

Os danos causados pelo álcool à mucosa bucal e ao trato digestivo superior são principalmente decorrentes da ação local e não sistêmica do consumo de álcool. (SEITZ; PÖSCHL; SIMANOWSKI, 1998). Tornado preocupantes hábitos que venham a expor o paciente ao contato com o álcool e que, propriamente, não seja o de consumo de bebidas alcoólicas.

O acetaldeído, subproduto metabólico do álcool, comprovadamente com ação carcinogênica, seria o responsável pela maior incidência de câncer em pacientes alcoolistas. Parte da produção de acetaldeído é realizada por bactérias bucais, ocorrendo concordância com pesquisas que encontraram maior incidência de câncer entre os alcoolistas com deficiência de higiene bucal (VISAPÃÃ; TILLONEN; SALASPURO, 2002).

O aumento da disponibilidade de diferentes marcas de colutórios e a popularização de hábito do bochecho como forma complementar de higienização bucal,

chamam a atenção, tanto pela utilização de álcool na composição da maioria destes produtos, como pela utilização de agentes químicos suspeitos de serem genotóxicos, como a clorexidina (MASHBERG; BARSA; GROSSMAN, 1985).

Os produtos odontológicos possuem valores variáveis de álcool em sua composição, alguns deles, tendo com base o princípio ativo clorexidina, atingem concentrações variando de 3,5% (Noplak®) a 11,6%(Peridex®; Periogard®). Outros produtos podem alcançar concentrações de álcool de até 26,9% (Listerine®).

Os colutórios têm sido alvos de diversos estudos epidemiológicos de câncer bucal. Em amplo estudo populacional de caso-controle realizado nos Estados Unidos (WINN et al., 1991), os resultados demonstraram que o hábito de utilização de colutórios está associado com um aumento de 40% no risco de desenvolvimento de lesões malignas na cavidade bucal em homens, e de 60% entre as mulheres, isto após os ajustes de exposição a fatores como o hábito de fumar e de ingestão de bebidas alcoólicas, sendo que os riscos aumentam quanto maior há freqüência de bochecho e o tempo de uso; pessoas utilizando o produto 60 ou mais vezes por mês têm seu risco aumentado 1.7 a 2.0, enquanto que os usuários a mais de 40 anos tem 1.4 à 1.9 aumento no risco de desenvolver um câncer bucal.

Em outros estudos de câncer bucal associado com colutórios, os resultados tem sido inconsistentes, com a variação na correlação ao risco indo de 0.8 à 2.5 (MASHBERG; BARSA; GROSSMAN, 1985; WEAVER; FLEMING; SMITH, 1979). Obviamente a grande variedade de fatores que podem interferir como carcinogênicos podem evidentemente não ser quantificados da forma adequada, atuando, então, como viés nesses estudos.

3 PROPOSIÇÃO

1. Este trabalho teve por objetivo verificar a prevalência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal de alunos de odontologia comparando grupos de alunos abstêmios, usuários de aparelho ortodôntico, fumantes assim como em fumantes alcoolistas;
2. Este trabalho também se propôs comparar a incidência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal de alunos de odontologia, causada por álcool, por clorexidina e por óleos essenciais; em concentrações correlatas às empregadas nas formulações de colutórios.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos dessa pesquisa foram realizados nas dependências da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Antes da seleção da amostra, este presente projeto (processo nº00463/2005) foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Todos os indivíduos participantes deste estudo foram selecionados no universo de estudantes do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, aderindo, voluntariamente, após o esclarecimento de suas incumbências, responsabilidades e direito, de maneira formalizada por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice).

De acordo com as diferentes proposições deste trabalho, dividiremos o Material e Métodos em Fase 1 – Prevalência de Micronúcleos; e Fase 2 – Incidência de Micronúcleos.

4.1 FASE 1 – PREVALÊNCIA DE MICRONÚCLEOS

Na fase um, o objetivo do estudo foi avaliar a prevalência de micronúcleos, no universo dos acadêmicos do curso de odontologia, avaliando a influência das seguintes variáveis independentes: consumo de bebidas alcoólicas, fumantes, usuários de aparelhos ortodônticos fixos.

4.1.1 Caracterização da amostra

Para que pudéssemos avaliar a influência das variáveis citadas anteriormente, o estudo selecionou 40 indivíduos que se enquadrassem nos requisitos de quatro diferentes grupos: 10 Abstêmios (Controle, G1), 10 Alcoolistas (G2), 10 Abstêmios usuários de aparelho ortodôntico (G3), 10 Fumantes alcoolistas (G4).

Esta composição serviu para realizarmos o levantamento da prevalência de micronúcleos, relacionado-o às características da amostragem de cada grupo descrito acima. Infere-se assim, a influência do trauma mecânico do uso do aparelho, do consumo de álcool e da associação do consumo de álcool e tabaco sobre a frequência de MN, quando comparados ao grupo controle.

A separação dos voluntários em cada grupo ocorreu por meio do preenchimento de dois diferentes questionários: Caracterização de Hábitos (Anexo B) e Diário de Consumo de Bebidas Alcoólicas (Anexo A); assim como pela realização de um exame clínico e anamnese.

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados na seleção dos voluntários foram os seguintes:

1. Os indivíduos que fossem elegíveis deveriam se enquadrar em apenas uma das variáveis independentes, com exceção das variáveis álcool e fumo, pela dificuldade de se encontrar indivíduos apenas fumantes abstêmios ao consumo de álcool;
2. Consumo de bebidas alcoólicas: os indivíduos foram divididos em abstêmios (ausência total de consumo) ou consumidores (média de consumo maior que 14 doses nas duas últimas semanas). Os

indivíduos que não se enquadraram em nenhum dos perfis descritos, ou seja, aqueles que consumiam bebidas alcoólicas, mas abaixo da média de 14 doses, foram excluídos da pesquisa;

3. Fumo: foram considerados fumantes aqueles com hábito de consumo de mais de cinco cigarros ao dia. A adoção desse critério visou evitar os fumantes de baixo consumo pela característica de uso esporádicos que estes apresentaram durante a anamnese. Os voluntários de menor consumo foram excluídos do trabalho. Observação: todos os fumantes selecionados se enquadravam no perfil de consumidor (mais de 14 doses) de bebidas alcoólicas;
4. Uso de aparelho ortodôntico: foram considerados portadores as pessoas com aparelho ortodôntico fixo de uso contínuo. Os voluntários que retiraram a aparelhagem ortodôntica a menos de seis meses ou os que faziam uso casual do aparelho removível foram excluídos da pesquisa.

Após a ordenação dos voluntários nos quatro grupos realizou-se o Teste de Micronúcleos.

4.1.2 Técnica de coleta das células: teste do micronúcleo

A técnica de coleta e análise das células da mucosa bucal será descrita conforme a técnica relatada por Titenko-Holland et al.(1998).

Utilizando uma escova tipo cytobrush, Um único operador coletou as células da mucosa da região interna da bochecha de cada indivíduo, transferiram-se, então, as células para um tubo de ensaio imergindo e agitando o cytobrush em uma solução fisiológica (3 ml de solução salina 0,9%). As células então são separadas, por um processo de centrifugação por 10 minutos a 1500 r.p.m., do sobrenadante, que é desprezado. O material restante, com uma alta concentração de células, é então espalhado sobre lâminas aquecidas em água destiladas a 55°C. A fixação do material é realizada com a imersão da lâmina em álcool PA por 20 minutos a 0°C.

Após a fixação, as lâminas recebem um tratamento com ácido clorídrico (HCL 1N) na seguinte seqüência de variação de tempo e temperatura: 1 minuto a 22°C, 10 minutos a 65°, esfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos, 5 minutos a 22°C. Lavam-se com água destilada por 10 minutos.

Procederam-se à coloração das lâminas com a coloração de *Schiff* e contra-coloração com *Fast-Green*. Para cada coleta foram realizadas duas lâminas de modo a alcançar uma contagem de três mil células por voluntário.

A análise das lâminas foi feita com a utilização de um microscópio óptico em aumento de 400x, sendo que mediante alguma dúvida quanto à existência de micronúcleo analisava-se sob aumento de 1000x.

A classificação e contagem de micronúcleos seguiram um protocolo sugerido por Tolber et al (1992) e ocorreram da seguinte maneira:

- a) Contagem de células: foram incluídas as células que tenham os núcleos normais e intactos, com perímetro nuclear liso e distinto, e que apresentem o citoplasma também intacto, com exceção das que

tenham pequenas dobras e pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;

- b) Contagem dos micronúcleos: foram considerados micronúcleos as estruturas que apresentarem um halo circundante sugestivo 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 e ausência de sobreposições ou pontes com o núcleo. Considerou-se o número total de micronúcleos assim como o de células acometidas pelo aparecimento de micronúcleos em seu citoplasma.

Toda a análise das lâminas foi realizada por um único operador de modo que este não soubesse a qual grupo esta amostra era proveniente. Para cada amostra foi realizada a contagem de 3000 células epiteliais.

4.2 FASE 2 – INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS

Após a realização da primeira fase do estudo, caracterizada como um estudo transversal em que se classificou a população estudada em 4 grupos distintos de hábitos característicos, procedeu-se a segunda fase deste trabalho caracterizado como um estudo experimental com a mesma amostragem populacional sub-divididas de maneira randômica em quatro grupos de tratamentos. O objetivo desta fase foi avaliar a incidência de micronúcleos provocados por produtos existentes nos colutórios bucais

(álcool, clorexidina, óleos essenciais). Para tanto, participaram 40 alunos divididos em quatro grupos distintos.

Cada grupo se caracterizou por tratamentos distintos com bochechos diários (10ml, duas vezes ao dia, por um minuto, pelo período oito dias) de uma substância específica, sendo elas:

Tratamento T1 - Óleos essenciais: Listerine®, 200ml.

Tratamento T2 - Álcool: essência de menta, solução em álcool a 11,6%,
água q.s.p 200ml

Tratamento T3- Álcool e Clorexidina: chlorexidina 0,12%, essência de menta, álcool 12%, água q.s.p 200ml.

Tratamento T4 – Clorexidina: clorexidina 0,12%, essência de menta, água q.s.p. 200ml.

Os indivíduos foram orientados a realizarem o bochecho trinta minutos após a escovação normal, de modo que não houvesse interferência dos produtos contidos em dentifrícios, especialmente as substâncias detergentes desta, com o agente de cada grupo.

O período experimental seguiu o seguinte calendário:

Dia 01 - Coleta de Células e Teste do micronúcleo.

Dia 02 a dia 09 - Período de bochechos com a substância específica de cada grupo durante 08 dias.

Dia 12 - Coleta de Células e Teste do micronúcleo.

Todos os procedimentos para realização deste teste foram realizados de forma idêntica à primeira fase.

4.3 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para aferir a reprodutibilidade da contagem de MN, verificando a concordância intra-avaliador, adotou-se o teste K (*Kappa*) sobre os dados da análise de 10 amostras.

A formação de micronúcleo é uma ocorrência rara que segue uma distribuição aleatória conhecida por *Poisson*, sendo que a significância estatística dos dados deve ser aferida por meio de testes não paramétricos (GATTÁS et al., 2001) para comparação entre grupos (*Kruskal-Wallis*), entre pares de grupos (*Mann-Whitney*) – dados referentes à primeira fase do estudo – e entre amostras (final/inicial) de grupos relacionados (*Wilcoxon*) – dados referentes à segunda fase do estudo.

5 RESULTADOS

Para a conformação dos resultados analisaram-se, em cada fase do estudo, 3000 células epiteliais para cada indivíduo participante do estudo. A princípio, cada célula epitelial íntegra foi avaliada quanto à presença de micronúcleos em seu citoplasma, sendo que os resultados foram computados tanto para o número total de micronúcleo, quanto para o número de células portadoras de micronúcleo. Devido à ocorrência de apenas uma célula contendo dois micronúcleos em seu interior, todos os resultados aqui descritos são relacionados tão somente a ocorrência de células com micronúcleo em seu interior.

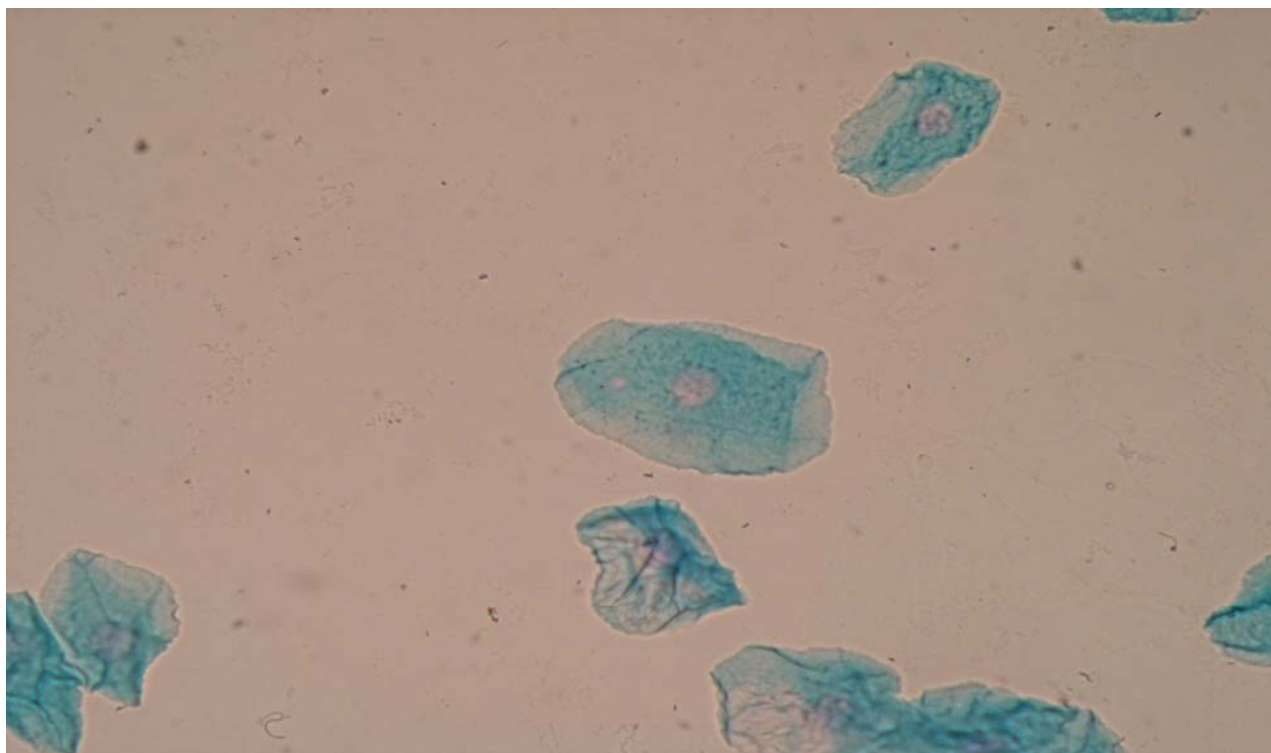


Figura 4a – Célula contendo Micronúcleo

Nota: A célula contendo o MN está disposta no centro do campo fotográfico. A fotografia aparece com a formação do micronúcleo na mesma linha horizontal e a esquerda do núcleo principal.

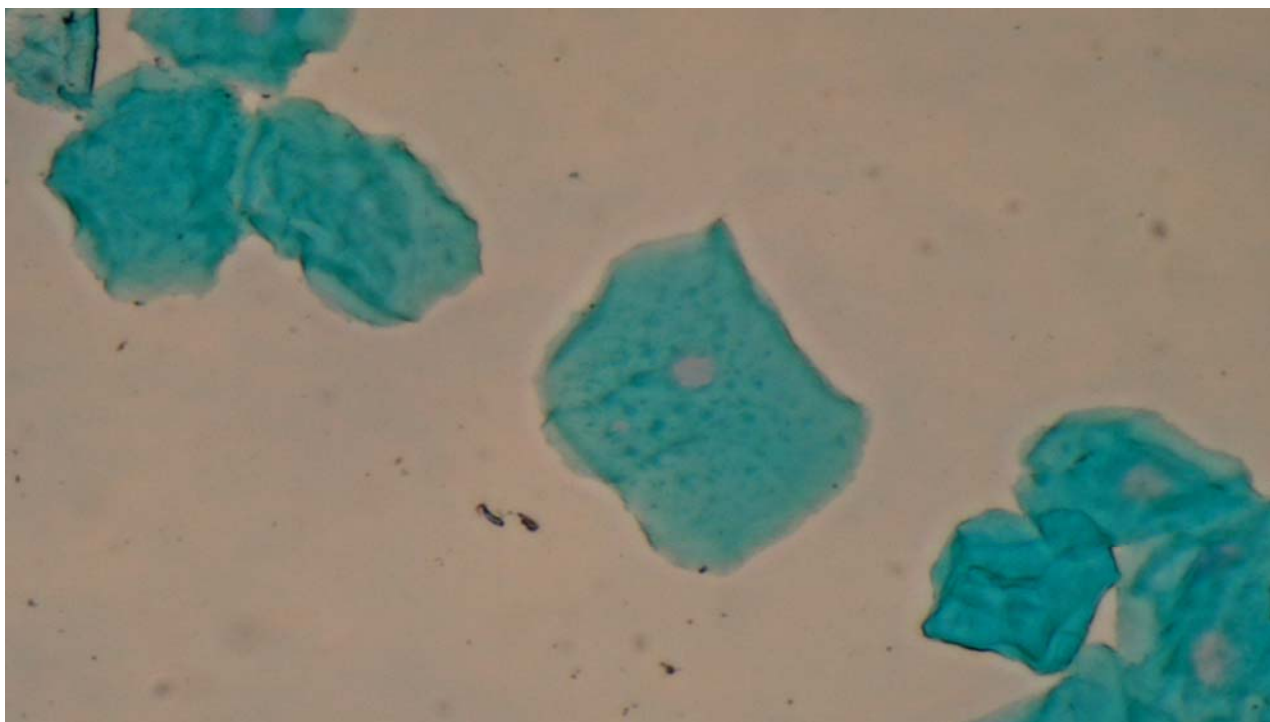


Figura 4b – Célula contendo Micronúcleo

Nota: A fotografia mostra uma formação de um pequeno e discreto MN à esquerda e abaixo de núcleo da célula.

5.1 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE (KAPPA) PARA AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE MN

O exame microscópico das células coletadas foi realizado por um único pesquisador “mascarado” a fim de evitar a variação inter-examinadores. Todavia, para avaliar a concordância da análise, foi realizado um teste de concordância K (*Kappa*) em que foram examinadas, em períodos distintos separados por 30 dias, 10 amostras aleatórias pertencentes a este estudo. Os resultados e os dados utilizados neste teste estão descritos na tabela 1.

As 10 amostras que receberam uma dupla avaliação pelo pesquisador foram retiradas do universo total de 40 amostras da primeira fase do estudo de maneira

aleatória. Este fato somado ao tempo de 30 dias separando as duas avaliações permitiu o descarte de qualquer identificação da amostragem pelo pesquisador.

A diagonal descendente da direita para a esquerda, demarcada com grifo, representa as avaliações que concordaram quanto ao número de MN existentes na amostra, salvo as ocorrências devido ao acaso da avaliação que também é levada em conta no resultado do teste. O coeficiente do teste K com valor 0.411 representa, segundo a própria escala arbitrária apresentada pelo idealizador do teste para interpretar o grau de concordância entre os exames, uma concordância moderada do examinador.

Tabela 1 – Tabela de contingência para o teste de concordância do operador para contagem de MN.

		1º exame							Soma
		0	1	2	3	4	5	6	
2º exame	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	1	0	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	1	2	0	0	0	3
	3	0	0	0	0	1	1	0	2
	4	0	0	0	0	1	0	0	1
	5	0	0	0	0	0	0	1	1
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma		2	1	1	2	2	1	1	10

Nota: Valor calculado de K (Kappa) 0.411.

5.2 PREVALÊNCIA DE MN – FASE UM DO ESTUDO

A frequência absoluta das células micronucleadas foi disposta na Tabela-2, apresentando o número de células micronucleadas encontrada no exame de cada indivíduo.

Tabela 2– Distribuição dos grupos, número da amostra pertencente ao grupo, idade e contagem do número de células micronucleadas por amostra de 3000 células.

Grupos	Amostra	Idade	Contagem de Micronúcleos
1- Abstêmios	1	21	1
	2	20	3
	3	19	0
	4	22	0
	5	23	0
	6	22	0
	7	24	4
	8	20	0
	9	20	3
	10	19	5
2- Alcoolistas	1	19	1
	2	18	5
	3	25	3
	4	22	0
	5	23	2
	6	21	7
	7	22	0
	8	23	4
	9	20	0
	10	21	3
3- Aparelho	1	18	2
	2	18	3
	3	22	6
	4	23	6
	5	20	3
	6	21	4
	7	19	7
	8	20	5
	9	20	1
	10	20	11
4- Fumantes alcoolistas	1	20	5
	2	20	0
	3	21	4
	4	22	6
	5	22	7
	6	21	1
	7	20	3
	8	24	0
	9	19	6
	10	21	11

Devido à homogeneidade da idade dos voluntários (20,4), a média de idade dos grupos (Tabela 3) apresentou uma variação pequena, de 2,3 anos, entre os grupos com menor e maior média. Os dados postados na tabela 3 apresentam ainda dados referentes à mediana e à média das contagens de MN, sendo que ambas,

apresentam uma discrepância grande entre os grupos, tendo valores variando de 0,5 a 4,5 para mediana e de 1,6 a 4,8 para média.

A disposição dos valores de freqüência de MN por 1000 células (Tabela 3) apresentou a seguinte ordem: 0,53 (Grupo 1) < 0,83 (Grupo 2) < 1,43 (Grupo 4) < 1,6 (Grupo 3). Embora estes valores não sirvam como dados estatísticos, acabam tendo sua importância na comparação descritiva entre dados obtidos na literatura assim como para comparação da média esperada na população.

A comparação dos valores dos postos médios por meio do teste de variância não paramétrico de *Kruskal-Wallis* verificou a existência de diferença estatisticamente significativa ($p = 0,043$) entre os quatro grupos. Para que fosse identificado entre quais grupos existe diferença foi realizado a comparação entre pares de grupo pelo teste de *Mann-Whitney*. Os resultados apontam diferenças estatística entre os grupos 1 e 3 ($p \leq 0,01$) e entre os grupos 1 e 4 ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Análise descritiva dos grupos com idade média, número de amostragem, mediana, média, desvio padrão e posto médio. Análise de variância não paramétrica entre os quatro grupos (*Kruskal-Wallis*) e grupo a grupo (*Mann-Whitney*).

Grupo	Idade	n	Mediana	Média ± DP	Freqüência de MN por 1000 células	Posto Médio
1	19,1	10	0,5	1,6±1,96	0,53	26,65
2	21,4	10	2,5	2,5±2,37	0,83	13,50
3	20	10	4,5	4,8±2,9	1,6	17,65
4	21,1	10	4,5	4,3±3,47	1,43	24,20

Diferença entre os grupos H (χ^2) = 8,153
p = 0,043 (*Kruskal-Wallis*)

Notas: * diferenças significante entre os grupos 1 e 3 (*Mann-Whitney* $p \leq 0,01$)

° diferenças significante entre os grupos 1 e 4 (*Mann-Whitney* $p \leq 0,05$)

5.3 INCIDÊNCIA DE MN – FASE DOIS DO ESTUDO

A tabela 4 demonstra as frequências absolutas da contagem de MN para os 40 indivíduos, ao início do experimento e após o período de tratamento de 10 dias, agrupados de acordo com a modalidade de tratamento realizada.

Tabela 4 – Disposição das contagens absolutas de MN nos momentos inicial e final do experimento, organizadas em grupos distintos conforme o tratamento recebido.

Tratamento	Contagem inicial de MN	Contagem após tratamento
1 – Óleos essenciais	5	3
	7	9
	6	6
	3	4
	0	0
	1	0
	0	2
	3	3
	6	5
	7	6
2 – Álcool	6	6
	0	2
	5	7
	7	7
	3	5
	0	0
	0	3
	3	5
	4	5
	11	9
3 – Álcool + Clorexidina	4	3
	3	1
	1	2
	2	3
	0	0
	0	3
	4	4
	2	3
	3	3
	1	2
4 -Clorexidina	0	1
	1	0
	11	5
	0	1
	4	6
	3	5
	0	1
	5	7
	6	5
	5	4

A análise estatística dos diferentes grupos foi realizada com o teste não paramétrico de *Wilcoxon* comparando os dados pareados de cada modalidade de tratamento em momentos distintos, inicial e final. Os diferentes tratamentos não produziram nenhuma mudança significativa da freqüência de células micronucleadas sendo, inclusive, que para os grupos T 1 (Óleos essenciais) os valores de média permaneceram exatamente os mesmos nos momentos inicial e final. A maior diferença encontrada, porem não significativa ($p = 0,079$) foi para o grupo T 2 (álcool).

Tabela 5 – Comparação inicial e final para cada modalidade de tratamento para Média e Desvio Padrão, Posto Médio, Soma dos Postos e valor de Z e p para o teste de *Wilcoxon*.

Grupo		Média±DP	Mediana dos postos	Posto médio	Soma dos postos	Z	Significância (p)
T 1	Inicial	3,8±2,7	4	5,75	20,50	-0,732	0,464
	Final	3,8±2,8	3,5	5,13	34,50		
T 2	Inicial	3,9±3,5	3,5	4,00	24,00	-1,754	0,079
	Final	4,9±2,6	5	4,00	04,00		
T 3	Inicial	2,0±1,4	2	3,80	19,00	-0,877	0,380
	Final	2,4±1,1	3	4,50	09,00		
T 4	Inicial	3,5±3,5	3,5	3,50	10,50	0,000	0,84
	Final	3,1±2,72	3	3,00	10,50		

6 DISCUSSÃO

Ao longo da vida de um indivíduo, inúmeros são os fatores a que se encontra exposto. A atuação de substâncias químicas, agentes físicos e biológicos associada a fatores genéticos herdados ou não, pode agir sobre células normais e aumentar a frequência de aparecimento de mutações celulares que estão correlacionadas ao desenvolvimento dos tumores. Portanto, um estímulo patológico pode ocasionar a divisão caótica e desenfreada das células de um local gerando assim um crescimento tecidual autônomo que foge dos padrões genéticos e fisiológicos (BORAKS, 1999).

Os resultados obtidos com a análise de células micronucleadas permitem relacionar os fatores agressores existentes no ambiente bucal com as alterações cromossômicas condizentes com a pré-disponibilidade ao desenvolvimento de neoplasias bucais.

A organização deste trabalho em duas fases permitiu o estudo de vários agentes químicos e físicos atuantes na cavidade bucal. A primeira fase, consistida de um estudo transversal, permitiu a avaliação de agentes químicos, provenientes dos hábitos dos voluntários estudados, como o fumo e o álcool de bebidas, e físicos provenientes da intervenção profissional, como é o caso da utilização de aparelhos ortodônticos. A segunda fase, consistida de um estudo clínico paralelo duplo cego, permitiu a investigação da ação dos agentes químicos existentes na composição dos colutórios

buciais, como os óleos essenciais, o álcool e a clorexidina, sobre a formação de MN na mucosa bucal.

Estatisticamente os resultados apontaram uma prevalência maior de células micronucleadas para o grupo dos usuários de aparelho ortodôntico e para o grupo de fumantes alcoolistas, ambos quando comparados ao grupo controle (abstêmios).

Dentre os objetivos da pesquisa a incorporação de um grupo exclusivamente de voluntários que utilizavam aparelhagem ortodôntica visou representar um universo de situações em que o trauma mecânico perfaz uma ação física constante sobre as células epiteliais. Em uma primeira análise, a verificação de uma maior prevalência de MN em usuários de aparelhos ortodônticos, nos chama atenção pela correlação positiva que temos entre presença de MN e alterações cromossômicas predisponentes a neoplasias. Dentro desse aspecto, a ação física de trauma representada pelo aparelho ortodôntico deve ser similarizada a situações bucais em que também temos a presença constante de trauma e que apresentam um vasto histórico de predisposição ao desenvolvimento de neoplasias. O exemplo clássico dessa correlação é ação de próteses mal adaptadas, câmeras de sucção, próteses quebradas, no desenvolvimento do câncer bucal (TOMMASI; GARRAFA, 1980). Obviamente, estas condições clínicas não podem ser apontadas como causa única direta do desenvolvimento de lesões cancerosas. A diversidade do ambiente bucal nos faz avaliá-las como co-fatores predisponentes, assim como dentro da presente pesquisa não podemos isolar os resultados dos grupos como causa única do aumento da frequência de células micronucleadas. Portanto, para comparação da hiperqueratose desenvolvida pelo

aparelho ortodôntico ao trauma de algumas situações clínicas deve ser feita alguma observações.

A hiperqueratose irritativa como o próprio nome indica, é uma hiperplasia da camada superficial de queratina provocada por trauma mecânico de baixa intensidade (BÓRAKS, 1999). A hiperqueratose por atrito desenvolve-se na mucosa bucal em resposta a irritação de baixa intensidade, crônica (CAWSON et al., 1997). A atrição ou fricção contra uma área da mucosa bucal pode resultar em uma lesão branca hiperkeratótica, análoga a um calo cutâneo. A resposta tecidual representa uma proteção contra um traumatismo contínuo de baixa intensidade (REGEZI; SCIUBBA, 1991). É reversível, uma vez removido o agente causal a hiperqueratose desaparece (BÓRAKS, 1999). Assim, de acordo com Tommasi e Garrafa (2002), a hiperqueratose pode ser resumida como sendo uma lesão branca da mucosa bucal, caracterizada histologicamente por aumento da camada de ceratina, com tendência à regressão e cura espontânea, uma vez removido o agente causador, quase sempre irritativo (fumo, álcool, arestas dentárias cortantes, aparelhos ortodônticos, próteses).

Nas lesões hiperkeratóticas friccionais simples não se observam alterações epiteliais displásicas (REGEZI; SCIUBBA, 1991). Há uma espessa camada de ortoqueratina, seguidas vezes com aumento da camada de células granulares e grau variável de acantose. Frequentemente o cório mostra-se infiltrado por células inflamatórias crônicas (CAWSON et al., 1997). A hiperproliferação por si só aumenta a exposição à outros agentes carcinogênicos e, em se tornando permanente, é o primeiro passo para um processo de transformação maligna (SEITZ; PÖSCHL; SIMANOWSKI, 1998).

Em um estudo retrospectivo sobre o risco do câncer de vias aerodigestivas superiores, o uso de próteses dentárias não foi associado a um risco aumentado, todavia história de úlceras orais secundárias à má adaptação e má higiene oral devido à baixa frequência de escovações dentárias foram tidos como fatores de risco (VELLY; FRANCO; SCHLECHT, 1998).

A composição de uma amostra experimental exclusivamente por alunos de odontologia com a divisão dos voluntários de acordo com variáveis independentes exclusivas para alguns grupos, como o fumo e o uso de aparelho, procurou criar homogeneidade das amostras diminuindo a possível ação de vieses. Embora fatores como a predisposição genética intrínseca do indivíduo, microbiota bucal, hábitos de alimentação acabam sendo fatores sabidamente influentes na manifestação de MN.

A falta ou deficiência de qualquer nutriente pode ser prejudicial ao organismo humano, tornando-o mais susceptível a ação de substâncias carcinogênicas. (PETRIDOU, 2002).

Em um estudo sobre o consumo freqüente de uma dieta rica em gordura animal saturada e risco de desenvolvimento de câncer oral os autores verificaram a presença de uma relação positiva entre essas duas variáveis. Sugeriram que programas de promoção de saúde poderiam abordar a adoção de hábitos alimentares para proporcionar uma mudança no risco de desenvolvimento de câncer oral e objetivar conseqüentemente efeitos benéficos para o controle de diabetes, doenças cardiovasculares e outros cânceres (TOPORKOV; ANTUNES; TAVARES, 2004). Existe redução de 20 a 60% no risco para o câncer oral na adoção de uma dieta rica em vegetais verde-amarelos e frutas frescas assinalando o efeito protetor proporcionado pelos micro-nutrientes presentes nesses alimentos (STEWART; KEYHUES, 2003).

A agressão direta ao DNA celular tem sido atribuída a alguns tipos de vírus no processo da carcinogênese do carcinoma de células escamosas. O Papiloma vírus humano (HPV) tem sido estudado quanto ao possível envolvimento nesse processo (SUGIYAMA et al., 2003), assim como a *Cândida Albicans* (FIELD; FIELD; MARTIN, 1989; KIGNEL; BIRMAN, 2000)

Harris et al. (2003) estudaram a associação entre álcool e lesões orais e não encontraram relação de risco do álcool isoladamente. Quando analisado o sinergismo álcool/tabaco, observaram um incremento no risco de desenvolvimento de lesões orais.

No presente estudo o grupo constituído por fumantes alcoolistas apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) na freqüência de micronúcleos quando comparado ao grupo de abstêmios. Historicamente a literatura apresenta uma vasta revisão associando álcool e fumo como o câncer.

O tabaco libera quantidades consideráveis de nitrosaminas, que dão forma a um grupo de carcinógenos químicos principais entre os mais de 4000 produtos químicos identificados no fumo do tabaco (STICH; ROSIN, 1983). Os nitrosaminas específicas do tabaco são solúveis na saliva, sendo potentes carcinogênicos, responsáveis pela indução de aberrações cromossômicas, o que resulta no aumento freqüências de MN (SUHAS, 2004). O efeito sinérgico entre álcool e fumo decorre do possível aumento da permeabilidade tecidual dos compostos da combustão do fumo quando associado ao álcool (BARAONA; GUERRA; LIEBER, 1981).

Pacientes fumantes e alcoolistas acabam por constituir uma população com uma incidência maior ao câncer bucal (BOFFETTA et al., 1992). Em estudos epidemiológicos demonstrou-se que indivíduos alcoólatras apresentavam risco de câncer

6,4 vezes maior que indivíduos abstêmios de álcool, fato este decorrente do efeito sinérgico do álcool aos componentes do cigarro, como o Benzopireno e o 4-(methilnitrosamina)1(3-pyridyl), sabidamente agentes carcinogênicos (WELLS et al., 1997).

A presença de MN ocorre de forma concomitante com outras anomalias metanucleares. Alterações degenerativas, apoptóticas e carcinogênicas tem sua freqüência correlacionada não só a presença do agente agressor, mas também a sua intensidade. A ação clastogênica causada pelo álcool e pelo fumo pode configurar quadros de agressão fraca, moderada e forte conforme descrito por Ramires e Saldanha em 2002;

Na agressão fraca ocorre o Favorecimento o aparecimento de células em processo de cariólise (CL) - que é uma dissolução do núcleo em três ou quatro fragmentos menores em decomposição (SNEL, 1985), sendo similar ou processo fisiológico de renovação do epitélio. A Agressão de baixa intensidade permite o correto reparo tecidual na qual as células agredidas podem, no decorrer da migração para a superfície do epitélio, sofrerem lise completa desaparecendo da camada de coleta celular (STICH; ROSIN, 1983). Já na agressão moderada a ação pode ocorrer nas células epiteliais da camada basal, afetando diretamente o núcleo celular. No entanto, estas células são mantidas no tecido enquanto viáveis, apresentando alterações do tipo broken-egg (BE) e ou de MN (BHATTATHIRI et al., 1998). A agressão forte seria induzida pela ação sinérgica de dois ou mais agentes clastogênicos, a alteração nuclear poderia ser tão intensa a ponto de provocar o à perda do controle apoptótico, podendo ainda levar a formação de mais de um MN por célula (STICH; ROSIN, 1983).

A contagem de MN subestima metodologicamente a sua ocorrência real. Isto acontece porque, durante o processo de divisão celular, o fragmento cromossômico ou cromossomo inteiro perdido do núcleo pode: a) ser reincorporado a um dos dois núcleos filhos, b) ir para fora do citoplasma de ambas células filhas, ou c) ficar no citoplasma de uma das células filha na forma de micronúcleo. Nos dois primeiros casos, não se observa perda do material cromossômico. (RAMIREZ; SALDANHA, 2002)

A frequência de MN está correlacionada diretamente com a probabilidade da ocorrência de alterações do DNA celular, sendo a alteração nuclear mais correlacionada com o processo de carcinogênese (ROBERTS, 1997). Embora não indique necessariamente a existência de uma pré-neoplásica (RAMIRES; SALDANHA, 2002).

A aplicações de comparações de frequência de MN entre diferentes populações encontram discrepância na literatura (TABELA 6). Já que se torna difícil compatibilizar as diferenças metodológicas entre os inúmeros laboratórios (ADHVARYU; DAVE; TRIVEDO, 1991), sugere-se que produzam controles citogeneticamente mais padronizados nas investigações a fim de não somente diminuir os erros aleatórios, isto é, a variabilidade entre os observadores, como também eliminar os erros sistemáticos decorrentes da análise microscópica (GAREWAL et al, 1993).

Tabela 6 - Frequência de MN utilizadas como referências controles em diferentes investigações de mutagenicidade descritas na literatura

População controle de	idade (média ou intervalo)	sexo	Nº de indivíduos	Nº células analisadas por indivíduo	Frequência de MN por 1000 células	Autor
fumantes e alcoólicos	20->50		15	mínimo de 500	3,20	Stich e Rosin, 1983
mascadores de fumo com betel			34	minimo de 500	4,00	Stich; Stich e Rosin., 1985
Mascadores de noz de areca	32,70	M/F	15	Mínimo de 1000	1,93	Adhvaryu; Dave e Trivedi, 1991
pacientes com carcinomas orais	37,68	MIF	25	;03000	3,80	Sarto et al., 1987
trabalhadores de indústria de tintas	33,00	M	19	3000	0,47	Díaz; Fonseca e Fernandez, 1990
usuários de rapé	61,40	F	15	conversão para 1000	1,58	Tolbert; Shy e Allen, 1991
mascadores de noz de betel			14	mínimo de 500	5,00	Stich; Stich e Rosin, 1985
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	17-42 b	MIF	29	1000	1,75	Kayal et al., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	15-45 ^b	MIF	10	1000	1,83	Kayal et al., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	20-25 d	F	13	1000	1,00	Kayal et al., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	20-25 c	MIF	15	1000	1,90	Kayal et al., 1993
enfermeiros expostos á drogas neoplásicas	34,60	MIF	25	1000	0,17	Machado-Santelli et al.,1994
indivíduos saudáveis'	30-42	F	5	de 2500 a 5600	1,62	Titenko-Holland et al.,1994
trabalhadores expostos ao benzeno	47 ;27	M	15	1500	2,18	Surrallés et al., 1997
usuários de rapé			19	1,348	1,80	Roberts, 1997

Nota: ' grupo controle não utilizado em comparação com população exposta; b,c,d regiões da Índia; * testes não paramétricos.

O teste do micronúcleo pode ser instrumento de triagem diagnóstica para prevenção e conduta clínicas em indivíduos sob risco carcinogênico tais como os expostos a agentes biotóxicos ambientais. Por ser uma técnica simples, prática, não invasiva e de baixo custo permite, com facilidade, o monitoramento individual de

pacientes com carcinomas orais, sua evolução clínica, recidivas, surgimento de novas neoplasias, lesões leucoplásicas bem como alterações tóxicas causadas por biopoluentes mutagênicos, através do controle intra-individual de diferentes tecidos e inter-individual de populações. (RAMIREZ et al., 1999).

7 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados provenientes da metodologia empregada neste estudo, podemos concluir que:

- 1- A comparação da freqüência de micronúcleos nas regiões de mucosa jugal indica que o trauma mecânico, assim como a ação conjunta do fumo e álcool, podem contribuir estatisticamente para o desenvolvimento de Micronúcleos;
- 2 - A utilização de colutórios bucais, em curto prazo, não foi capaz de causar aumento na freqüência de Micronúcleos.

REFERÊNCIAS

ADHVARYU, S.G.; DAVE, B. J.; TRIVEDI, A. H. Cytogenetic surveillance of tobacco-areca nut (mava) chewers, including patients with oral cancers and premalignant conditions. **Mutat Res**, v. 261, n. 3, p. 41-49, 1991.

AGOSTINI, J.M.S.; OTTO, P.A; WAJNTAL, A Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed in individual to plasma from at-risk groups. **Rev Brasil Genet**, v. 19, n. 4, p. 641-646, 1996.

ANWAR, W. A. Assessment of cytogenetic changes in human populations at risk in Egypt. **Mutat Res**, v. 280, p. 215-223, 1992.

BAGWE, A. N.; BHISEY, R. A. Occupational exposure to tobacco and resultant genotoxicity in bidi industry workers. **Mutat Res**, v. 299, p. 103-109, 1993.

BARAONA, H.; GUERRA, M.; LIEBER, C.S. Cytogenetic damage of bone marrow cells produced by chronic alcohol consumption. **Life**, v. 29, p. 1797-1802, 1981.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1994.

BELLIËN, J. A. M et al. Standarization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 1, p. 2395-2400, 1995.

BHATTATHIRI, V. N. et al. Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells. **Acta Cyto/**, v. 42, n. 5, p. 1084-1090, 1998.

BOFFETTA, P. et al. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v. 52, p. 530-533, 1992.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals. **Humangenetik**, v. 11, n. 1, p. 35-54, 1970.

BORAKS, S. **Diagnóstico bucal**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

BREWEN, J. G.; PRESTON, R. J. Analysis of chromosome aberrations in mammalian germ cells. **Mutat Res**, v. 46, n. 5, p. 62-86, 1978.

CAWSON, R. et al. **Atlas colorido de enfermidades da boca** - correlações clínicas e patológicas. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997.

CERQUEIRA, E. M. M. et al. Genetic damage in exfoliated cell from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutation Res**, v. 562, p. 111-117, 2004.

DEL REGATO, J.; SPJUT, H. **Oral cavity**: cancer diagnosis, treatment and prognosis. 5.a edición. St. Louis: The Cv Mosby Company, 1977.

DIAZ, S.; FONSECA, G; FERNANDEZ, I. Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. **Hereditas**, v. 1113, p. 77-80, 1990.

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev Ass Méd Brasil**, v 46, n 3, p. 207-11, 2000.

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutat Res**, v 392, p. 5-10, 1997.

FEINMAN, L.; LIEBER, C. S. Toxicity of ethanol and other components of alcoholic beverages. **Alcohol Glin Exp Res**, v. 12, p. 2-6, 1988.

FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FIELD, E.; FIELD, J.K.; MARTIN, M.V. Does candida have a role in oral epithelial neoplasia. **J Med Mycol**, v. 27, p. 277-294, 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichs2a.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2005.

FRANCESCHI, S. et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. **Cancer Res**, v. 50, p. 6502-6507, 1990.

GATTÁS, G. J. F et al. Oral mucosa micronuclei and methanol fuel. **Occup Med**, v. 51, n. 2, p. 107-113, 2001.

GAREWAI, H. S. et al. Clinical experience with the micronucleus assay. **J Cell Biochem**, v. 17, Suppl.F, p. 206-212, 1993.

HARRIS, M. et al. Alcohol and inhibitory receptors unsuspected specificity from a nonspecific drug. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n 1, p. 2-3, 2004

HOMANN, N. et al. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. **Carcinogenesis**, v. 18, p 1739–1743, 1997.

HOMANN, N. et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: A microbiological approach to oral cavity cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p.663–668, 2000.

HOMANN, N. et al. Poor dental status increases the acetaldehyde production from ethanol in saliva. A possible link to the higher risk of oral cancer among alcohol consumers. **Oral Oncol**, v. 37, p.153–158, 2001.

HEDDLE, J. A. et al. The introduction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 123, p. 118, 1983.

HEDDLE, J. A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environ Mol Mut**, v.18, p. 277-291, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/>. Acesso em: 10 abr. 2005.

KAYAL, J. J. et al. Incidence of micronuclei in oral mucosa of users of tobacco products singly or in various combinations. **Mutagenesis**, v. 8, n. 1, p. 31-33, 1993.

KIGNEL, S.; BIRMAN, E. G. Aspectos fúngicos do câncer bucal. **Rev Bras Câncer**, v. 46, n. 3, p. 279-82, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat Res**, v. 540, p. 153-163, 2003.

KLIESCH, U.; ADLER, I. D. Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. **Mutat Res**, v. 74, p. 160, 1980.

KROGH, P. The role of yeast in oral cancer by means of endogenous nitronisation. **Acta Odont Scand**, v. 48, p. 85-88, 1990 .

MACHADO-SANTELLI, G .M. et al. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutat Res**, v. 322, n. 203-208, 1994.

MASHBERG, A.; BARSA, P.; GROSSMAN, M. L. A study of the relationship between mouthwash use and oral and pharyngeal cancer. **J Am Dent Assoc**, v. 110, n. 5, p. 731-734, 1985.

PETRIDOU E. et al. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. **Ann Nutr Metab** v. 46, n 3-4, p. 147-151, 2002.

RAMIREZ, A; SALDANHA, P. H. Análise crítica de grupos controle no teste de Micronúcleo em mucosa bucal. **Genet. Mol Biol**, v. 21, sup. 3, p. 140, 1998.

_____. Micronucleous investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet Mol Res**. v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RAMIREZ, A et al. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. In: VARMA, A.K. **Oral Oncology**. Delhi, Índia. MacMillan, 1999. p. 199-204.

REGEZI, J.; SCIUBBA, J. **Patologia bucal** - correlações clinicopatológicas. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991.

REIS, S. R. A. et al. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. **Pesq Odontol Brasil**, v.16, n. 3, p. 221-225, 2002.

ROBERTS, O.M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. **Acta Cytol.**, v. 41, n. 4, p. 1008-1014, 1997.

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.

SAVOLIDI-BABOSA, M.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S. Influence of novobiocin on γ -irradiated G-lymphocytes as analyzed by cytogenetic endpoints. **Genet Mol Biol**, v. 22, n. 2, p. 217-223, 1999.

SCHMID, W. The micronuclei test. **Mutat Res**, v. 31, p. 1-15, 1975.

SEITZ, H.K.; PÖSCHL, G.; SIMANOWSKI U. A. Alcohol and cancer. **Recent Dev Alcohol**, v. 14, p. 67-95, 1998.

SNELL, R. S. **Histologia clínica**. Rio de Janeiro. Interamericana. 1985.

STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. **World Cancer Report**. Lyon: IARC Press, 2003.

STICH, H.F.; CURTIS, J.R.; PARIDA, B.B. Application of the micronucleous test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int J Cancer**, v. 30, p. 553-559, 1982.

STICH, H.F.; ROSIN, M.P. Quantitating the synergistic effects of smoking and alcohol consumption with the micronucleous test on human buccal mucosa cells. **Int J Cancer**, v. 31, p. 305-308, 1983.

STICH, H.F.; STICH, W.; ROSIN, M.P. The micronucleus test on exfoliated human cells. In: MUHAMMED, A; VON BORSTEL, R.C. **Basic and applied mutagenesis**. New York: Plenum Press, 1985. p. 337-342.

SUGIYAMA M et al. Detection of Human papillomavirus-16 and HPV-18 in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, p. 594-600, 2003.

SUHAS et al. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutat Res**, v. 561, p. 15–21, 2004.

SURRALLÉS, J. et al. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 4, p. 817-823, 1997.

TITENKO-HOLLAND, N. et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutat Res**, v. 417, p. 101–114, 1998.

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**, v 134, n. 8, p. 840-850, 1991.

_____. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat Res**, v. 271: p. 69-77, 1992.

TOMMASI, A. F.; GARRAFA, V. **Câncer Bucal**. São Paulo: Medisa, 1980.

TOPORKOV, T. N.; ANTUNES, J. L. F.; TAVARES, M. R. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. **Oral Oncol**, v 40, p. 925-931. 2004

VANDERKERKEN, K. et al. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. **Mutagenesis**, v. 4, n. 1, p. 6-11, 1989.

VELLY A. M.; FRANCO E. L.; SCHLECHT N. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncology**, v. 34, p. 284-91, 1998.

VINE M. F. Micronuclei. In: HULKA B. S.; WILCOSKY T. C.; GRIFFITH J. D. **Biological markers in epidemiology**. New York : Oxford Univ, 1990.

VISAPÄÄ, J.; TILLONEN, J.; SALASPURO, M. Microbes and Mucosa in the Regulation of Intracolonic Acetaldehyde Concentration During Ethanol Challenge. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, n. 4, p. 322-326, 2002.

WEAVER A.; FLEMING S. M.; SMITH, D. B. Mouthwash and oral cancer: carcinogen or coincidence? **J Oral Surg**, v. 37, n. 4, p. 250-253, 1979.

WELLS P. G. et al. Oxidative damage in chemical teratogenesis. **Mutat Res**, v. 396, p. 65-78, 1997.

WINN, D. M., et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 51, n. 11, p. 3044-3047, 1991.

APÊNDICE - Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, RG _____, abaixo qualificado, DECLARO para fins de participação em pesquisa, na condição de que fui devidamente esclarecido da minha participação no do Projeto de Pesquisa intitulado **Avaliação de Micronúcleos em Células Epiteliais Bucais** desenvolvido pelo Cirurgião Dentista especialista em periodontia Ricardo Kern do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa quanto aos seguintes aspectos:

- a) Esta pesquisa se trata de uma pesquisa clínica na qual farei parte como paciente, ciente dos meus compromissos de seguir as orientações e cuidados a mim passados.
- b) Será realizado um breve exame clínico para que se possa efetuar a marcações sobre o índice de placa bacteriana e a coleta de células da mucosa bucal. O procedimento de coleta das células epiteliais da mucosa da bochecha é procedimento indolor, não invasivo e rápido realizado com uma leve fricção com uma escova de cerdas macias apropriada.
- c) O Pesquisador irá me fornecer os produtos de bochecho necessários gratuitamente. Disponibilizando seus telefones para que eu possa entrar em contato para relatar qualquer dúvida ou desconforto.
- d) Será realizada documentação sobre o consumo do total de álcool ingerido durante cada período da pesquisa, sendo ainda, que o pesquisador se compromete sobre o sigilo absoluto sobre os dados referentes a cada participante.
- e) Possuo a liberdade de me recusar a participar ou retirar meu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Nome:.....

RG:.....Data de nascimento:..... / / Sexo: M () F ()

Endereço: nº Apto:

Bairro:.....Cidade:.....Cep:.....Tel:.....

DECLARO, outrossim, que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto voluntariamente em participar desta pesquisa.

Assinatura do Declarante

ANEXO A – Questionário de consumo de bebidas alcoólicas

Qual é o seu consumo?

É importante saber o que seria uma unidade de álcool em cada dose que você consome, porque o que pode ser uma dose para você pode não ser uma dose efetivamente. Abaixo encontra-se uma tabela sobre o que seria considerada uma unidade de álcool em diferentes tipos de drinks:

- 1 copo de cerveja ou chopp
- 1/2 dose de pinga, whisky ou qualquer tipo de destilados (pinga, vodka, gin, cognac, etc)
- 1 copo típico de vinho
- 1 taça de champagnhe
- 1 cálice de licor ou vinho do porto

= 1 UNIDADE / 1 DOSE

Levando em conta o que seria uma unidade de álcool, preencha diariamente a tabela abaixo durante uma semana, escrevendo o número de doses ou unidades de álcool consumidas durante todo o dia. Não pense só na noite.

PERIGO: As doses em casa costumam serem mais generosas do que as doses do bar. Mesmo em alguns bares, o famoso “chorinho” pode significar uma segunda dose. Perceba realmente quantas doses estão sendo consumidas em um único copo.

<i>Dias da semana</i>	<i>Tipo de bebida</i>	<i>Unidades</i>	<u><i>Total</i></u> <u><i>Diário</i></u>
<i>Segunda-feira</i>			
<i>Terça-feira</i>			
<i>Quarta-feira</i>			
<i>Quinta-feira</i>			
<i>Sexta-feira</i>			
<i>Sábado</i>			
<i>Domingo</i>			

TOTAL SEMANAL = _____

ANEXO B – Questionário de hábitos

Nome: _____

Email: _____

Tipo de Hábitos

Faz uso de bebidas alcoólicas? () sim () não Já fez? () sim () não

Início do consumo: ____ anos Término do consumo ____ anos Abstinência: ____ anos

Tipo de bebida: _____

Intensidade do consumo: 1 (), 2 (), 3 (), 4 ()

Intensidade – 1 para cada dose de destilado ou para cada cerveja ou para cada ½ garrafa de vinho por dia, mas não todos os dias. Considera-se ainda, (1) para quem bebe somente nos finais de semana, (2) para quem bebe moderadamente durante a semana e fins de semana, (3) para quem bebe moderadamente intercalado com aumento de consumo, como por exemplo em fins de semana, (4) Para quem tem alto consumo todos os dias.

Fuma? () sim () não Já fumou? () sim () não

Início do tabagismo: ____ anos Término do tabagismo: ____ anos Abstinência: ____ anos

Tipo de cigarro/fumo _____

Intensidade do consumo: 1 (), 2 (), 3 (), 4 ()

Intensidade - (1) pouquíssima de 1-2 cigarros por dia; (2) menos que 10 cigarros; (3) entre 10-20 cigarros dia; (4) mais que 20 cigarros – 1 maço por dia.

Toma café: () Sim () Não

Frequência: () só pela manhã () 3x ao dia () várias

Medicação: () sim () não Tipo: _____ Tempo: _____

Antibiótico nos últimos 3 meses? () Sim Qual? _____

Bochecha com algum colutório específico? () Sim Qual? _____

Raios X: () Sim Quantidade: _____

Hábito de consumo de chá ou mate? () Sim Frequência: _____