UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RODRIGO DOS SANTOS ROCHA

AVALIAÇÃO DO USO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS COMO BIOMARCADOR PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER ORAL EM USUÁRIOS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E ANTI-SÉPTICOS BUCAIS

Feira de Santana, BA
2011

RODRIGO DOS SANTOS ROCHA

AVALIAÇÃO DO USO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS COMO BIOMARCADOR PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER ORAL EM USUÁRIOS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E ANTI-SÉPTICOS BUCAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Feira de Santana, BA
2011

Banca Examinadora

Evandro José Lima Rêgo
Prof. Dr.

Susie Vieira de Oliveira
Prof(a). Dr(a).

Prof(a) Dr(a). Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana, BA
2011

À minha querida Juliana por estar sempre ao meu lado
e me fazer acreditar que tudo é possível.

“Os obstáculos existem para aqueles
que não querem realmente superá-los”
Randy Pausch - A lição final

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me dado força e coragem para eu poder alcançar meus objetivos;

À Profª Eneida por ter me recebido de braços abertos desde a graduação, pelos ensinamentos, conselhos, orientação, paciência, pelas belas refeições e cafezinhos em sua casa e pelo carinho de mãe que só quem tem a sorte e o privilégio de conviver com ela conhece;

À José Roberto pelo apoio que sempre me deu desde a graduação até o mestrado sendo meu segundo (muitas vezes primeiro) orientador, pessoa que me deu tantos ensinamentos e "puxões de orelha" os quais ajudaram muito para que eu chegasse até aqui;

À Juliana Carvalhais pelo amor, paciência, carinho, apoio e por estar prestes a me dar o maior presente que se pode ganhar minha querida Laura, amo muito vocês;

Ao professor Evandro Rego e a professora Susie Vieira por me darem a honra de participar da banca examinadora;

Aos colegas do Gentox, Leonardo, Polyana, Gregory, Bruno, Maiza, Jeanderson, Lavínia, Cleiziane, Rosana pela ajuda na pesquisa e por tornar as análises mais agradáveis;

Aos Professores Isaac e Eduardo da odontologia que me ajudaram nas coletas nas clínicas odontológicas da UEFS;

Ao Professor Francisco de Assis (Chico), pela ajuda na submissão do projeto para o pedido da bolsa junto ao CNPq;

Aos amigos de feira, Hugo, Tony, Rita, Ricardo, Ranyere, Pedro, Tarciso, Jonáicon, Leilton, Mariana, Rafa, Camila... que de uma forma ou de outra me ajudaram, em especial a Grênivel Mota por ter me apoiado e incentivado para que eu fizesse a seleção e sempre foi um grande parceiro aqui em Feira;

Aos colegas de turma do mestrado Tony, Verônica, Rita, Vitor, Tarciso, Marciene, Isabela, Marciele, Eugênio (*in memoriam*)... por tornarem as aulas mais alegres;

À todos os Professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana pelos ensinamentos proveitosos;

À Helton secretário do PPGBiotec pela paciência e ajuda sempre presente nas horas em que precisávamos dele;

Às pessoas que constituíram a amostra da pesquisa, sem os quais nada disso teria acontecido;

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS pela aprovação do projeto;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Aos meus queridos pais Luciene e Dermival, por me apoiarem e acreditarem que poderia conseguir;

Aos meus queridos irmãos Glécio, Glecimário e Luana pelo carinho e companheirismo nas minhas idas à Retiro;

À todos os meus queridos amigos de Retiro que mesmo longe, estão sempre presente nas horas em que preciso, Principalmente os que me apoiaram e acreditaram (quando muitos duvidaram) quando começamos a longa empreitada dos estudos em Coité;

A minha nova família de Feira (a família de Juli) por me acolher como um membro desta, principalmente a Vitinho pelo amor e carinho que nos dá sempre que precisamos;

À Universidade Estadual de Feira de Santana pelo apoio e conhecimento.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	14
2	**REFERENCIAL TEÓRICO**	17
	2.1- Considerações gerais	17
	2.2- Fatores de risco para o câncer oral	17
	2.2.1- Consumo de tabaco	17
	2.2.2- Ingestão de bebidas alcoólicas	18
	2.2.3- Infecção pelo HPV	20
	2.2.4- Uso de anti-sépticos bucais	21
	2.2.5- Irritação traumática da mucosa oral e Má higiene oral	23
	2.3- Genética e câncer	24
	2.4- Detecção de danos genéticos _ o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas	26
	2.5- Ocorrência de micronúcleos em associação com a ingestão de bebidas alcoólicas	29
	2.6- Associação entre a ocorrência de micronúcleos e o uso de anti-séptico bucais	32
3	**OBJETIVOS**	34
	Geral	34
	Específicos	34
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	35
	4.1- Amostra	35
	4.2- Caracterização da amostra	35
	4.3- Obtenção e preparo do material para estudo citológico (Danos cromossômicos e Apoptose)	35
	4.4- Análise microscópica	36
	4.5- Elaboração do Banco de Dados	37
	4.6- Análise estatística	37
	4.7- Aspectos éticos da pesquisa	37

5 **RESULTADOS** 38
5.1- Caracterização da amostra 38
5.1.1- Idade 38
5.1.2- Gênero 38
5.1.3- Consumo de bebidas alcoólicas e uso de anti-séptico bucal 38
5.2- Análise citológica 43

6 **DISCUSSÃO** 45

7 **CONCLUSÕES** 50

REFERÊNCIAS 51

APÊNDICES 65

ANEXO 69

LISTA DE FIGURAS

1- Representação da incidência de neoplasia maligna da cavidade oral 14
2- Desenvolvimento gradual de um tumor maligno 25
3- Mecanismo de formação do Micronúcleo 27
4- Diagrama das alterações nucleares degenerativas e Micronúcleo 28
5- Diagrama ilustrando as vias para produção de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas 29
6- Fotomicrografias indicando a ocorrência de Micronúcleo (a), Cariorréxis (b), Cromatina condensada (c) e Picnose (d) 36
7- Frequência do consumo de bebida no GE2 39
8- Tipo de bebida consumida pelos usuários 39
9- Tempo de consumo 39
10- Frequência de uso do ASB 40
11- Tempo de uso (duração) de ASB 40
12- Frequência do consumo de bebidas alcoólicas 41
13- Tipo de bebida consumida pelos usuários 41
14- Tempo de consumo de bebidas alcoólicas 42
15- Frequência do uso do ASB no GE3 42
16- Duração do uso de ASB no GE3 43

LISTA DE TABELAS

1- Distribuição dos gêneros entre os Grupos 38
2- Ocorrência de Micronúcleo (MN) entre os Grupos 44
3- Ocorrência de Apoptose (AP) entre os Grupos 44

RESUMO

A ocorrência de alterações citológicas indicadoras de danos cromossômicos (Micronúcleos) e apoptose (somatório de Cariorréxis, Cromatina condensada e Picnose) em usuários de bebidas alcoólicas e/ou de anti-séptico bucal (ASB), foi avaliada através do Teste de Micronúcleo (MN) em células esfoliadas da mucosa oral, segundo protocolo de Tolbert *et al.* (1992), visando detectar efeitos genotóxicos destes hábitos e avaliar o uso deste teste como biomarcador de risco de câncer. A amostra analisada incluiu quatro grupos distintos de vinte indivíduos: três grupos expostos (GE) e um grupo controle (GC). O Grupo Exposto 1 (GE1) foi formado por usuários de ASB; o GE2 por consumidores de bebidas alcoólicas e o GE3 por usuários de ASB e de bebidas alcoólicas. Com o material coletado, por raspagem gentil da mucosa oral, foi feito esfregaço em lâmina. O preparo deste material envolveu fixação em metanol/ácido acético (3:1) e coloração/contra coloração com Reativo de Shiff e Fast Green. A análise citológica dos *endpoints* foi feita em teste cego em um total de 2000 células. A avaliação estatística dos resultados revelou que a ocorrência de danos cromossômicos e apoptose foi significativamente maior entre os indivíduos que constituíram o GE1 e GE3 quando comparados ao GC ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não foi detectada significância estatística entre os grupos expostos quando comparados entre si quanto à ocorrência de danos cromossômicos e apoptose. Maior ocorrência de apoptose ($p < 0,001$), mas não de danos cromossômicos, foi observada nos indivíduos do GE2 quando comparados ao GC. Os resultados obtidos sugerem que os ASB, tanto isoladamente quanto em associação com bebidas alcoólicas, induzem efeitos genotóxicos traduzidos por danos cromossômicos e apoptose. Os efeitos genotóxicos conseqüentes à ingestão de bebidas alcoólicas isoladamente são evidenciados pelo estímulo a apoptose. Estes resultados suscitam a realização de estudos adicionais para consubstanciar o uso do Teste de Micronúcleo como biomarcador de risco de câncer, mas são suficientes para desestimular o uso indiscriminado de anti-séptico bucal e bebidas alcoólicas.

Palavras-chave: Micronúcleo. Apoptose. Bebidas alcoólicas. Anti-séptico bucal. Genotóxico. Mutagenese.

ABSTRACT

Chromosomal damage (Micronucleus) and apoptosis (sum of Karyorrexis, Condensed chromatin and Picnosis) were analyzed in users of mouthwashes and/or alcoholic beverages using the Micronucleus Tests in exfoliated cells from oral mucosa according Tolbert *et al.* (1992) protocol, aiming evaluate both the genotoxic effects of these habits and the use of this test as biomarker of cancer risk. Sample analyzed included four groups of individuals, three exposed groups (GE) and a control group (GC), each one formed by twenty individuals. Exposed group 1 (GE1) was formed by users of mouthwashes; GE2 by drinkers and GE3 by users of both. Smears were done with cells collected by gentile scraping of cheek and were fixed in methanol/acetic acid (3:1) solution and stained and counterstained, respectively, with Schiff and Fast green. Endpoints were computed in two thousand cells in a blind fashion. Statistical analysis showed that chromosomal damage and apoptosis were significantly higher in individual of GE1 and GE3 as compared with GC ($p<0,005$ and $p< 0,001$, respectively). Was not observed significant difference in chromosomal damage and apoptosis as compared just exposed groups. Apoptosis occurrence, but not chromosomal damage was significantly higher in individuals of GE2 when compared with GC. These results suggest that mouthwashes alone or in association with alcohol beverage ingestion induce genotoxic effects manifested as chromosomal damage and apoptosis. Alcoholic beverages are effective in stimulate the apoptotic process. More studies are necessary to establishing useful of the Micronucleus Test as biomarker of cancer risk, but the results here described are enough to avoid indiscriminate use of mouthwashes and alcoholic beverages.

Keywords: Micronuclei. Apoptosis. Alcoholic beverages. Mouthwashes. Genotoxic. Mutagenesis.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que se apresentam em ascensão na sociedade moderna (HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005; SAILAJA *et al.*, 2006). No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2010, foi de 489.270 casos novos da doença (INCA, 2010). Diversos autores têm relacionado fatores que contribuem para este fato, dentre os quais se destacam o aumento da expectativa média de vida, hábitos alimentares, alterações ambientais e estilo de vida (BOLOGNESI ; MORASSO, 2000; BLOCHING *et al.*, 2000; DEVI *et al.*, 2000; HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005; SAILAJA *et al.*, 2006).

A despeito do aumento geral na incidência de câncer, alguns tipos da doença são mais comuns. O câncer bucal juntamente com o de faringe se constitui na sexta neoplasia mais freqüente em todo o mundo (WARNAKULASURIYA, 2008), tendo incidência particularmente elevada nos países em desenvolvimento (PETERSEN, 2003; STEWART ; KLEIHUES, 2003). No Brasil, esta neoplasia foi a oitava mais frequente entre os homens no ano de 2008 (SBC, 2008) e segundo o INCA (2010) estavam previstos para o ano de 2010, 14.120 novos casos, afetando 10.330 homens e 3.790 mulheres (Figura 1).

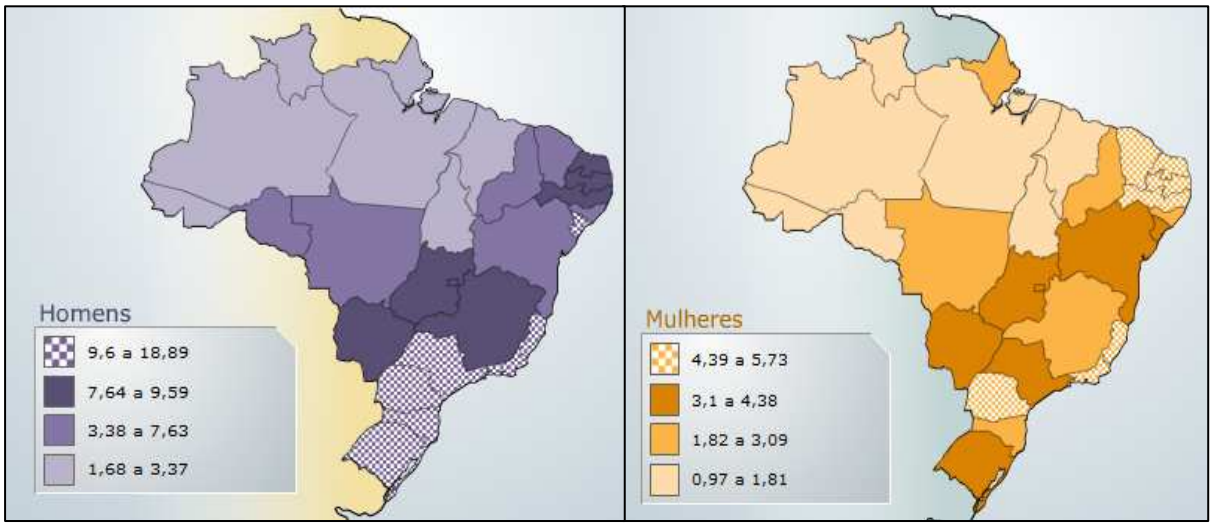

Fig. 1 Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da cavidade oral por 100.000 habitantes estimadas para o ano 2010, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2010).

O câncer oral quando detectado precocemente apresenta um índice de cura maior em relação a outros tipos de câncer (MASHBER, 1989). Entretanto, a prevenção se constitui na melhor opção, independente do tipo de neoplasia. As medidas preventivas dependem, contudo, primariamente da identificação de fatores associados ao desenvolvimento da doença.

Diversos fatores de risco têm sido identificados em associação com o desenvolvimento do câncer oral e dentre eles o hábito de fumar é o mais consistentemente relatado, particularmente quando em concomitância com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas (BLOCHING *et al.*, 2000; HINDLE *et al*., 2000; REIS *et al.*, 2002; BLOCHING *et al.*, 2008). A associação entre ingestão de bebidas alcoólicas per se e câncer oral tem, contudo, registro controverso na literatura, sendo relatado em muitos estudos que o álcool isoladamente não induz ao desenvolvimento dessa neoplasia (JABER *et al*., 1998; DIETZ *et al*., 2000; BLOCHING *et al*., 2000). Tal associação, no entanto, foi observada por Fioretti *et al*. (1999); Reis *et al*. (2002); Altieri *et al*. (2004); Burim *et al*. (2004); Poschl *et al*. (2004); Reis *et al*. (2006) e Benedetti; Parent; Siemiatycki, 2009. O uso de anti-sépticos bucais (ASB) é uma medida freqüentemente utilizada na higiene bucal (PITTEN; WERNWR; KRAMER, 2003; FREITA *et al.*, 2005*;* BAHNA *et al.*, 2007; MARINHO ; ARAUJO, 2007), entretanto sua eficácia é controversa e pode contribuir para a promoção do câncer bucal, uma vez que muitos destes produtos têm álcool na sua composição, utilizado como solvente para outras substâncias e conservante do preparo (MARINHO ; ARAUJO, 2007). Outros fatores apontados como de risco para o desenvolvimento do câncer oral, incluem a infecção por tipos oncogênicos do HPV (SYRJÄNEN ; SYRJÄNEN, 2000; HERRERO *et al*., 2003; XAVIER *et al.* (2007) e, de modo menos consistente, a má higiene oral e irritação da mucosa bucal em conseqüência de próteses mal adaptadas ou dentes fraturados (GOIATO *et al*., 2002; MACIEL *et al*., 2008; PARANHOS *et al*., 2008; XAVIER *et al*., 2009).

O câncer oral, tal como os outros tipos de câncer, é uma doença genética que resulta de mutações em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA; no controle da proliferação e da diferenciação celular. Além disso, alterações em genes das vias de apoptose podem contribuir para a promoção da doença, uma vez que células que têm DNA lesado escapam da morte e podem gerar descendentes geneticamente alteradas (HANAHAN ; WEINBERG, 2000). Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer devem, portanto, atuar na indução de alterações no material genético, levando à ocorrência tanto de mutações gênicas quanto de aberrações cromossômicas.

Assim, a identificação de alterações genéticas é uma importante medida de prevenção do câncer, uma vez que estas alterações ocorrem antes da manifestação de qualquer sintoma clínico da doença. Medidas de prevenção do câncer têm importância econômica, além evidentemente de evitar o sofrimento das pessoas, devido ao alto custo financeiro que representa seu tratamento. Em 1996, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 1996) estimava que para manter a prestação dos serviços de saúde no seu padrão atual até o ano de 2020, seria

necessária a duplicação dos recursos financeiros uma vez que há uma destinação prioritária dos recursos do sistema de saúde às ações de caráter curativo, que são mais onerosas. Assim, os investimentos devem ser voltados para medidas preventivas necessárias para detecção do risco de progressão de uma neoplasia, o que poderá diminuir, ou evitar, o sofrimento de muitas pessoas a um custo financeiro mais baixo que as atuais medidas curativas.

Efeitos genotóxicos relacionados à exposição a diversos fatores de risco para o câncer oral têm sido investigados e uma das metodologias mais utilizadas é o Teste de Micronúcleo (MN) em células esfoliadas, sugerido por Stich, Curtis e Parida em 1982. Micronúcleos, estruturas indicadoras de danos cromossômicos são potencialmente, segundo Holland *et al.* (2008), excelentes marcadores biológicos de risco de câncer e sua efetividade na avaliação de efeitos genotóxicos tem sido destacada por diversos autores (FREITA *et al.,* 2005; HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005; SAILAJA *et al.,* 2006; PEREIRA *et al.,* 2008; BLOCHING *et al.,* 2008). Em 1991, Tolbert, Shy e Allen sugeriram que em preparações citológicas para análise de micronúcleo fossem também computadas alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose). Este procedimento aumenta a sensibilidade do teste sendo particularmente importante na prevenção do câncer, uma vez que a apoptose, ao eliminar células geneticamente defeituosas, exerce controle sobre a proliferação exacerbada que posteriormente poderia resultar em um tumor (HANAHAN ; WEINBERG, 2000).

Relativo ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas, os resultados obtidos com essa metodologia são conflitantes (BLOCHING *et al*., 2000; DIETZ *et al*., 2000; REIS *et al.,* 2002; SAILAJA *et al.,* 2006) e poucos foram os estudos em que o potencial dos anti-sépticos bucais em induzir danos genéticos foi avaliado (RIBEIRO *et al*., 2004; FREITA *et al.,* 2005; WILTGEN, 2007; DÓREA, 2008) fatos estes que motivaram a realização do presente estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

O câncer oral constitui-se em uma das neoplasias mais incidentes em todo o mundo, figurando juntamente com o câncer de faringe como a sexta causa de neoplasia e a sétima causa de morte (MARCHIONI *et al*., 2007). Diversos fatores têm sido identificados como de risco para seu desenvolvimento, dentre os quais se incluem os hábitos de fumar e/ou ingerir bebidas alcoólicas (JABER *et al*., 1998; BLOCHING *et al.*, 2000; RAMIREZ ; SALDANHA, 2002; REIS *et al.*, 2002; POSCHL *et al*., 2004; BENEDETTI; PARENT; SIEMIATYCKI, 2009; KAUSAR, *et al*., 2009; VARELA-LEMA, *et al.*, 2010), a infecção por vírus oncogênicos do Papiloma Humano (HPV) (MIGNOGNA *et al*., 1997; CHEN *et al*., 1997; COSTA *et al.*, 1998; HERRERO *et al*., 2003; XAVIER *et al.*, 2007), má condições de higiene bucal, irritação traumática crônica do epitélio oral por dentes fraturados e próteses mal adaptadas (BLOCHING *et al.*, 2008; MACIEL *et al*., 2008; MUJICA; RIVERA; CARRERO, 2008; XAVIER *et al*., 2009) e uso de anti-séptico bucal (MARINHO ; ARAUJO, 2007).

O diagnóstico do câncer oral é relativamente simples, mas cerca de 60% a 80% dos afetados procuram os serviços especializados tardiamente (MIYACHI *et al*., 2002). Segundo Syrjänen (2005) tal fato acontece porque apenas em estágios avançados esta neoplasia provoca dor. Em conseqüência, a taxa de sobrevida é de apenas 40% a 50%. A evolução do câncer oral ocorre de maneira muito rápida e quando detectado em estágio avançado o tratamento se torna mais complicado, podendo ocorrer rapidamente morte do indivíduo. Aqueles que sobrevivem, freqüentemente apresentam seqüelas estéticas e/ou funcionais do aparelho estomatognático. Além dos transtornos para o indivíduo que o diagnóstico tardio acarreta os custos com o tratamento são elevados e o tempo de internação hospitalar prolongado (KOWALSKI ; CARVALHO, 2001).

2.2 Fatores de risco para o câncer oral

2.2.1 Consumo de tabaco

O consumo de cigarro industrializado é o mais importante fator de risco independente para o desenvolvimento do câncer oral e da faringe, constituindo-se na principal causa evitável de morte prematura. É estimado que 10 milhões de pessoas morrerão de doenças

tabaco-relacionadas no ano de 2020 dos quais 70% estarão em países em desenvolvimento (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005). Além do cigarro industrializado, outras formas de consumo do tabaco, a exemplo do cachimbo e charuto, estão também associadas a essas neoplasias (SILVERMAN ; SHILLITOE, 1990; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005). Outra forma de utilização do tabaco, bastante difundida principalmente nos países em desenvolvimento, e entre os mais idosos, é o hábito de mascar o chamado "fumo de corda", que se constitui, também, em fator de risco para o câncer bucal uma vez que diversas substâncias cancerígenas, mesmo em ausência da queima do tabaco são liberadas (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005). Entre os asiáticos é comum o hábito de mascar tabaco sob diferentes preparações ("bidi" e "betel quid"), todas elas consideradas fator de risco para o desenvolvimento tanto de lesões pré-malignas quanto de lesões malignas do epitélio oral. O uso do rapé, principalmente quando mascado, tem sido apontado também em associação com o desenvolvimento do câncer bucal (WINN *et al*., 1981; JOHNSON; WARNAKULASURIYA; TAVASSOLI, 1996; MOORE *et al*., 2000; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2003; LEE *et al*., 2003; SUHAS *et al*., 2004; ZANINI *et al*., 2004).

Atualmente são identificados mais de 300 agentes cancerígenos no tabaco ou em seus componentes solúveis em água. Dentre estes se destacam os hidrocarbonetos aromáticos, o benzopireno e as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNs): nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopyrrollidine (NPYR), nitrosodimetilamina (NDMA), e 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-piridil) - 1-butanona (NNK) (JOHNSON, 2001).

2.2.2 Ingestão de bebidas alcoólicas

A associação entre hábito de ingerir bebidas alcoólicas e câncer oral tem registro na literatura (SEITZ; POSCHL; SIMANOWSKI, 1998; HINDLE *et al*., 2000; REIS *et al*., 2002; SALASPURO, 2003; BURIM *et al*., 2004; REIS *et al*., 2006; BENEDETTI; PARENT; SIEMIATYCKI, 2009), mas existe controvérsia se este hábito per se é fator de risco independente para o desenvolvimento desta neoplasia (JABER *et al*., 1998; BLOCHING *et al*., 2000; REIS *et al*., 2002; ALTIERIA *et al*., 2004; BURIM *et al*., 2004; POSCHL *et al*., 2004; REIS *et al*., 2006). Segundo La Vecchia *et al*. (1997) e Du (2000), o álcool provavelmente age como um co-fator incrementando o potencial carcinogênico dos componentes do tabaco em induzir o câncer.

La Vecchia *et al.* (1997) consideram que a ingestão excessiva de bebidas alcoólicas em concomitância com o consumo de tabaco constituem os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer da cavidade oral e da faringe.

Efeitos da quantidade de consumo do tabaco e de bebidas alcoólicas na indução dessas neoplasias, bem como do tipo de bebida consumida, foram também relatados por Castellsagué *et al.* (2004). Neste estudo, do tipo caso-controle, multicêntrico e de base hospitalar, os autores avaliaram os efeitos independentes e conjuntos do tabagismo e consumo de álcool em 375 pacientes recém-diagnosticados com câncer da cavidade oral e da orofaringe e em 375 indivíduos controle. Consumo simultâneo de tabaco e bebidas com alto teor alcoólico foi associado a um aumento de quatro vezes no risco de câncer. Segundo os autores, estes hábitos em concomitância aumentam de modo sinérgico o risco de câncer oral, mesmo quando os níveis de consumo são moderados.

La Vecchia *et al*. (1997) sugerem que o álcool pode atuar como um solvente, facilitando a passagem de carcinógenos, especialmente daqueles presentes no tabaco, através da membrana celular. Além disso, segundo estes autores, o álcool estaria relacionado à carcinogênese através do aumento da atividade metabólica do fígado, o que poderia ativar substâncias carcinogênicas, ou através de alterações induzidas diretamente no metabolismo do tecido epitelial alvo.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2003) classifica o acetaldeído, metabólito principal do etanol, como de efeito mutagênico e carcinogênico. Este metabólito é produzido através da degradação do etanol pela enzima álcool desidrogenase ADH, processo que tem inicio ainda na boca devido à ação de bactérias presentes na mucosa oral. Embora a maior parte do etanol ingerido (90%) seja processada no fígado, a parcela de metabolização que ocorre na mucosa oral está associada a efeitos mutagênicos porque os danos causados pelo acetaldeído ocorrem em pequenas concentrações (40µmol/l a 200µmol/l) (SALASPURO *et al*., 2003).

Normalmente, o acetaldeído é convertido rapidamente em acetato, porem em determinadas situações, como consumo contínuo de bebidas alcoólicas ou o consumo delas em altas doses, ou ainda a degradação parcial por álcool desidrogenases (ALDH) com atividade limitada, pode haver acúmulo dessa substância (CARRARD *et al*., 2008).

Gigliotti *et al.* (2008) afirmam que o hábito de consumir bebidas alcoólicas, mesmo que não esteja associado ao hábito de fumar, pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer. Os autores consideram que o álcool age na mucosa oral irritando-a através de seus componentes químicos, como hidrocarbonetos policíclicos, substâncias aromáticas e

alcalóides, podendo com isso alterar a permeabilidade da membrana celular e atuar como solvente para outros carcinógenos, que não aqueles presentes no tabaco, o que traduz um efeito indireto do álcool na gênese do câncer oral.

A ação co-carcinogênica do álcool no trato digestivo superior se faz ainda por outros mecanismos incluindo efeitos mitogênicos e citotóxicos, incremento da ativação de pró-carcinógenos e produção de radicais livres (SEITZ *et al*., 2001).

HUANG, *et al*. (2003), em estudo realizado em Puerto Rico, avaliaram o risco de câncer oral em Puerto Rico comparando 286 consumidores de bebidas alcoólicas, do sexo masculino, com idade entre 21-79 anos com 417 controles do mesmo sexo, pareados por idade. Os consumidores de licor em grande quantidade (≥ 43 drinques por semana) apresentaram significativo aumento do risco de desenvolvimento de câncer oral (OR = 6,4), enquanto os consumidores de vinho e/ou cerveja apresentaram discreto e não significativo aumento deste risco. Entre os consumidores de licor, os riscos foram menores para aqueles que diluíam esta bebida. Estes resultados sugerem que a concentração de álcool interfere no risco de desenvolvimento de câncer oral.

Altieri *et al*. (2004) analisaram a relação entre consumo de bebidas alcoólicas e o risco de câncer oral e faringe, em estudo do tipo caso-controle realizado na Itália e na Suíça entre 1992 e 1997. Foi incluído um total de 749 casos de câncer e 1.772 controles selecionados entre indivíduos com internação hospitalar por doença não associada ao consumo de bebidas alcoólicas ou tabaco. Considerando a ingestão total por dia, feita a comparação entre indivíduos abstêmios ou bebedores de menos do que dois drinques/dia, efeitos da dose sobre o aumento do risco de desenvolvimento desses cânceres foram descritos: OR= 2,1 para os bebedores de três a quatro drinques/dia; OR= 5,0 para os que consumiam de cinco a sete drinques/dia; OR= 12,2 para aqueles que informaram consumir de oito a 11 drinques/dia e de 21,1 para os que ingeriam mais de 12 drinques/dia.

2.2.3 Infecção pelo HPV

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus epiteliotrófico, que possui uma enorme capacidade de infectar pele e mucosa em várias partes do corpo. Mais de cem tipos de HPV já foram identificados. Dentre estes, alguns foram associados com lesões no epitélio bucal (HPVs 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73 (XAVIER *et al*, 2007). Em estudo conduzido por Kellkoski *et al* (l992), os HPVs dos tipos 6 e 11 foram os mais frequentemente identificados na cavidade oral.

As lesões provocadas pelo HPV nem sempre são visíveis macroscopicamente. Com base nesse fato elas são classificadas de três formas: (a) latente: diagnosticada apenas por métodos de biologia molecular; (b) subclínica: não há sintomas clínicos, mas há alterações sutis que podem ser detectadas por métodos diagnósticos como peniscopia, colpocitologia, colposcopia e/ou biópsia; (c) clínica; há lesões evidentes ao exame clínico. Os mecanismos moleculares que levam uma infecção por HPV a permanecer latente ou a desenvolver lesão macroscópica são, contudo, desconhecidos (SYRJÄNEN ; SYRJÄNEN, 2000).

Herrero *et al*. (2003), realizaram estudo multicêntrico, do tipo caso-controle, que incluiu nove países, para investigar a associação entre infecção por HPV e câncer oral. Foram incluídos 1.670 casos (1.415 com câncer da cavidade oral e 255 com câncer de orofaringe) e 1.732 indivíduos controle. Foram coletadas células da mucosa oral e sangue de todos os participantes. Biópsias foram realizadas nos indivíduos que integraram o grupo caso. O DNA do HPV foi detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Anticorpos contra HPV16 L1 e contra as proteínas virais E6 e E7 foram detectados no plasma através de método imunoenzimático. No material da biópsia o DNA do HPV foi detectado em 3,9% de 766 indivíduos com câncer da cavidade oral e em 18,3% de 142 indivíduos com câncer da orofaringe. Anticorpos contra HPV16 L1, E6 e E7 foram associados com aumento no risco para desenvolvimento do câncer da cavidade oral e da orofaringe.

A ocorrência de HPV na mucosa bucal juntamente com a utilização de algumas substâncias como bebidas alcoólicas e hábitos tabagistas pode favorecer a transformação maligna. No entanto, a participação do HPV como agente promotor da carcinogênese oral é menor que o hábito tabagista e o consumo de bebidas alcoólicas, porque a prevalência da infecção por este vírus é menor que a prevalência do consumo do cigarro e álcool (CASTRO ; FILHO, 2006).

2.2.4 Uso de anti-sépticos bucais

Os colutórios ou anti-sépticos bucais constituem o veículo mais simples utilizado na higiene oral, sendo em sua maioria uma mistura do componente ativo (antibacteriano), água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (GEBRAN; GEBERT, 2002; BUGNO *et al*., 2006).

As substâncias antibacterianas mais empregadas na composição dos colutórios são a clorexidina, o cloreto de cetilpiridínio, triclosan, fluoreto de sódio e timol, que atuam como auxiliar da higiene bucal por contribuir para a redução da formação do biofilme microbiano

dentário (MONFRIN; RIBEIRO, 2000). Dentre estas substâncias, a clorexidina é considerada a mais efetiva na prevenção da placa bacteriana, agindo contra bactérias Gram-positivas e negativas, leveduras e dermatófitos. Atua por diminuir significativamente a formação da placa, afetando a aderência microbiana, e por aumentar a permeabilidade celular, causando rompimento da parede celular e morte dos microrganismos. É mais utilizada na forma de digluconato de clorexidina, em concentrações de 0,12%, 0,2% ou 2% (TORRES *et al*., 2000; MOREIRA *et al*., 2001). Alguns efeitos colaterais são atribuídos uso da clorexidina em colutórios, a exemplo de manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e interferência na sensação gustativa. Embora existam no mercado consumidor preparações em que está presente na concentração de 2%, a utilização de produtos com clorexidina a 0,12% é mais indicada, pois, nessa concentração, são minimizados os efeitos adversos das soluções mais concentradas, mantendo-se a eficácia contra os microrganismos (GEBRAN; GEBERT, 2002).

O cloreto de cetilpiridínio é um composto quaternário de amônia que tem como mecanismo de ação o aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana, favorecendo a lise do microorganismo, além de diminuir o metabolismo e a habilidade da bactéria em aderir à superfície dentária. O triclosan, também muito utilizado, desorganiza a membrana celular bacteriana, inibindo seu funcionamento enzimático (TORRES *et al.*, 2000).

A despeito de possíveis benefícios para a saúde que o uso dessas substâncias possa ter, através da melhoria da higiene bucal, risco aumentado para o desenvolvimento de câncer bucal e faríngeo associado ao uso regular de bochechos com anti-sépticos de alto teor alcoólico (superior a 25%) foi observado por Winn *et al*. (1991), em estudo que incluiu 886 indivíduos com essa neoplasia e 1.249 controles. Os riscos calculados foram maiores entre as mulheres. Em estudo do tipo caso-controle, que incluiu 202 indivíduos portadores de câncer de língua, gengiva, mucosa bucal, soalho da boca, palato, orofaringe e igual número de controles Reis *et al*. (1997) observaram associação entre o uso de anti-séptico bucal com aumento de risco de câncer oral, corroborando os dados daqueles autores. MORSE *et al*. (1997), entretanto, também em estudo do tipo caso controle, não encontraram associação entre displasia epitelial oral e uso regular de anti-sépticos bucais.

Anteriormente a esses estudos, a relação entre os bochechos com anti-sépticos bucais e o desenvolvimento de câncer bucal e orofaríngeo, havia sido descrita em mulheres da Carolina do Norte por Blot *et al*. (1988). A análise dos resultados da pesquisa, entretanto, foi dificultada em virtude de parte da amostra analisada utilizar o tabaco. Esta dificuldade de

avaliar estritamente o risco propiciado pela realização diária de bochechos foi relatada também por Winn *et al*. (1991).

Como relatado acima, o álcool é componente de muitos dos anti-sépticos bucais, servindo como solvente para outras substâncias e como conservante do preparo. Tem sido sugerido que a associação descrita entre uso de anti-séptico bucal e desenvolvimento de câncer oral pode ser devida a esse componente (MCCULLOUGH; FARAH, 2008). Vale ressaltar que o uso de colutórios orais aumenta o tempo de exposição da mucosa oral ao álcool, tendo sido mostrado que os enxaguatórios bucais com alto teor de álcool produzem lesões hiperqueratinizadas tanto em homens quanto em animais de laboratório (PELÁEZ *et al*., 2004).

Pinêra *et al*. (1996), com o objetivo de avaliar a concentração alcoólica de sete anti-sépticos bucais disponíveis no mercado brasileiro, realizaram estudo utilizando o alcoômetro de Gay-Lussac e a cromatografia a gás. Os resultados obtidos na análise feita com o alcoômetro mostraram que a concentração alcoólica variava entre as diversas marcas comerciais de 0,3% até 71%. Concentrações ainda maiores, de até 75%, foram descritas quando utilizado a cromatografia gasosa.

2.2.5 Irritação traumática da mucosa oral e Má higiene oral

Traumas localizados na cavidade oral são encontrados com freqüência por odontólogos em consultas de rotina. Sua ocorrência pode ter origem, dentre outras causas, em próteses mal-adaptadas e em hábitos inadequados de higiene oral, que quando em concomitância favorecem ainda mais o aparecimento de lesões, as quais para seu desenvolvimento dependem ainda das condições gerais de saúde do indivíduo (PARANHOS *et al*., 2008).

Vários tipos de lesões como estomatite por dentadura, ulceração aftosa traumática, fibroma, hiperplasia fibrosa inflamatória, carcinoma epidermóide dentre outras, podem ocorrer na mucosa dos usuários de próteses totais ou parciais mal adaptadas (MACIEL *et al*., 2008; XAVIER *et al*., 2009).

Maciel *et al*. (2008) analisaram a prevalência de lesões orais provocadas por próteses removíveis, em pacientes atendidos na Clínica Asa Branca da Faculdade de Odontologia de Caruaru (FOC), Pernambuco, Brasil. Estes autores realizaram estudo transversal que incluiu a revisão de 610 prontuários de pacientes atendidos no ano de 2005, tendo observado que

39,5% (n=241) dos pacientes apresentavam algum tipo de lesão causada por prótese removível.

Xavier *et al*. (2009) realizaram levantamento epidemiológico das lesões bucais apresentadas por pacientes atendidos no serviço de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco durante o período de janeiro de 2006 a julho de 2008, visando estimular a adoção de medidas de prevenção. As lesões registradas foram classificadas de acordo com o diagnóstico clínico e histopatológico, localização anatômica, sexo e idade do paciente. Como resultados foram encontrados 889 lesões, classificadas em 82 entidades diferentes. A lesão bucal mais prevalente foi estomatite por dentadura inadequada, encontrada em 205 pacientes (23%), seguida de ulceração aftosa recorrente (7,8%), fibroma (7,4%) e hiperplasia fibrosa inflamatória (5,2%). O carcinoma epidermóide foi a alteração maligna mais freqüente (2,2%). A localização da cavidade bucal mais acometida foi a região do palato (31,4%), e o sexo feminino mostrou-se o mais acometido (69,1%), juntamente à quinta década de vida (24,2%). A alta prevalência de lesões relacionadas ao uso de próteses mostra a necessidade de educação da população sobre os cuidados com a higiene oral, o que muitas vezes é relegado a um segundo plano.

Mujica, Rivera e Carrero (2008) realizaram estudo com pacientes idosos encaminhados à unidade geriátrica "Dr. Joaquin Quintero", Instituto Nacional de Gerontologia, Venezuela, para determinar a prevalência das lesões orais dos tecidos moles. Um total de 340 pacientes, na faixa etária de 60 a104 anos, foi avaliado clinicamente. Deste total, 212 eram mulheres e 128 homens. Cinqüenta e sete por cento (57%) da população estudada apresentaram uma ou mais lesões orais associadas ao uso de prótese, trauma e consumo de tabaco. As mulheres foram mais afetadas que os homens. As lesões foram mais freqüentes nos indivíduos na faixa etária de 60 a 74 anos, representando 34% dos afetados. As alterações mais freqüentes observadas foram: estomatite protética, leucoplasia, hemangioma, fibroma traumático, hiperplasia fibrosa inflamatória e queilite angular.

A higiene oral inadequada, como já comentado, pode per se levar a lesões da cavidade oral, ou quando feita de modo precário favorecer à periodontite que, por sua vez, leva à perda de dentes e à indicação de próteses as quais, quando mal adaptadas, provocam o trauma e conseqüentes lesões orais.

2.3 Genética e câncer

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 (protooncogenes e genes supressores de tumor) e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores). Adicionalmente, alterações em genes das vias de apoptose estão relacionadas com a promoção da doença, por permitirem que células em que o DNA foi lesado, ao invés de evoluírem para a morte, sobrevivam e gerem descendentes geneticamente alteradas (HANAHAN ; WEINBERG, 2000). Os diferentes destinos das células após exposição a um dado agente mutagênico estão didaticamente ilustrados na Figura 2, adaptada de Vogel e Motulsky (2000).

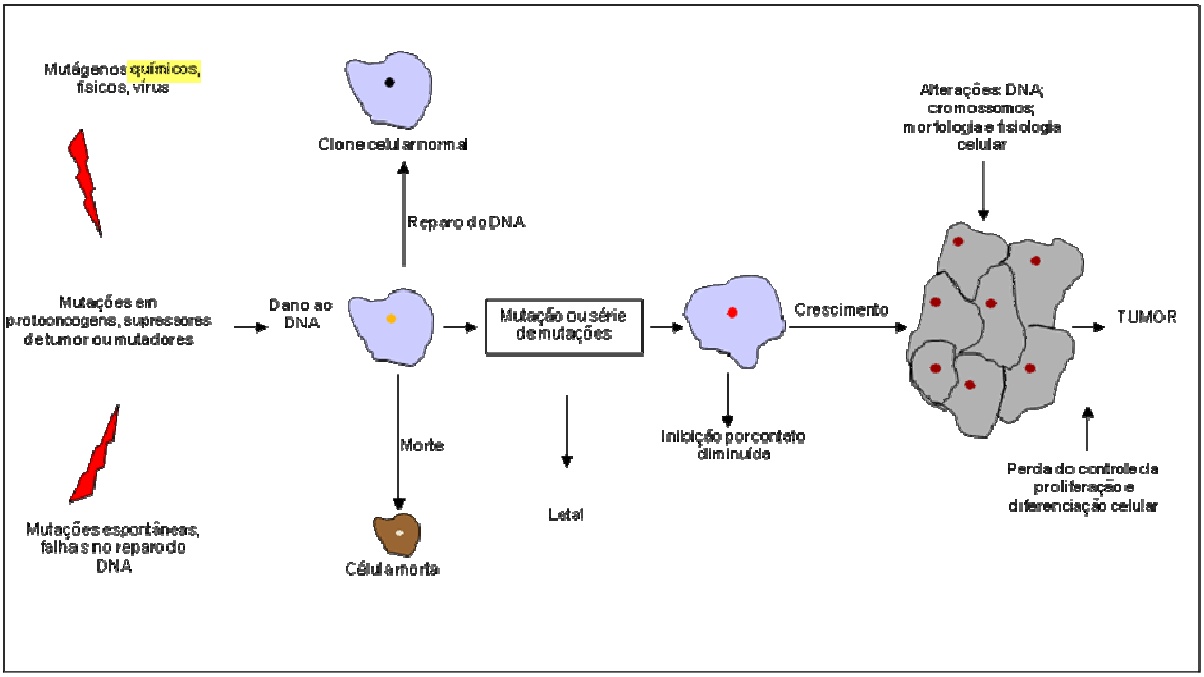

Fig. 2 Desenvolvimento gradual de um tumor maligno. (adaptado de Vogel e Motulsky, 2000)

A identificação de alterações genéticas é, possivelmente, a principal medida de prevenção do câncer, uma vez que estas alterações ocorrem antes da manifestação de qualquer sintoma clínico da doença. Este nível de prevenção tem importância econômica, além evidentemente de evitar o sofrimento de muitas pessoas, devido ao alto custo financeiro que representa seu tratamento.

Entre as neoplasias malignas epiteliais, as que estão associadas ao epitélio de revestimento, incluindo a mucosa oral, constituem 92% desses tumores (CAIRNS, 1975). Em diversos estudos objetivando a avaliação da ocorrência de danos genéticos nos epitélios cervical e oral, foi mostrado que o evolver do processo de transformação maligna está

associado à maior ocorrência de danos genéticos (CERQUEIRA *et al*., 1998; CASARTELLI *et al*., 2000; LEAL-GARZA *et al*., 2002; GUZMAN *et al*., 2003), o que aponta para a importância da prevenção do câncer a partir da identificação desses danos.

2.4 Detecção de danos genéticos_ o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas

O Teste de Micronúcleo em células esfoliadas foi proposto na década de 80 por Stich, Curtis e Parida (1982) para uso no biomomitoramento de populações humanas expostas a mutágenos. A partir daí, diversos estudos foram conduzidos objetivando avaliar a freqüência de micronúcleos em outros epitélios, a exemplo do epitélio nasal (BALLARIN, 1992; SURUDA, 1993), cervical (CERQUEIRA *et al*., 1998; LEAL-GARZA *et al*., 2002; GUZMAN *et al*., 2003), da orofaringe (BOFFETA *et al*., 1992), dos brônquios (LIPPMAN *et al*, 1990, LOOMIS, 1990), vesical (HOFSETH; DUNN; ROSIN, 1996; MOORE *et al*., 1996) e do trato gastrointestinal (CHANG-CLAUDE, 1992; DIETZ *et al*., 2000).

A eficácia do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral na detecção de efeitos genotóxicos conseqüentes à exposição à mutágenos tem sido reconhecida em muitos estudos (MACHADO-SANTELLI *et al*., 1994; SALAMA; SERRANA; AU, 1999, CAVALLO, 2005; SAILAJA *et al.*, 2006;), apontando este teste como valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese oral, vez que freqüências elevadas de micronúcleos indicam uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer (SARAN *et al*., 2008).

Salama, Serrana e Au (1999) analisaram resultados de vários estudos obtidos com a aplicação desse teste em diferentes tecidos e concluíram que sua utilização deve ser encorajada. Segundo esses autores, as células esfoliadas da mucosa bucal são excelentes para uso no monitoramento de populações expostas à genotóxicos por estarem diretamente em contato com o agente. Além disso, as células do epitélio oral são capazes de metabolizar pré-carcinógenos a formas reativas (ZHANG, 1994).

Mais recentemente, Holland *et al.* (2008) com vistas a estabelecer um protocolo de uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas avaliaram 149 estudos oriundos de laboratórios distribuídos em várias partes do mundo. Os autores concluíram que micronúcleos são potencialmente excelentes marcadores biológicos de risco de câncer

Na escolha do teste a ser empregado para avaliação de genotoxicidade em populações humanas expostas a mutágenos, é importante estabelecer se o *endpoint* utilizado para tal é um marcador de exposição (revelando danos genéticos), de efeito (indicador de risco de câncer) ou de sensibilidade (identificando variações entre indivíduos que os tornam mais suscetíveis a

um evento adverso) (BONASSI; NERI; PUNTONI, 2001). Neste contexto, micronúcleos têm sido considerados efetivos biomarcadores de exposição e já existe um acúmulo de dados consubstanciando o conceito de que *endpoints* de exposição são efetivos na predição do risco de câncer (marcador de efeito).

Micronúcleos são estruturas que medem de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo, contidas por envoltório nuclear e que apresentam material cromatínico distribuído de forma similar ao do núcleo. Como ilustrado na Figura 3, são formados durante o período de divisão celular em conseqüência de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas (SCHMID, 1975). Revelam, portanto, a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos. Os eventos que estão relacionados com a formação do micronúcleo podem ocasionar ativação de protooncogenes ou deleção de genes supressores de tumor ou de reparo do DNA, culminando com a transformação maligna. Sua freqüência representa um índice composto de aberrações cromossômicas em uma determinada população celular, tendo Schmid proposto em 1975 sua utilização como teste de curta duração para avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (SCHMID, 1975).

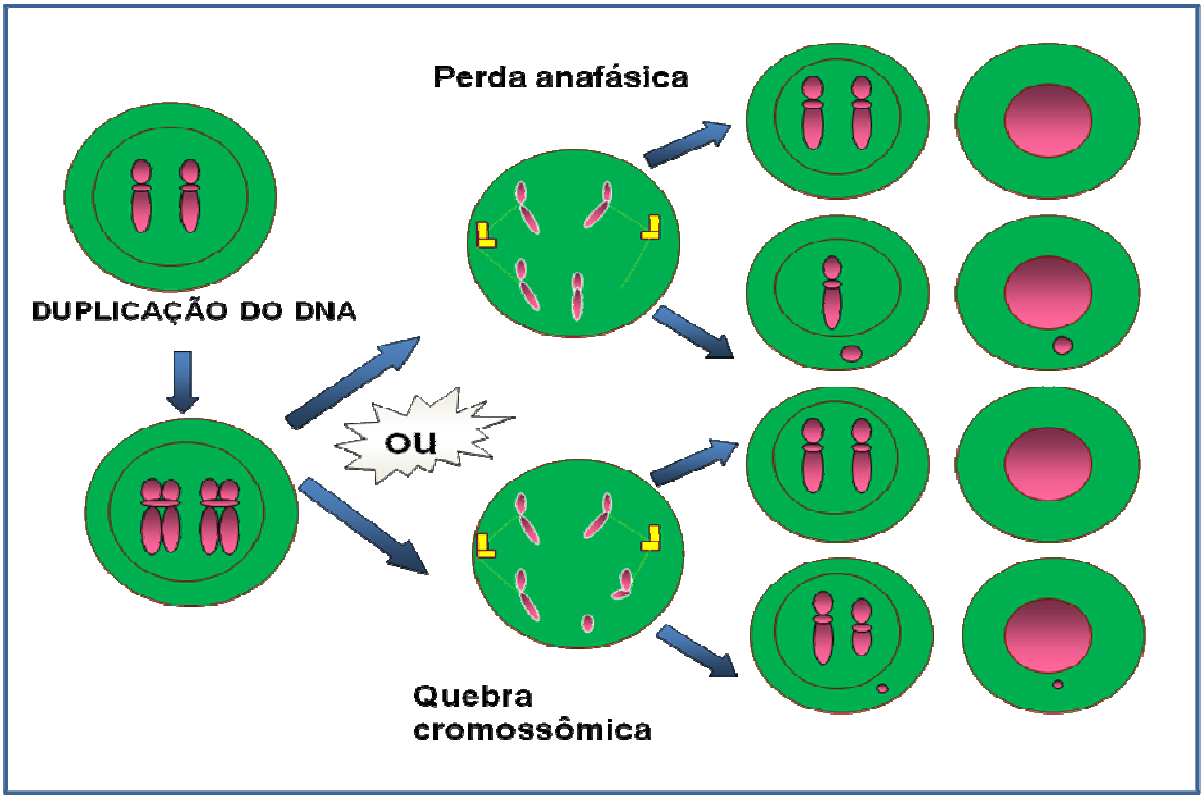

Fig. 3 Mecanismo de formação do Micronúcleo. Por Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

A análise de micronúcleos em células esfoliadas do epitélio oral apresenta diversas vantagens. Tais sejam:

1. A coleta do material a ser utilizado é muito simples;

2. Por serem observados em células interfásicas, sua análise dispensa procedimentos de cultura, o que torna o teste de baixo custo, e passível de aplicação a um grande número de indivíduos;

3. A identificação dessas estruturas é relativamente simples: micronúcleos são vistos em preparações citológicas realizadas rotineiramente e são nestas, facilmente observados, o que diminui o risco de erros de interpretação;

3. Evidenciam a ocorrência de danos genotóxicos no tecido que está diretamente sob exposição, informando o local onde um tumor poderá se desenvolver.

Tolbert *et al.*(1991, 1992) sugeriram um novo protocolo para o Teste de Micronúcleo, no qual deveria ser incluído o computo de alterações nucleares degenerativas que são próprias de um epitélio em renovação, mas que quando em ocorrência excessiva são indicadoras de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada, picnose) e necrose (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose), revelando, respectivamente, efeitos genotóxicos e citotóxicos de uma dada exposição (Figura 4).

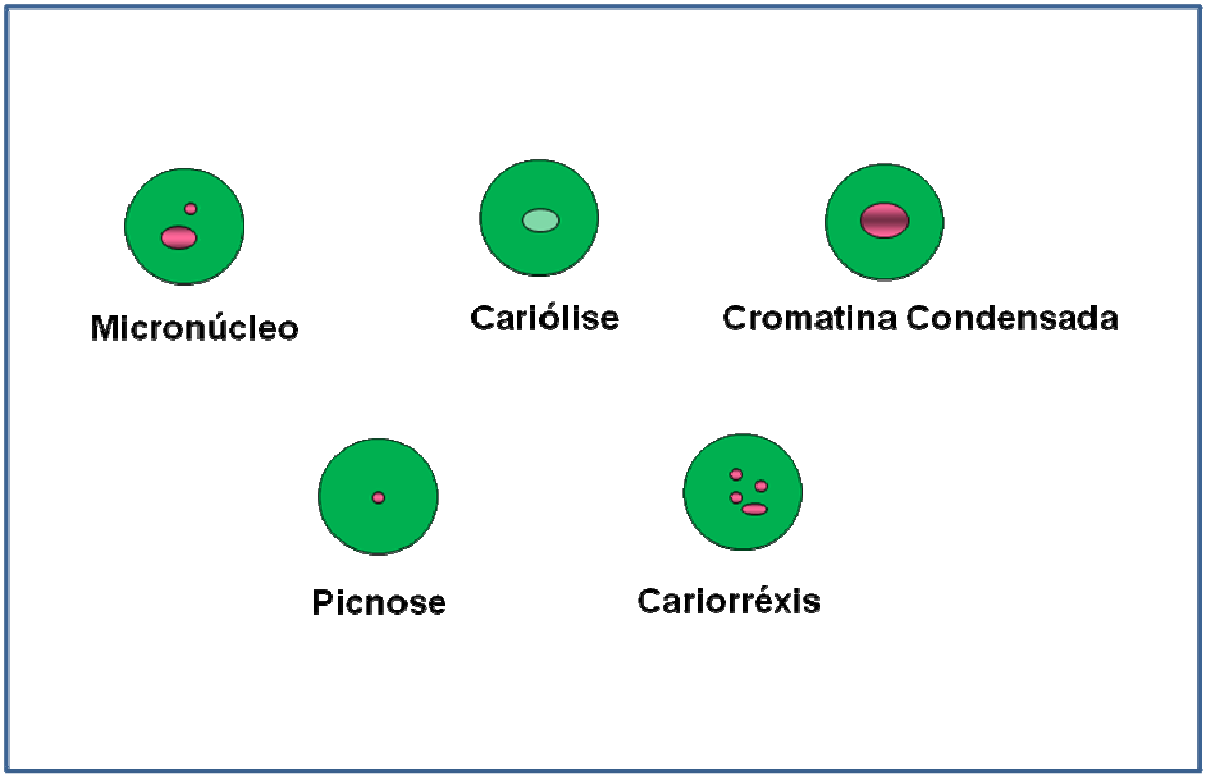

Figura 4. Diagrama das alterações nucleares degenerativas que devem, segundo Tolbert *et al.* (1992), serem computadas adicionalmente à micronúcleos.

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 relacionada à iniciação do processo de transformação maligna (TOLBERT *et al*., 1992).

A picnose, cariorréxis, cromatina condensada e cariólise, além de indicativas da morte celular por necrose estão relacionadas à queratinização, que acontece como resposta adaptativa a um dano celular em epitélios que normalmente não são queratinizados (PINDBORG *et al*., 1980). Necrose e queratinização são indicativas de citotoxicidade podendo estar associadas à promoção de câncer via estimulação da proliferação celular (TOLBERT *et al*.,1992). (Figura 5).

Figura 5. Diagrama ilustrando vias para produção de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas (Adaptado de Tolbert *et al.*, 1992)

2.5 Ocorrência de micronúcleos em associação com a ingestão de bebidas alcoólicas

A maioria dos estudos em que foi avaliada a indução de danos cromossômicos em linfócitos ou em células esfoliadas da mucosa oral conseqüentes ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas, revela que o álcool presente nestas bebidas não induz, isoladamente, à maior ocorrência desses danos. Em combinação com o hábito de fumar, no entanto, efeitos aditivos e/ou sinergísticos têm sido descritos (STICH ; ROSIN, 1983a; XUE *et al.*, 1992; CASTELLI *et al*., 1999; BLOCHING *et al*., 2000).

Em células esfoliadas da mucosa oral, Stich e Rosin (1983a) computaram a freqüência de micronúcleos em quatro grupos de indivíduos: Grupo I: não-fumantes e não usuários de bebidas alcoólicas; Grupo II: fumantes e não bebedores; Grupo III: não-fumantes, mas bebedores e, Grupo IV: fumantes e bebedores. Não foi observada diferença significante na ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos dos grupos I, II e III, mas a freqüência de micronúcleos nos indivíduos do Grupo IV foi significativamente maior do que a observada para os três outros grupos, apontando para os efeitos sinergísticos dos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas na indução de micronúcleos.

Em linfócitos, aumento significante da freqüência de micronúcleos em fumantes foi descrito por Xue *et al.* (1992). Estes resultados foram corroborados por Castelli *et al*. (1999) em estudo analisando, também em linfócitos, a ocorrência de micronúcleos e a freqüência de aberrações cromossômicas. A amostra analisada por estes autores incluiu três grupos: Grupo I: constituído por indivíduos desnutridos que fumavam e bebiam; Grupo II: formado por ex-alcoólicos não-fumantes e, Grupo III constituído por fumantes crônicos. A avaliação estatística das diferenças observadas entre os grupos revelou que a frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas foi maior nos indivíduos que constituíram o grupo de alcoólicos fumantes, não diferindo os outros grupos entre si.

Efeitos dos hábitos de mascar folhas de *Catha edulis*; do consumo do cigarro industrializado e de bebidas alcoólicas, na indução de micronúcleos em células do epitélio oral, foi investigado por Kassie *et al*. (2001). Três grupos foram analisados: Grupo I: constituído por 25 indivíduos mascadores de *Catha edulis*, fumantes e bebedores; Grupo II: formado por igual número de indivíduos fumantes e bebedores e, Grupo III: constituído por 25 indivíduos não-mascadores e que nem fumavam e nem bebiam. Foi observado que o número de micronúcleos entre os indivíduos do Grupo I era duas vezes maior do que o observado entre os indivíduos do Grupo II. Micronúcleos entre os indivíduos do Grupo I ocorreram em freqüência nove vezes maior do que entre os indivíduos do Grupo III. Os autores relatam ainda que a ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos do Grupo II foi significativamente maior do que a observada entre os participantes do Grupo III, revelando efeito aditivo dos hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas na indução das estruturas analisadas.

Reis *et al.* (2002) avaliaram a freqüência de micronúcleos em células esfoliadas da língua e da mucosa jugal (bochecha) de indivíduos dependentes químicos de etanol com consumo elevado sendo o menor consumo de 34,7 ml/dia e o maior 1825 ml/dia. A amostra constou de 40 indivíduos alcoólatras não-fumantes e de 20 abstêmios de álcool e tabaco. Foi

observado aumento estatisticamente significativo da freqüência de micronúcleos em células esfoliadas da língua no grupo de indivíduos expostos ao etanol em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). A freqüência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal foi maior no grupo de indivíduos alcoólatras quando comparado ao grupo controle, porém não houve diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$). Os autores concluem que o consumo excessivo de etanol promove alterações efetivas em células da língua, mesmo na ausência de exposição ao tabaco. Tais alterações apresentam-se mais expressivas no bordo lateral de língua, um sítio mais exposto à ação de carcinógenos quando comparado à mucosa jugal. Por outro lado, Bloching *et al.* (2000) não identificaram maior ocorrência de MN em relação à ingestão de bebidas alcoólicas.

Em três dos estudos realizados no laboratório de Genética Toxicológica da UEFS em que foram avaliados os efeitos do hábito de fumar e da ingestão de bebidas alcoólicas na indução de micronúcleos, dois não revelaram diferenças significantes entre fumantes e não-fumantes, quer fossem consumidores ou não de bebidas alcoólicas (FREITA, 2005; SANTOS, 2003) e em um (MEIRELES, 2003), o número de micronúcleos foi significativamente maior entre os fumantes ($p<0,01$). Os resultados descritos por Freita (2005) e Santos (2003) são concordes com os obtidos por Bohrer *et al.* (2005) que também não observaram diferenças significativas na ocorrência de micronúcleos em estudo no qual foram analisadas células epiteliais da mucosa oral de 21 indivíduos não-fumantes e abstêmios do álcool, 28 fumantes e 19 consumidores de cigarro e bebidas alcoólicas.

O estudo de Freita (2005) incluiu 20 indivíduos (06 homens e 14 mulheres), oito dos quais fumavam e bebiam; oito eram só fumantes e quatro consumidores exclusivos de bebidas alcoólicas. O grupo controle foi constituído por igual número de homens e mulheres não-fumantes, abstêmios do álcool e sem história de exposição a outros genotóxicos. Segundo a autora, a falta de associação observada pode ser devida à baixa exposição dos indivíduos analisados: o consumo de bebidas alcoólicas foi predominantemente de cerveja (83%), na freqüência de uma vez por semana (67%) e apenas um dos fumantes informou consumo acima de 20 cigarros/dia, enquanto a maioria (75%) consumia menos de 10 cigarros/dia.

A amostra analisada por Santos (2003) foi constituída por 60 indivíduos, 14 dos quais eram fumantes e faziam uso de bebidas alcoólicas, dois apenas fumavam, 28 eram não-fumantes, mas faziam uso de bebidas alcoólicas e 16 não fumavam e nem bebiam. A ocorrência de micronúcleos não se mostrou associada a nenhum dos dois hábitos, quer isoladamente ou em concomitância, tendo concluído a autora que a falta de associação com o hábito de fumar poderia ser atribuída à baixa exposição, uma vez que 70% dos fumantes

informaram consumo igual ou inferior a 10 cigarros/dia. Em relação ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas, a maioria (64%) dos usuários informou consumo superior a cinco copos em uma freqüência de 1 a 2 dias/semana. A falta de associação com aumento de micronúcleos corrobora resultados de outros autores de que o álcool isoladamente não induz genotoxicidade (STICH ; ROSIN, 1983a; BLOCHING *et al*., 2000).

Entre os 29 indivíduos em que Meireles (2003) avaliou os efeitos do hábito de fumar (20 não-fumantes e não usuários de bebidas alcoólicas e nove fumantes e consumidores dessas bebidas), foi observado um número significativamente maior de micronúcleos entre os indivíduos que informaram esses hábitos ($p< 0,01$).

Kayani e Parry, (2010) avaliaram *in vitro*, utilizando linfoblastos humanos, a genotoxicidade do etanol e do seu metabólito o acetaldeido através do ensaio de Micronúcleo pelo Bloqueio da Citocinese (CBMN) e de imunofluorescência para identificação do cinetócoro. Após exposição das células a diferentes doses foi observado efeito dose/resposta que era mais pronunciado pela ação do etanol quando comparado ao acetaldeído. A imunofluorescência revelou que o etanol induz a formação de micronúcleos por dano aneugênico agindo, portanto, diretamente no fuso mitótico, enquanto o acetaldeído induz a formação de micronúcleo por clastogenicidade.

A indução de danos cromossômicos em conseqüência do hábito de ingerir bebidas alcoólicas pode estar na dependência de polimorfismos em genes associados à metabolização do etanol. Ishikawa *et al*. (2006) analisaram a freqüência de micronúcleos em linfócitos em função dos polimorfismos de genes envolvidos na metabolização do etanol a acetoaldeído (alcodesidrogenase _ ADH_, citocromo p4502E1 _ CYP2E1; catalase) e na detoxificação deste pela aldeídodesidrogenase 2 (ALDH2). Os resultados mostraram, na dependência do consumo, um número significativamente maior dessas estruturas nos portadores de uma variante da ALDH2 e nos homozigotos para o alelo CYP2E1. De acordo com os autores, a análise dos polimorfismos das enzimas envolvidas com o metabolismo do etanol, pode conduzir à elucidação dos mecanismos associados à susceptibilidade aos seus metabólitos.

2.6 Associação entre a ocorrência de micronúcleos e o uso de anti-séptico bucal

A associação entre uso de anti-séptico bucal e ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas do epitélio oral foi avaliada por Freita *et al.* (2005). Estes autores observaram que o uso de anti-séptico bucal está associado à maior ocorrência de micronúcleo, assim como a

exposição ao tabaco e ao álcool está relacionada a significativo aumento de fenômenos nucleares indicativos de apoptose.

Dórea (2008) avaliou, também com o uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa jugal, a ocorrência de alterações citológicas indicativas de danos cromossômicos e apoptose em indivíduos com câncer oral. Neste estudo, a ocorrência de micronúcleos nos indivíduos com lesões bucais foi significativamente maior que a observada nos indivíduos sem lesões. A autora observou ainda que a freqüência de micronúcleos foi significativamente maior entre fumantes e entre usuários de anti-séptico bucal.

Wiltgen (2007), entretanto, fazendo uso dessa mesma metodologia, não observou diferença significante na ocorrência de micronúcleos entre o grupo controle e três grupos de indivíduos que por sete dias fizeram bochechos, duas vezes ao dia, cada grupo utilizando um anti-séptico bucal específico.

Genotoxicidade de componentes dos anti-séptico bucal tem sido identificada em estudos realizados com animais. Ribeiro *et al.* (2004), avaliaram o potencial da clorexidina em induzir danos ao DNA, em leucócitos periféricos e em células esfoliadas da mucosa de ratos, utilizando o Ensaio Cometa. O Teste de Micronúcleo em eritrócitos periféricos foi também realizado para detecção de danos cromossômicos. Maior ocorrência de micronúcleos não foi observada, mas a ocorrência de danos ao DNA foi, em ambos os sistemas celulares, significativamente maior nos animais expostos.

3. OBJETIVOS

Geral

- Identificar, através do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral, a ocorrência de danos cromossômicos e apoptose em usuários de bebidas alcoólicas e anti-séptico bucal, visando avaliar a eficácia de micronúcleos como biomarcadores de risco para o desenvolvimento do câncer oral nestes indivíduos.

Específicos

- Avaliar, em células esfoliadas do epitélio oral, a genotoxicidade das bebidas alcoólicas e dos anti-sépticos bucais através do computo de danos cromossômicos traduzidos como micronúcleos.

- Identificar em células esfoliadas do epitélio oral a ocorrência de alterações indicativas de apoptose, conseqüentes aos hábitos de ingerir bebidas alcoólicas e uso de anti-sépticos bucais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

O grupo amostral deste trabalho incluiu 80 indivíduos, do gênero masculino e feminino, na faixa etária entre 20 e 30 anos, distribuídos em quatro grupos de igual tamanho (vinte indivíduos, cada). Tais sejam:

Grupo exposto 1 (GE1): constituído por indivíduos que fazem uso de anti-séptico bucal;

Grupo exposto 2 (GE2): constituído por usuários de bebidas alcoólicas;

Grupo exposto 3 (GE3): constituído por usuários de anti-séptico bucal e de bebidas alcoólicas;

Grupo controle (GC): constituído por indivíduos sem histórico de exposição a substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas.

A amostra incluiu indivíduos atendidos rotineiramente nas clinicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana e estudantes de diversos cursos desta universidade.

4.2 Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada pela aplicação de questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, estado civil, ocupação atual e anterior, tempo de atividade, hábito de ingerir bebidas alcoólicas, usos de anti-séptico bucal e de medicamentos, hábito de fumar, exposição à radiação e a outros genotóxicos (Apêndice I).

Indivíduos que relataram hábito de fumar foram excluídos da amostra, assim como aqueles que informaram exposição à genotóxicos.

4.3 Obtenção e preparo do material para estudo citológico (Danos cromossômicos e Apoptose)

O material destinado à análise citológica foi coletado através de raspagem gentil da mucosa oral com escova *citobrush*, e com ele feito esfregaço em lâmina de vidro limpa na qual foi previamente colocada uma gota de soro fisiológico (NaCl a 0,9%.) As lâminas com o material coletado secaram à temperatura ambiente, e foram, após secas, fixadas em solução de metanol/ácido acético na concentração de 3/1. Transcorridas 24 horas foi feita hidrólise em

solução de ácido clorídrico (5N) por 15 minutos seguindo-se lavagem em água destilada por três vezes. A coloração foi feita utilizando o reativo de Shiff, e a contra-coloração com Fast Green a 1%. As lamínulas foram montadas com Entelan®.

4.4 Análise microscópica

Toda a análise citológica foi realizada sob microscopia óptica (200X) e em teste cego em relação aos dados obtidos no questionário. Foram analisadas 2.000 células por indivíduo. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram os descritos por Tolbert; Shy; Allen (1991; 1992): foram considerados micronúcleos estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentando em relação à este estrutura cromatinica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano (Figura 6a). Seguindo o protocolo diferenciado do Teste de Micronúcleo, sugerido por Tolbert; Shy; Allen (1991; 1992), além de micronúcleos foram também computadas células apresentando alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose: cariorréxis, cromatina condensada e picnose (Figura 6 b, c, d). Somente células com citoplasma íntegro foram computadas.

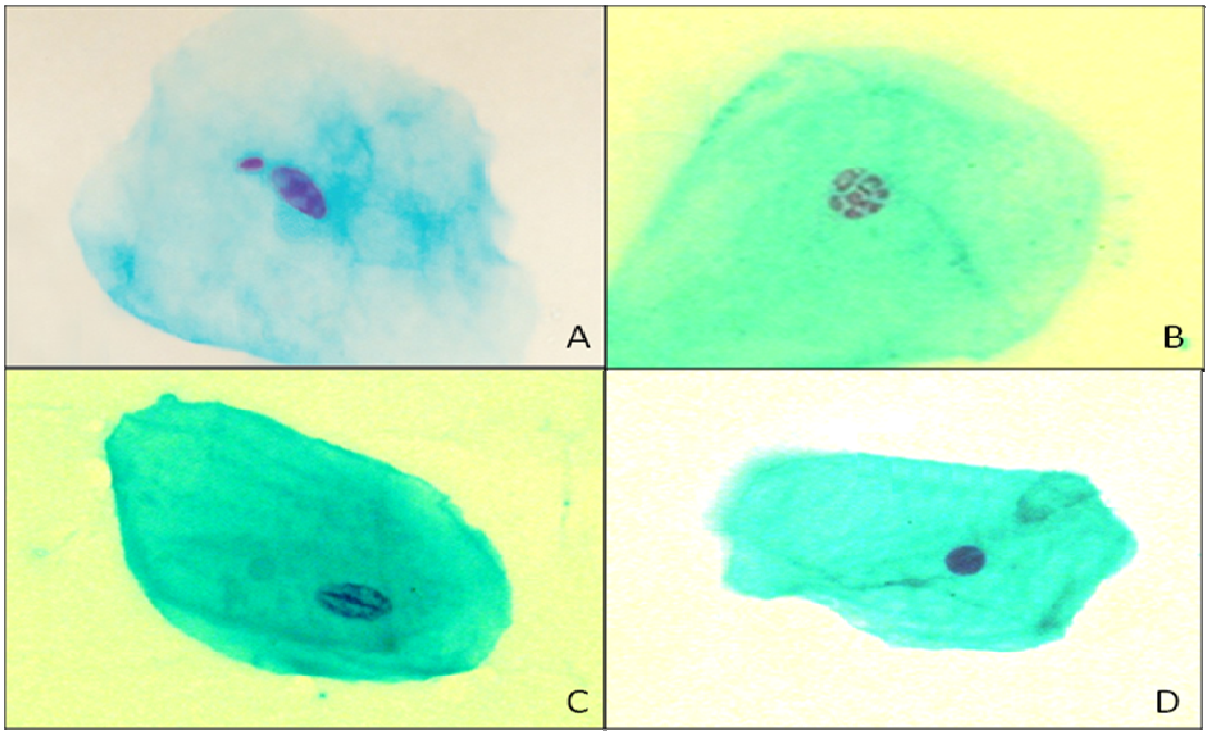

Figura 6. Fotomicrografias indicando a ocorrência de Micronúcleo (A), Cariorréxis (B), Cromatina condensada (C) e Picnose (D).

4.5 Elaboração do Banco de Dados

Um banco de dados com as informações colhidas em questionário e com os resultados da análise citológica foi montado em planilhas utilizando o Excel®.

4.6 Análise estatística

Para análise das diferenças entre as médias de idade foi utilizada a ANOVA. Diferenças entre os grupos relativas ao gênero foram avaliadas com o Teste de Qui-quadrado (χ^2). Os resultados da análise citológica foram avaliados com o Teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991) que é um teste de significância alternativo ao de Qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer (KALBFLEISCH, 1979) e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada alteração citológica.

4.7 Aspectos éticos da pesquisa

A metodologia aplicada para obtenção das células da mucosa oral não é um procedimento invasivo (raspagem superficial da mucosa) e foi realizada com material descartável que não oferece risco de lesão ou contaminação dos indivíduos da amostra. Todas as pessoas da amostra foram esclarecidas a respeito da pesquisa e tiveram liberdade para dele participar ou de desistir no momento que lhes fosse conveniente. Aquelas que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice II). Os dados dos participantes da pesquisa foram mantidos em sigilo e todas as informações contidas nos formulários utilizadas somente pelos pesquisadores responsáveis. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estadual de Feira de Santana (Protocolo 007/2009. CAAE 0007.0.059.000.09) (Anexo 1).

5. RESULTADOS

5.1 Características da amostra

5.1.1Idade

As médias de idade e desvio padrão calculados para os Grupos Expostos (GE) 1, 2 e 3 e para o Grupo Controle (GC) foram, respectivamente, X□= 24,75±2,54; X□= 25,15±2,59; X□= 24,45±2,37 e X□= 24,35±1,98. Avaliação das diferenças observadas, feita com o uso da ANOVA, não mostrou significância estatística: $F_{3,76}$= 0,4307, p= 0,7316 .

5.1.2 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 Qui-quadrado, revelou que não há diferença significativa na distribuição de homens e mulheres entre os grupos: χ^2= 4,396; G.L.= 3; p= 0,2218. Dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos gêneros entre os Grupos

Grupo / Gênero	GE1	GE2	GE3	GC
Masculino	12	14	16	10
Feminino	08	06	04	10

5.1.3 Consumo de bebidas alcoólicas e uso de anti-séptico bucal

Entre os indivíduos do GE2, treze informaram beber duas ou três vezes por semana e sete disseram beber uma vez por semana. À exceção de um indivíduo, todos informaram consumo de cerveja (Faixa de quatro a 20 copos, média de 13 copos por vez). Além de cerveja, dez indivíduos informaram uso de outras bebidas alcoólicas. Quanto à duração do hábito, sete indivíduos bebiam há pelo menos um ano e não mais do que há cinco anos e treze deles o fazia há mais de cinco anos e menos do que dez anos. Dados relativos à quantidade e tipo de bebida, bem como à duração do hábito, são apresentados, respectivamente nas figuras 7, 8 e 9.

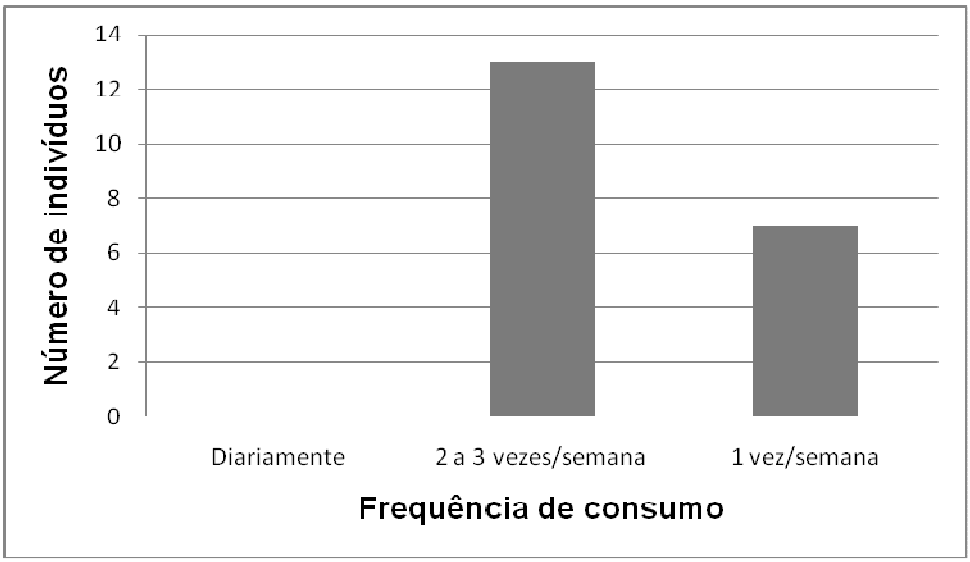

Figura 7 - Frequência do consumo de bebida no GE2

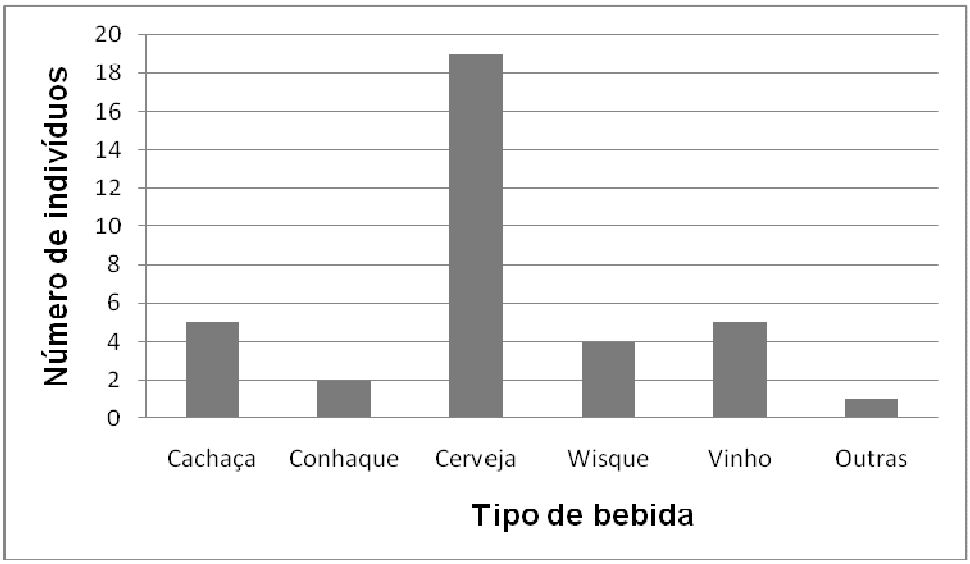

Figura 8 – Tipo de bebida consumida pelos usuários

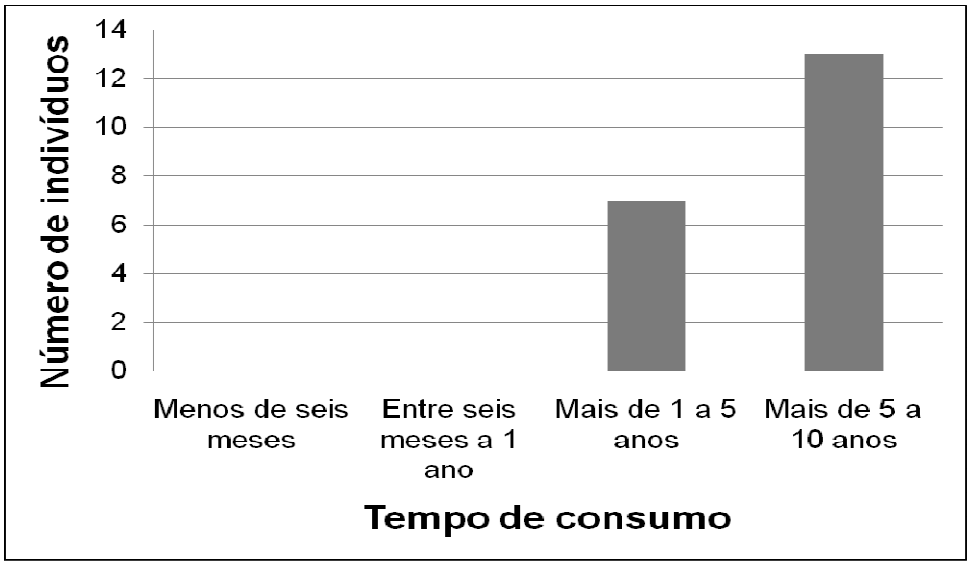

Figura 9 – Tempo de consumo

O uso de anti-séptico bucal entre os indivíduos do GE1 variou entre freqüência diária (nove indivíduos, quatro dos quais os utilizava duas vezes ao dia) e semanal: cinco indivíduos que faziam uso duas vezes por semana, cinco que informaram uso semanal de três vezes e um indivíduo que fazia uso quatro vezes na semana (Figura 10). Nove indivíduos informaram que o anti-séptico utilizado não continha álcool em sua fórmula e onze utilizavam anti-sépticos nos quais o álcool estava presente. Dados relativos à duração do uso de anti-séptico são apresentados na Figura 11.

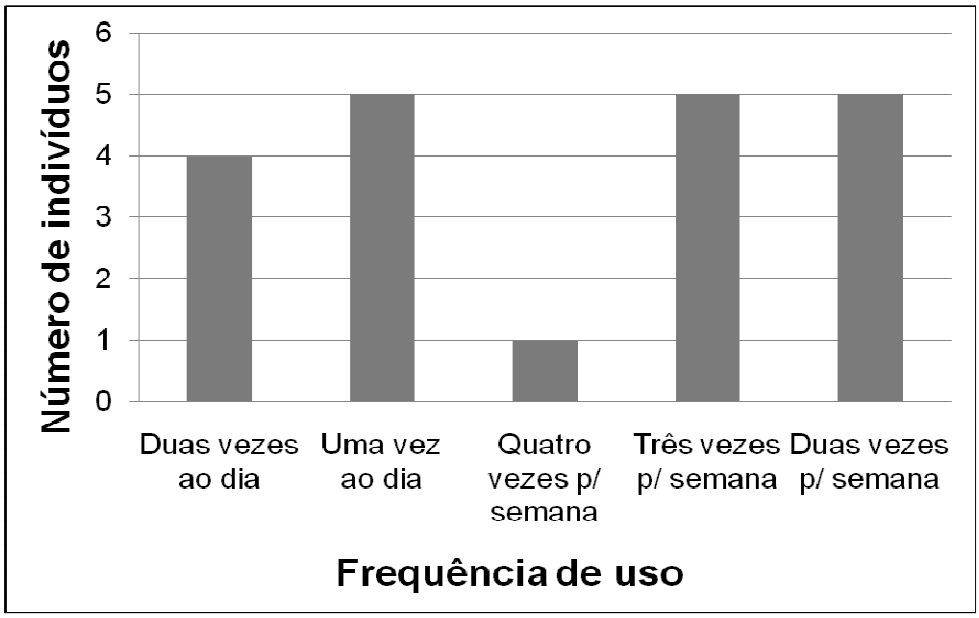

Figura 10 - Frequência de uso do ASB

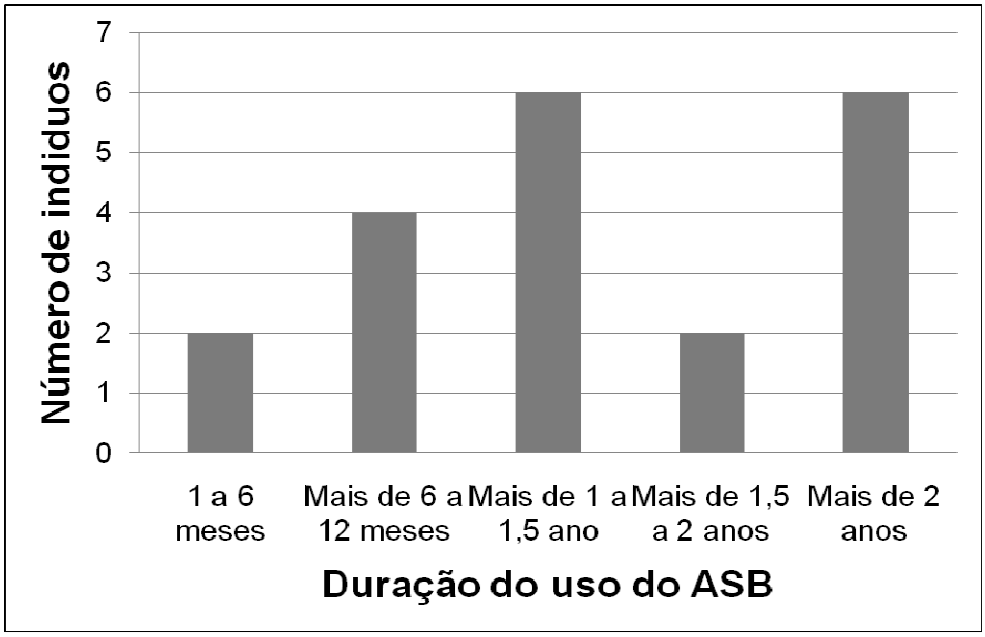

Figura 11 - Tempo de uso (duração) de ASB

Sete indivíduos do GE3 informaram consumir bebidas alcoólicas duas a três vezes por semana e treze o fazia uma vez na semana. Todos informaram beber cerveja (Faixa de três a 20 copos, média de 11 copos por vez), e doze deles consumiam além da cerveja outros tipos de bebidas alcoólicas. Quanto à duração do hábito, onze indivíduos bebiam há pelo menos um ano e não mais do que há cinco anos e nove deles informaram uso há mais de cinco anos e menos do que dez anos (Figuras 12, 13 e 14).

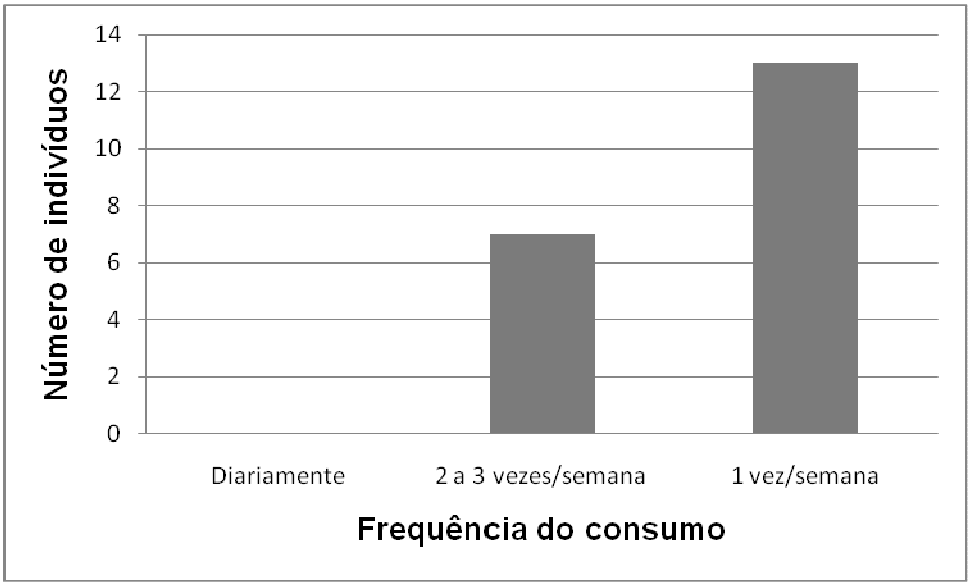

Figura 12 - Frequência do consumo de bebidas alcoólicas

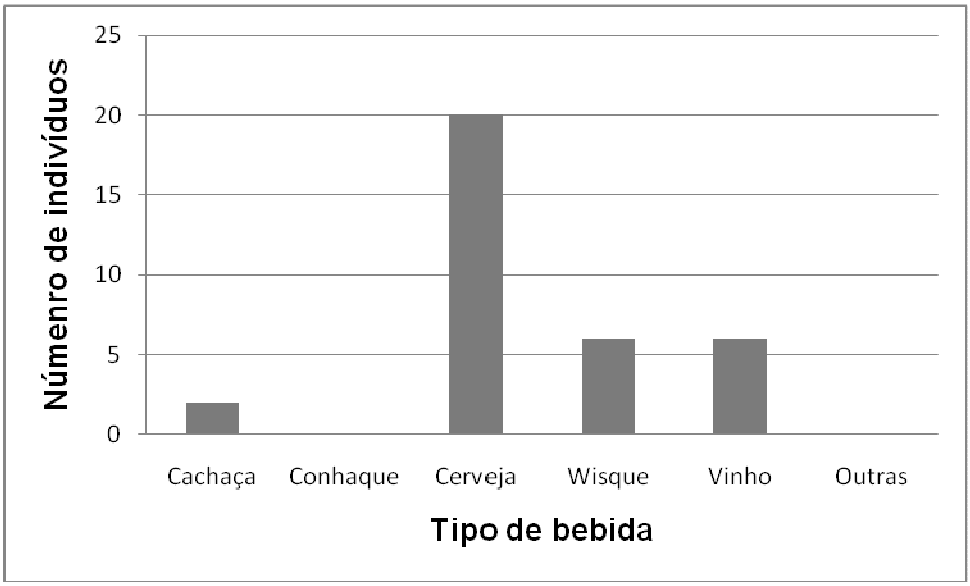

Figura 13 - Tipo de bebida consumida pelos usuários

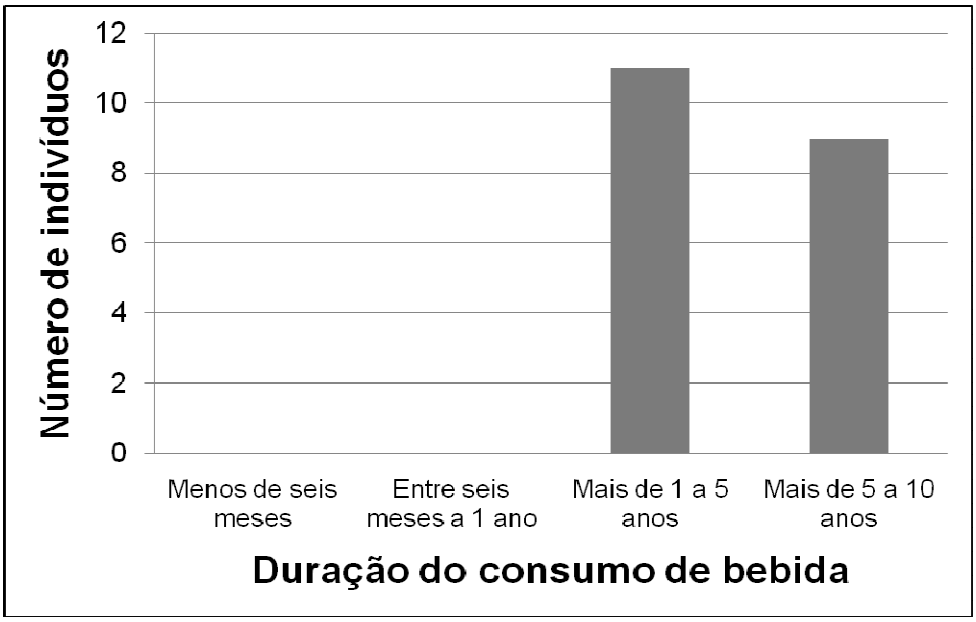

Figura 14 – Tempo de consumo de bebidas alcoólicas

Quanto ao uso de anti-séptico bucal entre os indivíduos do GE3, a freqüência variou entre uma vez ao dia (seis indivíduos) e semanal: seis indivíduos que faziam uso duas vezes por semana, sete que informaram uso semanal de três vezes e um indivíduo que fazia uso quatro vezes na semana (Figura 15). Anti-séptico com álcool em sua composição era utilizado por 16 indivíduos deste grupo. A Figura 16 mostra dados relativos à duração do uso de anti-séptico bucal.

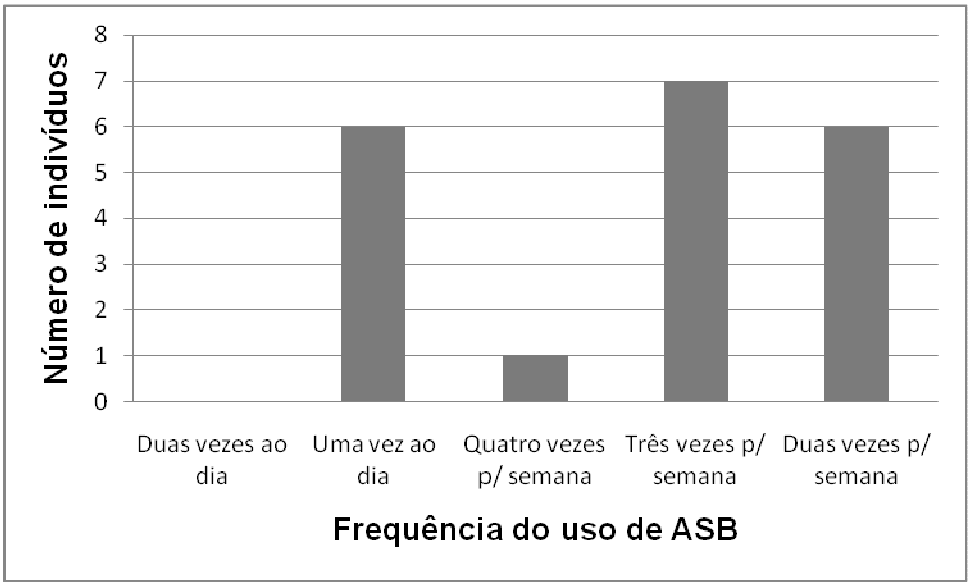

Figura 15 – Frequência do uso do ASB no GE3

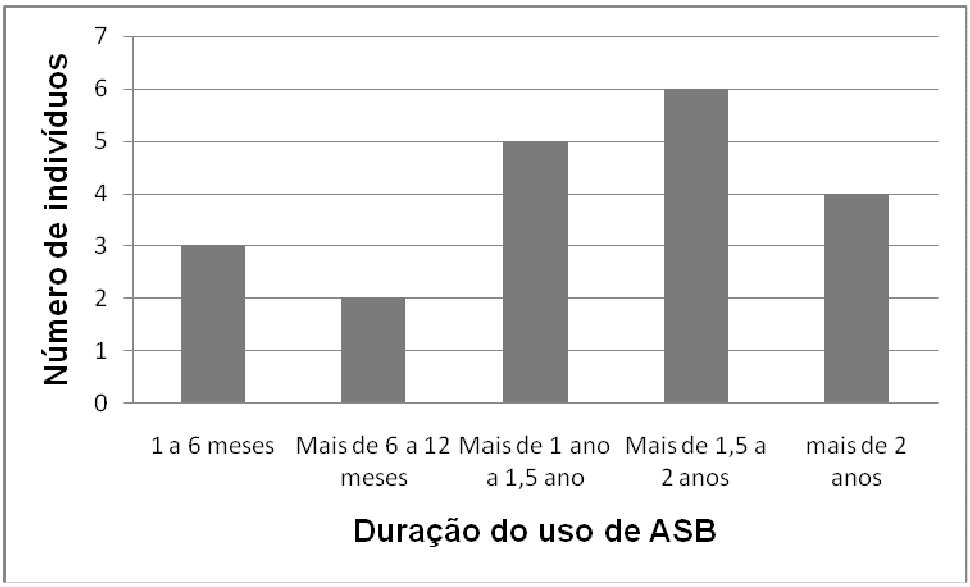

Figura 16 – Duração do uso de ASB no GE3

5.2 Análise Citológica

Um total de 160.000 células foi analisado: 40.000 células em cada grupo. Os números de micronúcleos nas células analisadas dos indivíduos dos grupos GE1, GE2, GE3 e GC foram, respectivamente 12, 8, 13 e 2. A análise estatística das diferenças na ocorrência de micronúcleos entre os grupos, feita com o Teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros mostrou diferença significante entre os grupos: χ^2= 8,5428; G.L.= 3; p< 0,05. As partições do qui-quadrado mostram que o número de micronúcleos nos indivíduos dos grupos expostos GE1 e GE3 é significativamente maior do que o observado nos indivíduos do grupo controle (GC), no entanto o número de micronúcleos nos indivíduos do grupo GE2 não diferiu estatisticamente do GC. O número de micronúcleos também não diferiu estatisticamente quando comparados os grupos expostos entre si. Dados relativos a essa análise são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Ocorrência de Micronúcleo (MN) entre os Grupos

Grupo	n° de MN (obs)	n° de MN (esp)	n° Total de células	Qui-quadrado	Partições de Qui-quadrado
GE1	12	8,7500	40.000	χ^2= 8,5428 GL= 3 p< 0,05	GE1 vs. GC: χ^2= 7,1428; GL= 1; p< 0,01
GE2	08	8,7500	40.000		GE2 vs. GC: χ^2= 3,600; GL= 1; p> 0,05
GE3	13	8,7500	40.000		GE3 vs. GC: χ^2= 8,0667; GL= 1; p< 0,05
GC	02	8,7500	40.000		GE1 vs. GE2: χ^2= 0,800; GL= 1, p> 0,30
Total	35	35	160.000		GE1 vs GE3:χ^2= 0,0400; GL= 1, p> 0,80
					GE2 vs. GE3: χ^2=1,1905; GL= 1, p>0,20

A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa à ocorrência de apoptose (inferida pelo somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose), feita com o uso do mesmo teste, revelou diferença significante entre os grupos: χ^2= 56,3205; G.L.= 3; p< 0,001. As partições de qui-quadrado mostram que a ocorrência de apoptose é significativamente maior entre os indivíduos dos grupos expostos (GE1, GE2 e GE3) quando comparados aos indivíduos do grupo controle (GC), não havendo diferença significante quando comparados os grupos expostos entre si.

Tabela 3. Ocorrência de Apoptose (AP) entre os Grupos

Grupo	n° de AP (obs)	n° de AP (esp)	n° Total de células	Qui-quadrado	Partições de Qui-quadrado
GE1	446	389,25	40.000	χ^2= 56,3205 G.L.= 3 p< 0,001	GE1 vs.GC: χ^2=45,5056; GL=1; p<0,001
GE2	448	389,25	40.000		GE2 vs.GC: χ^2=46,3921; GL=1; p<0,001
GE3	397	389,25	40.000		GE3 vs.GC: χ^2=25,8838; GL=1; p<0,001
GC	266	389,25	40.000		GE1 vs.GE2: χ^2=0,0044; GL= 1, p> 0,90
Total	1.557	1.557	160.000		GE1 vsGE3: χ^2= 2,8481; GL= 1, p> 0,10
					GE2 vs.GE3: χ^2=3,0781; GL= 1, p> 0,05

6. DISCUSSÃO

O câncer oral é uma das neoplasias mais incidentes em todo o mundo, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). O alto custo com o tratamento desta doença, principalmente quando detectada em estágios avançados, constitui sério problema de saúde pública e estimula a busca por medidas preventivas que incluem o exame clínico periódico da cavidade oral por profissional qualificado, a adoção de hábitos de vida saudável e de higiene oral adequada, cuidados com a dentição e uso quando indicado de próteses adequadas.

Mais recentemente, tem sido intensificada a busca por biomarcadores de risco de câncer com vistas à maior eficiência de prevenção da doença. A relevância das alterações cromossômicas como biomarcadores tem sido destacada em muitos estudos epidemiológicos evidenciando que a maior freqüência dessas alterações é preditiva de um maior risco de câncer (SOLOMON *et al*., 1991; RACHET *et al*., 2002; HAGMAR *et al*., 2004; NORPA, 2004; FREITA *et al.,* 2005; HEEPCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005; SAILAJA *et al.,* 2006; PEREIRA *et al.,* 2008; BLOCHING *et al.,* 2008).

O Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral empregado de acordo com o protocolo de Tolbert, Shy e Allen (1991) no qual é proposto que, além de micronúcleos, seja feito o computo de alterações nucleares degenerativas indicadoras da ocorrência de apoptose, tem sido destacado como ferramenta valiosa para avaliação de danos genotóxicos em populações expostas a diversos mutágenos (MEIRELES, 2003; FREITA, 2005). De acordo com Stich e Rosin (1983b) e Stich (1987) a freqüência de micronúcleos em células humanas representa um “dosímetro endógeno” para os tecidos que são alvos da ação desses agentes.

A eficiência desse teste é notadamente maior quando a exposição ao agente mutagênico se faz diretamente no epitélio oral, a exemplo da exposição ao tabaco e às variáveis analisadas neste estudo: hábitos de ingerir bebidas alcoólicas e uso de anti-séptico bucal.

A avaliação dos efeitos genotóxicos do consumo do tabaco, considerado como o fator de risco mais consistente em associação com o câncer oral, particularmente quando concomitante com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas, feita com o uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, tem registro amplo na literatura, com a maioria dos estudos apontando para maiores freqüências entre fumantes (SARTO *et al*., 1987; .ÖZKUL *et al.,* 1997; BLOCHING *et al*., 2000; KONOPACKA, 2003; WU *et al*., 2004).

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. Maior ocorrência de micronúcleos entre usuários de rapé foi descrita por Tolbert; Shy; Allen (1991) e entre usuários do “Khaini-tobacco" por Stich ; Parida ; Brunnemann (1992). Indução de micronúcleo por consumidores de “Maras Powder” e consumidores de “Bidi” foi descrita por Özkul *et al*. (1997) e Suhas *et al*. (2004).

Os efeitos genotóxicos do hábito de ingerir bebidas alcoólicas, traduzidos na maior ocorrência de micronúcleos, têm registro controverso na literatura.

Bloching *et al.* (2000) em estudo que avaliou os efeitos dos hábitos de ingerir bebidas alcoólicas e de fumar na indução de micronúcleos em células da mucosa jugal, descreveram freqüências maiores dessas estruturas apenas em função do consumo de tabaco.

Maior ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos que eram dependentes de bebidas alcoólicas foi relatada por Reis *et al.* (2002) em estudo do tipo caso-controle. Embora o número de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal fosse maior no grupo exposto a diferença não foi estatisticamente significante.

Nessas células, Stich e Rosin (1983a), 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. 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.

Efeitos aditivos desses hábitos na indução de micronúcleos em células esfoliadas do epitélio oral foram também descritos por Kassie *et al.*(2001). Bohrer *et al.* (2005), analisando células esfoliadas de três sítios da boca (língua, lábio superior e assoalho oral) observaram nos três sítios maior número de micronúcleos entre consumidores de bebidas alcoólicas e de cigarro industrializado, quando comparados a um grupo controle e a um grupo de consumidores exclusivos de tabaco. A diferença entre os grupos não foi, contudo, estatisticamente significante.

Concorde com os resultados descritos por Reis *et al.* (2002) e Bohrer *et al.*(2005) (resguardadas as diferenças nos sítios anatômicos investigados por estes autores), no presente estudo, o número de micronúcleos observado entre os usuários de bebidas alcoólicas (GE2) foi maior do que o observado nas células obtidas dos indivíduos controle (GC), tendo a comparação estatística desses resultados revelado significância marginal, suscitando fortemente a necessidade de realização de outros estudos, com amostras de maior tamanho,

antes que conclusões confiáveis a respeito do potencial mutagênico das bebidas alcoólicas possam ser formuladas.

É importante destacar, também, que a avaliação dos resultados obtidos em diferentes estudos deve ser feita à luz das diferenças relativas às variáveis relacionadas ao consumo de bebidas alcoólicas como o tipo de bebida, a quantidade ingerida e o tempo do hábito. Em relação à quantidade de bebida ingerida, tanto Freita (2005) quanto Santos (2003) destacam que a falta de associação entre consumo de bebidas alcoólicas e indução de micronúcleos, observada em seus estudos, pode ter sido devida ao baixo consumo dessas bebidas nos grupos por elas analisados.

É escasso o registro na literatura avaliando, em humanos, a associação entre uso de anti-séptico bucal e ocorrência de micronúcleo. Em extensa revisão da literatura feita com o objetivo de subsidiar este trabalho foi encontrada apenas uma publicação (FREITA *et al.*, 2005) e duas dissertações de mestrado abordando o tema (WILTGEN, 2007; DÓREA, 2008).

Os resultados descritos por Freita *et al.* (2005) apontam para uma maior ocorrência de micronúcleos entre os usuários de anti-séptico bucal, mas os próprios autores chamam a atenção para o fato de que estes resultados devem ser vistos com reserva, uma vez que o número de usuários era muito pequeno (apenas cinco indivíduos) além do que dentre estes três eram consumidores de tabaco e de bebidas alcoólicas. Dórea (2008) também descreveu maior ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos que fazem uso de anti-séptico bucal. Embora sua amostra tivesse o dobro dos indivíduos analisados por Freita *et al*. (2005) sete deles eram fumantes, de modo que estes resultados devem ser vistos também com reserva.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os descritos por esses autores: a ocorrência de micronúcleos foi significativamente maior entre os indivíduos do Grupo Exposto 1 (usuários de anti-séptico bucal) quando comparados aos indivíduos do Grupo Controle e representam uma informação mais confiável dado o fato de que a amostra era constituída por não-fumantes e incluiu um número de indivíduos considerado adequado a este tipo de análise.

Por outro lado, Wiltgen (2007) avaliando a genotoxicidade de três anti-sépticos bucais não observou diferença estatística quando comparados expostos e controles quanto à ocorrência de micronúcleos. Segundo os autores, dado o pequeno tamanho dos grupos amostrais (10 indivíduos em cada) estudos adicionais se fazem necessários antes que esta informação possa ser absorvida como indicadora de que o uso dessas substâncias é isento de genotoxicidade. É importante destacar ainda que o tempo de uso do anti-séptico foi muito curto_ apenas sete dias. Eren, Özmeriç e Sardas (2002), contudo, avaliando a ocorrência de

danos ao DNA, através do Ensaio Cometa, detectaram maior ocorrência destes danos em linfócitos periféricos e células esfoliadas do epitélio oral de 13 indivíduos que fizeram uso de anti-séptico bucal, contendo clorexidina, por um período de 18 dias.

Tem sido aventado que o álcool presente nos anti-sépticos bucais seria o componente responsável pela associação entre este hábito e a ocorrência de câncer oral (MCCULLOUGH; FARAH, 2008) e pelos efeitos genotóxicos descritos (FREITA *et al*., 2005; DÓREA, 2008). No presente estudo, embora o maior número de micronúcleos observado fosse maior nas células obtidas dos indivíduos do Grupo Exposto 3 (GE3), que eram usuários tanto de anti-séptico bucal quanto de bebidas alcoólicas, a comparação com o Grupo 1 (GE1), constituído por usuários exclusivos de anti-séptico bucal, não revelou significância estatística de modo que efeitos aditivos e/ou sinergísticos não podem ser inferidos.

Alguns anti-sépticos bucais contêm em sua formulação maior teor de álcool do que algumas bebidas alcoólicas (PINÊRA; NOGUEIRA; CONSOLARO, 1996) o que, adicionado ao fato de que por serem bochechados permanecem mais tempo em contato com o epitélio oral do que quando da ingestão de bebidas, poderia ser a razão de não ter sido detectada maior ocorrência de micronúcleos entre os usuários exclusivos de bebidas alcoólicas (GE2) quando comparados aos indivíduos controle, mas sim entre os usuários de anti-sépticos (GE1) e controles (GC).

Apesar da significância marginal 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 freqüência dessas alterações foi 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 concordes com os descritos por Santos (2003) e Freita (2005) que tal como neste estudo 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 dos anti-sépticos, já evidenciada na indução de micronúcleos quer isoladamente ou em associação com a ingestão de bebidas alcoólicas.

A ocorrência de micronúcleos em função do gênero e da idade deve ser sempre considerada em estudos que avaliem em humanos a ocorrência de micronúcleos. Como os grupos aqui estudados não diferiram quanto a estas variáveis tal associação não foi analisada.

A despeito dos resultados controvertidos obtidos nos trabalhos em que a ocorrência de micronúcleos em função do hábito de beber foi investigada, o acúmulo de evidências apontando para os riscos dessa exposição é suficiente para desencorajar sua adoção e estimular seu abandono. Apesar do pequeno número de estudos apontando para a genotoxicidade dos anti-sépticos bucais, já existem evidências suficientes para desaconselhar seu uso indiscriminado.

7. CONCLUSÕES

Anti-sépticos bucais são efetivos na indução de efeitos genotóxicos que se traduzem tanto por danos cromossômicos quanto por estímulo da apoptose;

Efeitos genotóxicos conseqüentes à ingestão de bebidas alcoólicas são traduzidos através do estímulo a apoptose;

Trabalhos adicionais avaliando os efeitos genotóxicos do uso de anti-sépticos bucais e de bebidas alcoólicas se fazem ainda necessários para corroborar os resultados aqui descritos, embora estes resultados já evidenciem tais efeitos de modo suficiente para desaconselhar o uso indiscriminado.

8. REFERÊNCIAS

ALTIERI, A. *et al*. Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case–control study from Italy and Switzerland. **Oral Oncology** v. 40, p. 904–909, 2004.

BAHNA. P. *et al.* Antiseptic effect of a novel alcohol-free Mouthwash: A convenient profilactic alternative for high-risk patients. **Oral Oncology**, v. 43, p. 159-164, 2007.

BALLARIN, C. *et al*. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. **Mutat Res.,** v. 280, p. 1-7, 1992.

BENEDETTI, A.; PARENT, M.E.; SIEMIATYCKI, J. Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk of 13 types of cancer in men: Results from a case-control study in Montreal. **Cancer Epidemiology**, v. 32, p. 352-362, 2009.

BLOCHING, M. *et al*. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay, **Oral Oncology**, v. 36, p. 550–555, 2000.

BLOCHING, M. *et al*. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. **Oral Oncology**, v. 44, n. 3, p. 220-6, 2008.

BLOT, W.J. *et al*. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Research**, v. 48, p. 3282-3287, 1988.

BOFFETA, P. *et al*. Cancinogenic 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.

BOHRER, D.D.S. *et al*. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. **Acta Citologica**, v. 49, p. 265-272, 2005.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potencial risk for consumers. **Trends in Food Science e Tecnology**, v. 11 p. 182-187, 2000.

BONASSI, S.; NERI, M.; PUNTONI, R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. **Mutat Res**, v. 480-481, p. 349–358, 2001.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. *In*: RABELLO-GAY, M.N, RODRIGUES, M.A. LA. R., MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese : Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: **Sociedade Brasileira de genética**, p.113-21, 1991.

BUGNO, A.N. *et al*. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **R. Inst. Adolfo Lutz,** São Paulo, v. 65, n. 1, p. 40-45, 2006.

BURIM, R.V. *et al*. Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, p. 187-198, 2004.

CAIRNS, J. Mutational selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, p. 197-200, 1975.

CARRARD, V.C. *et al*. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, p. 49-56, 2008.

CASTELLI, E. *et al*. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. **Hepatogastroenterology,** v. 46, p. 1664-1668, 1999.

CASARTELLI, G. *et al*. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Hisytology,** v. 22, p. 486-492, 2000.

CASTELLSAGUÉ, X. *et al*. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage In oral carcinogenesis. **Int. J. Cancer**. v. 108, p. 741–749, 2004.

CASTRO, T.P.P.G.; FILHO, I. B., Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 272-82, 2006.

CAVALLO, D. *et al*. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated cells of oncology nurses and pharmacy employees. **Mutat Res.,** v. 587, p. 45-51, 2005.

CERQUEIRA, E.M.M. *et al*. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol**, v. 42, p. 639-649, 1998.

CHANG-CLAUDE, J. *et al*. Micronuclei in esophageal cells of Chinese youths in a high-incidence area for esophageal cancer in China. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 1, p. 463-466, 1992.

CHEN, Z.; STORTHZ, K. A.; SHILLITOE, E.J. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. **Cancer Research**, v. 57, p. 1614-19, 1997.

COSTA, J.D. *et al.* Detection of HPV- 16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. **Oral Oncology**, v. 34, p. 413-20, 1998.

DEVI, K.D. *et al*. Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay). **Toxicology**, v. 145, p. 195-201, 2000.

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

DÓREA, L.T.M. Danos Cromossômicos e Apoptose em células esfoliadas do epitélio bucal: associação do habito de fumar e as lesões pré malignas e malignas do epitélio oral. 2008 Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)- Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2008.

DU, X. *et al*. Penetration of N-nitrosonornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **Jornal Oral Pathology**, v. 29, p. 80-85, 2000.

EREN, K.; ÖZMERIÇ, N.; SARDAS¸ S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clin Oral Invest**, v. 6, p. 150–154, 2002.

FIORETTI, F. *et al*. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers.**Oral Oncology**, v. 35 p. 375-378, 1999.

FREITA, V.S. *et al.* Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, p. 189-199, 2005.

GEBRAN, M.P.; GEBERT, A.P.O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, Curitiba, v. 26, p. 45-58, 2002.

GIGLIOTTI, M.P. *et al.* Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. **Odontologia. Clínica-Científica**, Recife, v. 7, n. 2, p. 107-112, 2008.

GOIATO, M. C.; MIESSI, A. C.; FERNANDES, A. U. R. Condições intra e extra orais dos pacientes geriátricos portadores de prótese total. **PCL**, Curitiba, v. 4, n. 21, p. 380- 386, 2002.

GUERRA, M.R.; GALLO; C.V.M.; MENDONÇA G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUZMAN, P. *et al*. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in Papanicolaou smears. **Environ Mol Mutagen.,** v. 41, p. 339-343, 2003.

HAGMAR, L. *et al*. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Res.,** v. 64, p. 2258-2263, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HEEPCHANTREE, W.; PARATASILPIN, T.; KANGWANPONG, D. A Comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer

using the chromosome aberration and the micronucleus tests. **Mutat Res**, v. 587, p. 134-139, 2005.

HERRERO, R. *et al*. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 23, p. 1772–83, 2003.

HINDLE, I. *et al*. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? **Oral Oncology**, v. 36, p. 328-333, 2000.

HOFSETH, L.J.; DUNN, B.P.; ROSIN, M.P. Micronucleus frequencies in urothelial cells of catheterized patients with chronic bladder inflammation. **Mutat Res,** v. 352, p. 65-72, 1996.

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. **Mutat Res**, v. 659, p. 93-108, 2008.

HUANG, W. *et al*. Alcohol Concentration and Risk of Oral Cancer in Puerto Rico. **American Journal Epidemiology**, v. 157, p. 881–887, 2003

INCA- Instituto Nacional do Cancer. Estimativa, Regiões. Disponivel em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?LINK=tbregiões_consolidado.asp&ID=I > Acesso em 24/04/2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human, Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut Related Nitrosamines**. Lyon, France, v. 85, p. 11-18, 2003.

ISHIKAWA, H. *et al*. Gene-environmental interactions between alcohol-drinking behavior and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes. **Mutat Res.,** v. 594, p. 1-9, 2006.

JABER, M.A. *et al.* The role of alcohol in non-smokers and tobacco in non-drinkers in the aetiology of oral epithelial dysplasia. **Int. J. Cancer**, v. 77, p. 333-336, 1998.

JOHNSON, N. Tobacco Use and Oral Cancer: A Global Perspective. **Journal of Dental Education**. v. 65, n. 4, p. 328-339, 2001.

JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, S.; TAVASSOLI, M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk markers for head and neck, especially oral cancer and precancer. **Eur J Cancer Prev,** v. 5, p. 5-17, 1996.

KALBFLEISCH, J.G. probability and statistical inference. **Springer-verlag**. New York, p339. 1979.

KASSIE, F. *et al*. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. **Int J Cancer**, v. 92, p. 329-32, 2001.

KAYANI, M.A.; PARRY, J.M. The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. **Toxicology in vitro**. v. 24, p. 56-60, 2010.

KAUSAR, A., *et al.*, Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without sadagura, a unique smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India. **Mutat Res**, v. 677, p. 72–75, 2009.

KONOPACKA, M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. **Neoplasma,** v. 50, p. 380-382, 2003.

KOWALSKI, L.P.; CARVALHO AL. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 37, p. 94-98, 2001.

LA VECCHIA, C. *et al*. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. **Oral Oncology**, v. 33, p. 302-312, 1997.

LEAL-GARZA, C.H. *et al*. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. **Mutat Res,** v. 515, p. 57-62, 2002.

LEE, C.H. *et al*. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. **Br J Cancer,** v. 10, p. 366-372, 2003.

LIPPMAN, S.M. *et al*. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. **Int J Cancer,** v. 45, p. 811-815, 1990.

LOOMIS, D.P. *et al*. Micronuclei in epithelial cells from sputum of uranium workers. **Scand J Work Environ Health,** v. 16, p. 355-362, 1990.

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

MACIEL, S.S.S.V. *et al.* Prevalência das lesões de tecidos moles causadas por próteses removíveis nos pacientes da Faculdade de Odontologia de Caruaru, PE, Brasil. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr**, v. 8, p. 93-97, 2008

MARINHO, B.V.S.; ARAUJO, A.C.S. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Jornal of dentistry**. Recife, v. 6, p. 124-131, 2007.

MASHBER S.A.M. Early detection, diagnosis and management of oral and oropharyngeal câncer. **Cancer**, v. 67, p. 88-9, 1989.

MARCHIONI, D.ML. *et al*. Fatores dietéticos e câncer oral: estudo caso-controle na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23 n. 3, p. 553-564, 2007.

MCCULLOUGH, M.J.; FARAH, C.S. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. **Australian Dental Journal**, v. 53, p. 302–305, 2008.

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

MIYACHI S. *et al*. Centro de diagnóstico de lesões bucais: potencial do impacto na epidemiologia do câncer de boca em Curitiba. BCI: **Rev Bras Cir Implantodonty,** v. 9, n. 33, p. 80-5, 2002.

MIGNOGNA, M. D. *et al.* La presenza dell' Human Papilloma Virus (HPV) nel carcinoma spinocellulare *in situ* e microinvasivo del cavo orale: Indagini preliminari. **Minerva Stomatol**, v. 46, p. 287-91, 1997.

MONFRIN, R.C.P.; RIBEIRO, M.C. Avaliação*in vitro* de anti-sépticos bucais sobre a Micro biota da saliva. **R. Assoc. Paul. Cir. Dent**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 401-407, 2000.

MOORE, L.E. *et al*. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. **Environ Mol Mutagen.,** v. 27, p. 176-184, 1996.

MOORE, S.R. *et al*. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. **Oral Diseases,** v. 6, p. 65-74, 2000.

MOREIRA, A.N. *et al*. Agentes antimicrobianos no controle da placa supragengival. **Arq. Odontol,** Belo Horizonte, v. 37, n.1, p. 87-98, 2001.

MORSE, D. E. *et al.* Mouthwash Use and Dentures in Relation to Oral Epithelial Dysplasia. **Oral Oncology**, v. 33, n. 5, p. 338-343, 1997.

MUJICA, V.; RIVERA, H.; CARRERO, M. Prevalence of oral soft tissue lesions in an elderly venezuelan population. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 5, p. 270-4, 2008.

NORPA, H. *et al*. Increased sister-chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. **Scand J Work Environ Health,** v. 67, p. 229-302, 1980.

ÖZKUL, Y. *et al*. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cell of habitual users. **Mutagenesis,** v. 12, p. 285-287, 1997.

PARANHOS, V. B. *et al.* Manifestações orais associadas ao uso de próteses totais.Universidade Federal de Uberlândia. *4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica UFU* – 2008

PELÁEZ, M.A.C. *et al*. Colutorios com alcohol y su relación com el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. **Med Oral**, v. 9, p. 116-123, 2004

PEREIRA, A.D. *et al*. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian Green própolis by comet assay and micronucleus test. **Food and chemical toxicology**, v. 46, p. 2580-2584, 2008.

PETERSEN, P.E. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 31, p. 3–24, 2003.

PINDBORG, J. *et al*. Tobacco-induced changes in oral leukoplakic epithelium. **Cancer,** v. 45, p. 2330-2336, 1980.

PINÊRA, K.; NOGUEIRA, A. C. A.; CONSOLARO, A. Determinação do teor alcoólico de anti-sépticos bucais e carcinogênese bucal química. **Rev. Bras. Ciênc. Estomatol**, v. 1, n. 1, p. 13-7, 1996.

PITTEN, F.A.; WERNWR, H.P.; KRAMER, A. A standardized test to assess the impacto of diferent organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. **Jornal of Hospital Infection**, v. 55, p. 108-115, 2003.

POSCHL, G. *et al*. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 65–71, 2004.

Pro-Onco (Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer) do Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: P. 9, 1996.

RACHET, B. *et al*. Cancer risk in laboratory workers: an emphasis on biological research. **Am J Ind Med,** v. 38, p. 651-665, 2002.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H., Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet. Mol. Res**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

REIS, S.R. A. *et al*. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe: Fumo, álcool e outros determinantes. **RPG**, v. 4, n. 2, 1997.

REIS, S.R.A. *et al*. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, p. 221-225, 2002.

REIS, S.R.A. *et al*. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to etanol (Alerações citológicas na mucosa bucal após exposição crônica ao etanol. **Brazilian Oral Research**, v. 20, p. 97-102, 2006.

RIBEIRO, D.A. *et al*., Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **J Periodont Res**, v. 39, p. 358–361, 2004.

SAILAJA, N. *et al.* Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. **Mutat Res**, v. 609, p. 74-80 , 2006.

SALAMA, S.A.; SERRANA, M.; AU, W.W. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. **Mutat Res,** v. 436, p. 99-112, 1999.

SALASPURO, M.P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,** v. 17, p. 679-694, 2003.

SANTOS, N.N.A. Danos citogenéticos e citológicos em indivíduos sobre diferentes formas de exposição à mutágenos, avaliados pelo Teste de Micronúcleo. 2003. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva)- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SARAN, R.; TIWARI, R.K.; REDDY, P.P.; AHUJA, YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. **Oral Oncol**, v. 44, p. 354-360, 2008.

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

SBC- Sociedade Brasileira de cancerologia. Disponivel em <http://www.sbcancer.org.br/final/artigossetor.asp?idart=5> Acesso em 24/04/2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

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

SEITZ, H. *et al*. Alcohol and cancer. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 25, n. 5, p. 137-143, 2001.

SILVERMAN, S. Jr.; SHILLITOE, E.J. Etiology and predisposing factors. In: SILVERMAN JUNIOR, S. J. **Oral Cancer**. 3ª ed. United States of America: American Cancer Society, p. 7-39, 1990.

SOLOMON, E.; BORROW, J.; GODDARD, A.D. Chromosome aberrations and cancer. **Science**, v. 254, p. 1153-1159, 1991.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. World Cancer Report. Lyon: WHO International Agency for Research on Cancer; 2003.

STICH H.F.; CURTIS, J.R.; PARIDA, B.B. Aplication of the micronucleus 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 effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. **Int J Cancer,** v. 31, p. 305-308, 1983a.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Micronuclei in exfoliated human cells as an internal dosimeter for exposures to carcinogens. In: STICH, H.F. (Ed.). **Carcinogens and Mutagens in the Environment**. Boca Raton: CRC Press, 1983b. v.2, p. 17-25.

STICH H.F. Micronucleated exfoliated cells as indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials. **Journal of Nutrition, Growth and Cancer,** v. 4, p. 9-18, 1987.

STICH, H.F.; PARIDA, B.B.; BRUNNEMANN, K.D. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, khaini-tobacco chewers and gudakhu users. **Int J Cancer,** v. 50, p. 172-176, 1992.

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

SURUDA, A. *et al*. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 2, p. 453-460, 1993.

SYRJÄNEN, K.J.; SYRJÄNEN, S.M. Papillomavirus infections in human pathology. England: John Wiley & Sons Ltd; 2000.

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, 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**, v. 271, p. 69-77, 1992**.**

TORRES, C.R.G. *et al*. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **R. Fac. Odontol**. São José dos Campos, v. 2, n. 2, p. 43-52, 2000.

VARELA-LEMA, L. *et al*. Tobacco consumption and oral and pharyngeal cancer in a Spanish male population. **Cancer Letters**, v. 288 p. 28–35, 2010.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. Genética Humana: Problemas e abordagens. 3° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 648, 2000.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncol,** v. 41, p. 244–260, 2005.

WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol,** v. 45, p. 309-16, 2008.

WILTGEN, A. Investigação do potencial genotóxico de Anti-sépticos bucais *IN SITU*. 2007. Dissertação (Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas – RS, 2007.

WINN, D.M. *et al*. Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. **New England Journal of Medicine,** v. 304, p. 745-749, 1981.

WINN, D. M. *et al*. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. **Cancer Research**, v. 51, n. 11, p. 3044-47, 1991.

WU, P.A. *et al*. Clastogenic effect for cigarette smoking, but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. **Mutat Res,** v. 562, p. 27-38, 2004.

XAVIER, S.D. *et al*. Freqüência de Aparecimento de Papilomavírus Humano (HPV) na Mucosa Oral de Homens com HPV Anogenital Confirmado por Biologia Molecular. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol**, São Paulo, v. 11, p. 36-44, 2007.

XAVIER, J. C. *et al*. Levantamento epidemiológico das lesões bucais apresentadas por pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco durante o período de janeiro de 2006 a julho de 2008. **Int J Dent**, Recife, v. 8, p. 135-139, 2009.

XUE, K. *et al*. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea drinking habits. **Int J Cancer**, v. 50, p. 702-705, 1992.

ZANINI, M. *et al*. Carcinoma verrucoso: uma variante clínico-histopatológica do carcinoma espinocelular. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 5, p. 619-621, 2004.

ZHANG, L. The value of glutathione S-tranferase and gamma-glutamyltranspeptidase as markers of altered foci during hamster pouch carcinogenesis. **Carcinogenesis,** v. 15, p. 105 - 109, 1994.

APÊNDICE I

	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA Departamento de Ciências Biológicas Laboratório de Genética Toxicológica

QUESTIONÁRIO DE ENTREVISTA

Data: / /

Identificação:

01. Número:		02. Data de Nascimento: / /
03. Idade:	04. Sexo:	05. Estado Civil:
06. Grau de Instrução: ( ) Analfabeto ( ) 1º grau ( ) 2º grau ( ) 3º grau		
07. Endereço (Rua, Av.):	08. Nº	09. Aptº:
10. Bairro:	11. Cidade:	12. Estado: / 13. CEP.:
14. Telefone:	15. Zona:	
16. Ocupação Atual:	17. Tempo de atividade:	

Hábitos de Fumar:

01. Hábitos Tabagistas:

( ) fuma ( ) não fuma ( ) nunca fumou ( ) já fumou

Uso de medicamentos

01. Uso freqüente de algum medicamento:

( ) Sim ( ) Não

Exposição à radiação

01. Exposição freqüente à radiação:

( ) Sim ( ) Não

Exposição à produtos tóxicos

01. Exposição à produtos tóxicos:

( ) Sim ( ) Não

Uso de Anti-séptico Bucal:

01. **Uso de Anti-séptico Bucal**: ( ) Sim ( ) Não	02. Há quanto tempo . ( ) 1 a 6 meses. ( ) 6 a 12 meses. ( ) 1 ano a 1,5 ano ( ) 1,5 ano a 2 anos. ( ) mais de 2 anos _____ anos ( ) Não se aplica.
03. Freqüência de uso. ( ) diária ___ vezes ao dia. ( ) semanal ___ vezes por semana. ( ) mensal ___vezes por mês. . ( ) Não se aplica	
04. Tipo do anti-séptico: ( ) Contém álcool ( ) Não contém	05. Marca(s).

Hábitos de Beber

01. Uso de bebida alcoólica:	02. Freqüência:	
( ) Sim ( ) Não	( ) diariamente ( ) 2 a 3 vezes/semana ( ) 1 vez/semana ( ) Não se aplica	
03. Tipo de bebida/quanto bebe:		
( ) cachaça. ____ copos (200ml) ( ) conhaque. ____ copos (200ml)	( ) cerveja. ____ copos (200ml) ( ) whisky. ____ copos (200ml) ( ) vinho. ____ copos (200ml)	( )outras Quas(is): _____ ____copos (200ml) ( ) não se aplica
04. Há quanto tempo bebe:		
( ) menos de 6 meses ( ) 6 meses a 1 ano ( ) 01 a 05 anos ( ) 05 a 10 anos ( ) não de aplica		

Antecedentes familiares

01. Câncer na família:	02. Localização topográfica:
( )Sim ( ) Não	( ) boca ( ) colo de útero ( ) mama ( )próstata ( ) pele ( ) outros. Qual: _____

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Rodrigo dos Santos Rocha (estudante do mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana) e a Profª Eneida de Moraes M. Cerqueira (pesquisadora colaboradora) estamos fazendo uma pesquisa como objetivo de investigar possíveis danos no DNA das células da bochecha da boca que podem ser causados pelo consumo de bebidas alcoólicas e/ou pela utilização de anti-séptico bucal. O álcool e outras substâncias presentes nos anti-sépticos bucais podem alterar o material genético (DNA) e com isso aumentar o risco de câncer de boca. O exame que propomos, chamado de Teste de Micronúcleo, pode ser considerado uma medida preventiva para essa doença para a qual é fundamental detectar sinais antes que seus sintomas apareçam. Neste exame podemos observar alterações nas células da boca, isso não quer dizer que a pessoa terá câncer, mas é importante porque pode indicar que estes produtos fazem mal para sua saúde e por isso você deverá evitar o seu uso. Para o exame, se você concordar, apenas vamos fazer uma raspagem suave em sua bochecha com uma escova descartável para colher as células. Isto é rápido e não causa dor, mas você poderá sentir um pouco de desconforto por ter de ficar aproximadamente três segundos com a boca aberta.

Se você concorda em participar da pesquisa pedimos para responder algumas perguntas feitas em entrevista, e para fazer uma leve raspagem da sua bochecha. Todos os resultados ficarão apenas sob a nossa responsabilidade e nos comprometemos manter sigilo dos mesmos e serão utilizados exclusivamente para essa pesquisa. Você tem liberdade de recusar a participação na pesquisa ou mesmo de desistir de continuar participando da pesquisa a qualquer tempo e esta decisão não terá nenhuma interferência em seu atendimento nas clínicas odontológicas da UEFS. Estaremos sempre a sua disposição, pessoalmente, ou pelo telefone (dados abaixo) para responder qualquer pergunta ou esclarecer dúvidas em relação à pesquisa. Se você se sente devidamente esclarecido(a), e concorda em participar da pesquisa, peço que você assine o presente documento elaborado em duas vias, que também será assinado por nós, ficando com uma delas.

Feira de Santana, ____ de _____ de _____.

_____ _____

Rodrigo dos Santo Rocha — Eneida de Moraes M. Cerqueira

Pesquisador responsável — Pesquisadora Orientadora

_____

Participante

Em caso de dúvidas estaremos a sua disposição no seguinte endereço:

Universidade Estadual de Feira de Santana/Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Genética Toxicológica

Av. Transnordestina, S/Nº - Novo Horizonte

Feira de Santana - BA CEP 44.036-900

Tel. (75) 3224 8285

ANEXO I

Protocolo de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / CEP-UEFS
Av. Universitária, S/N – Módulo I – 44.031-460 – Feira de Santana-BA
Fone: (75) 224-8124 Fax: (75) 224-8019 E-mail: cep@uefs.br

Feira de Santana, 06 de maio de 2009
O f. CEP-UEFS n^0 047/2009

Senhor(a) Pesquisador(a): Rodrigo dos Santos Rocha

Tenho muita satisfação em informar-lhe que o atendimento às pendências referentes ao seu Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador de risco para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais"**, registrado neste CEP sob **Protocolo N.º 007/2009 (CAAE 0007.0.059.000-09)**, satisfaz às exigências da *Res. 196/96*. Assim, seu projeto foi **Aprovado** podendo ser iniciada a coleta de dados com os sujeitos da pesquisa conforme orienta o *Cap. IX.2, alínea a – Res. 196/96.*

Na oportunidade informo que qualquer modificação feita no projeto, após aprovação pelo CEP, deverá ser imediatamente comunicada ao Comitê, conforme orienta a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea b.*

Relembro que conforme instrui a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea c*, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída.

Em nome dos membros do CEP-UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano **(06/05/2010)** este CEP aguardará o recebimento do seu relatório.

Atenciosamente,

Maria Ângela Alves do Nascimento
Coordenadora do CEP-UEFS.