

ANDRESSA NAYARA DEGEN

*Discente do curso de Biomedicina da
Universidade Luterana do Brasil, Canoas -
RS.*

TIAGO BARCELOS VALATTI

*Farmacêutico graduado pelo Centro
Universitário Luterano de Ji - Paraná, Ji -
Paraná - RO.*

VINÍCIUS MARQUES DE FREITAS

*Discente do curso de Biomedicina do Centro
Universitário Luterano de Ji - Paraná, Ji -
Paraná - RO.*

DÉBORA PEREIRA AZAMBUJA DE SOUZA

*Biomedica graduado pelo Centro Universitário
Luterano de Ji - Paraná, Ji - Paraná - RO.*

NATÁLIA FÁRIA ROMÃO

*Mestre, Docente do curso de Ciências
Biológicas do Centro Universitário Luterano
de Ji - Paraná, Ji - Paraná - RO.*

FABIANA DE OLIVEIRA SOLLA SOBRAL

*Mestre, Docente do curso de Biomedicina do
Centro Universitário Luterano de Ji -
Paraná, Ji - Paraná - RO.*

*Recabi do em julho de 2017.
Aprovado em novembro de 2017.*

AVALIÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a mutagenicidade por meio da técnica de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes. Para tanto, participaram do estudo 15 indivíduos que responderem um questionário e foram submetidos à coleta de material para análise de micronúcleo, seguindo a metodologia recomendada. Os resultados demonstraram um maior percentual de participantes do sexo masculino. Ainda, 33% relataram possuir o hábito de fumar, 26% consomem medicamentos com frequência, 6,66% de expõe a algum tipo de radiação além da emitida pelos raios solares, e 86% consomem bebidas alcoólicas. Quanto às análises de micronúcleos observou-se que, as maiores médias estavam entre aqueles que fumavam, sugerindo assim uma possível relação desses fatores, no entanto, destaca-se a necessidade de continuidade desse estudo.

Palavras-Chave: Mutagenicidade, Micronúcleo, Mucosa Oral.

EVALUATION OF MICRONUCLEATIONS IN SMOKY AND NON-SMOKING MUCOSA CELLS

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the mutagenicity by micronucleus technique in buccal mucosa epithelial cells of smokers and nonsmokers. For this, 15 individuals who answered a questionnaire and were submitted to the collection of material for micronucleus analysis, following the recommended methodology, participated in the study. The results showed a higher percentage of male participants. Still, 33% reported having a habit of smoking, 26% consume drugs frequently, 6.66% of them expose to some type of radiation besides the emitted by the solar rays, and 86% consume alcoholic drinks. Regarding the micronuclei analyzes, it was observed that the highest averages were among those who smoked, thus suggesting a possible relation of these factors, however, it is necessary to continue this study.

Keywords: Mutagenicity, Micronucleus, Oral Mucosa.

INTRODUÇÃO

O câncer bucal trata-se de uma doença crônica, multifatorial, ocasionada pela influência mútua de diversos fatores etiológicos, que interferem na proliferação e crescimento celular. O álcool, radiação solar, fumo, dieta, microrganismos e deficiências imunológicas, estão entre os principais fatores de riscos para essa patologia (OGDEM e MACLUSKEY, 2000; SILVERMAN, 2001; WÜNSCH-FILHO, 2002).

As células da mucosa oral são consideradas sistemas importantes para a avaliação de danos no DNA, por se tratar da primeira barreira contra substâncias tóxicas e mutagênicas. Além de ser alvo primário de exposição, a obtenção minimamente invasiva destas células possibilita o monitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos e permite fazer associações entre o estilo de vida e os danos encontrados nesse epitélio. Esses danos são causados pela instabilidade genômica que é caracterizada pelo aumento nas alterações do material genético da célula (SETÚBAL et al., 2005; DIETZ et al., 2000; MARTINS; FILHO, 2003).

Uma forma de avaliar os danos citados anteriormente é através do Teste de Frequência de Micronúcleos, o qual é muito utilizado na área da pesquisa por ser um teste prático, de baixo custo, sensível mensurando de forma apurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA. Além disso, o micronúcleo aparece após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou até mesmo histológica (SETÚBAL et al., 2005; DIETZ et al., 2000; MARTINS; FILHO, 2003).

Os micronúcleos são formações globulares de DNA, originados a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular podendo variar de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo da célula analisada. A avaliação de micronúcleo é eficiente na avaliação do dano celular, ocasionado por algum agente, no momento da divisão da célula, afetando assim o DNA tecidual, consequentemente predispõe a formação de neoplasias. (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; KERN, 2006)

Devido isto, o teste de micronúcleo se tornou amplamente utilizado na avaliação de inúmeras substâncias, determinando se, podem ser ou não, carcinogênicas. A simplicidade de seu emprego leva a uma utilização mundial e consequentemente a uma gama de pequenas divergências na padronização da técnica dos resultados obtidos. O estabelecimento de um protocolo de padronização de teste de micronúcleo é necessário, contudo, o mesmo ainda está incompleto. (KERN, 2006).

Diante do exposto o presente estudo tem como objetivo avaliar a mutagenicidade utilizando a técnica de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes.

METODOLOGIA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Ji - Paraná sob parecer de número 790.708/2014.

Participaram do estudo 15 indivíduos, que foram abordados de maneira aleatória e aceitaram participar da pesquisa, onde que, estes responderam um questionário e foram submetidos a coleta da amostra.

Para a coleta das amostras foi realizada a lavagem da boca dos participantes com água destilada (três repetições) para remoção de traços de saliva e de superfície e mucosa. Em seguida, foi realizada a esfoliação nas duas faces para maximizar a amostra celular.

A esfoliação foi realizada com uma escova descartável Cytobrush, sendo feitas 10 rotações da escova contra a parede interior das bochechas começando no centro e aumentando gradualmente a circunferência, produzindo uma espiral com intuito de aumentar a amostragem de uma área maior e prevenir erosão contínua de uma única região. Após a esfoliação, a cabeça da escova foi colocada em um tubo de ensaio com 4ml de tampão,

sendo de 0,01 M de Tri s cl ori drato (Tri s-HCl), 0,1 M de áci do eti lenodi ami notetracéti co (EDTA) e 0,02 M de cloreto de sódi o (NaCl), com pH 6,8, para que as células fossem libertadas e deslocadas na borda interna do tubo, o qual foi bem fechado para evitar a fuga de células (durante o transporte para o laboratório). (THOMAS et al, 2009).

No laboratório, os tubos foram homogeneizados por vórtex, e removida a escova a partir do tubo de ensaio, sendo o mesmo centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, e, em seguida descartado o sobrenadante e acrescentado 4 ml de solução tampão para lavagem das células, promovendo a remoção das bactérias. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, completando três lavagens.

Em seguida, foi adicionado 2 ml de Tri ari l metano 0,1% e 2 ml de xanti nas 0,1% (solução fixadora), a solução foi novamente homogeneizada no vórtex e centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi eliminado, deixando apenas a pellet branco com três vezes a quantidade de pellet de solução 50% Tri ari l metano a 0,1% e 50% xanti nas 0,1%, que foi novamente homogeneizada. Em sequência a homogeneização do produto foram gotejadas 3 gotas em lâminas pré-aquecidas a 37 ° C com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocados a secar à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após a secagem, as lâminas foram marcadas com tri ari l metano 0,1%, e xanti nas ti azi na 0,1%, e as lâminas imersas 10 vezes em cada contentor, com a duração de 1 segundo por imersão, usando a sequência descrita acima. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada para remoção do excesso de corante e secas à temperatura ambiente durante 30 minutos, para contagem de células posteriormente. (MENEQUETTI et al, 2012)

Foram analisados por microscópio óptico 1000 células por lâminas, sendo contadas apenas as células aparentemente saudáveis e íntegras, avaliando assim, a incidência de micronúcleos. Os resultados foram submetidos a análise estatística.

RESULTADOS

Do total de participantes, 60% eram do sexo masculino e 40% do sexo feminino, sendo que a idade média dos mesmos foi de 28,4±8,56.

Com relação ao hábito de fumar, 33,33% afirmaram praticar tal ato, onde que, 60% relataram fumar esporadicamente, 20% menos que um maço por dia e 20% não responderam. Quanto ao motivo que começou a fumar, 60% narraram que foi por influência de pessoas próximas e 40% por curiosidade. Destaca-se que ambos começaram a fumar antes dos 18 anos.

Quando perguntados se faziam o uso frequente de medicamentos, observou-se que 26,66% responderam que sim, sendo a ri tal ina, torsi lax e ni mesul ida os medicamentos citados.

Os participantes foram questionados se ficavam expostos a algum tipo de radiação que não fosse à emitida pelos raios solares e/ou algum produto tóxico, onde constatou que um indivíduo (6,66%) respondeu sim para a questão sobre radiação. Já para a exposição a agentes tóxicos 100% responderam negativamente.

Sobre o hábito de beber, 86,66% dos participantes responderam ter esse costume, sendo que a maioria (77%) consome bebida alcoólica 1 vez por semana. As bebidas citadas pelos participantes foram cerveja (100%), whiskey (30,77%), vinho (23%) e vodka (3,84%).

Maioria dos entrevistados (53,33%) afirmou ter tido na família casos de câncer, sendo que, os tipos mais citados foram o de intestino, fígado, mama, pele, colo do útero, cabeça e boca.

A Tabela 1 expõe os resultados de micronúcleos obtidos por meio das análises, onde se observa que as maiores médias de micronúcleos foram encontradas em pacientes que estavam expostos seja apenas ao tabaco, ou tabaco e álcool.

Tabela 1. Micronúcleos observados em pacientes fumantes e não fumantes.

Participante	Micronúcleo			Média	Desvio Padrão
	Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3		
1	6	3	5	4,66	1,52
2	1	2	2	1,66	0,57
3	4	7	6	5,6	1,52
4	7	5	9	7	2
5	4	6	8	6	2
6 11	6	3	2	3,66	2,08
7 12	13	16	12	13,66	2,08
8 13	12	11	14	12,33	1,52
9 14	14	11	16	13,66	2,51
10 15	0	2	0	0,66	1,15
11 *6	20	15	18	17,66	2,51
12 *7	1	0	1	0,66	0,57
13 *8	16	27	24	22,33	5,68
14 *9	10	27	15	17,33	8,73
15 *10	14	18	10	14	4

Legenda - *Indivíduos fumantes.

DISCUSSÃO

No presente estudo 33,33% dos participantes relataram fumar, Já o consumo de bebidas alcoólicas foi constatado na maioria dos participantes, relevando que tal ato é frequente entre a população estudada.

A utilização de tabaco pela população tem se tornado uma prática preocupante para a saúde pública já que esse consumo está diretamente relacionado a cerca de 5 milhões de mortes anuais em todo o mundo, sendo que maior parte destas, estão concentradas em países pobres e em desenvolvimento. Destaca-se que mesmo diante da grande quantidade de morte causadas pelo tabaco a tendência de consumo é aumentar ainda mais, que conseqüentemente irá aumentar a quantidade de óbitos, estimativas demonstram que até na década de 2030, o número de mortes anuais em decorrência do tabaco ultrapasse os 8 milhões (WHO, 2009).

Além do mais, o tabaco tem sido citado como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas, já o álcool apesar de não agir diretamente no DNA é visto como um agente potencializador no desencadeamento de lesões cancerosas, já que o mesmo age de forma sinérgica aumentando a permeabilidade da membrana celular, facilitando desta forma o acesso dos genotóxicos ao núcleo celular. Além de que, seu subproduto acetaldeído, resultado do álcool metabolizado, é responsável pela maior incidência de câncer em alcoólatras. O mecanismo que associa esses agentes a um aumento do risco fundamenta-se na composição química e na interação com outros fatores. (SETÚBAL et al., 2005; VISAPÃÄ; TILLONEN; SALASPURO, 2002).

Apenas um participante relatou ficar exposto a algum tipo de radiação além da ultravioleta, sendo este um resultado satisfatório visto que a maioria demonstrou ter esse hábito, já que exposições frequentes a radiações podem provocar sérios danos a saúde da população.

Toda população está exposta a radiação ultravioleta, entretanto salienta-se que se deve ter um controle contra essa exposição já que, a exposição solar cumulativa é a maior responsável por neoplasias cutâneas (GALLAGHER E LEE, 2006).

No presente estudo as maiores médias de micronúcleos foram observadas entre aqueles que fumavam sugerindo assim uma possível relação entre essas variáveis, porém, vale destacar que existe uma série de fatores relacionados ao aparecimento dos

micronúcleos, o que justifica o resultado do participante 12, que declarou fumar, mas foi o que apresentou menor média de micronúcleos.

Outro participante que chama atenção é o número 13, pois este apresentou a maior média. Sugere-se que esse alto índice pode ser resultado de uma combinação de vários fatores, pois o mesmo, afirmou fumar, utilizar medicamento com frequência, ficar exposto a uma radiação além da ultravioleta e ingerir bebidas alcoólicas, além disso, o mesmo relatou já ter tido caso de câncer bucal na família, porém não podemos afirmar que também exista alguma relação genética, pois para isso necessita-se de estudos aprofundados.

Batista e Júnior (2014) constataram em seu estudo uma maior frequência de micronúcleos no grupo de participantes expostos (tabaco e tabaco e álcool) quando comparado ao grupo controle (abstêmios de tabaco e álcool). Souza et al. (2014), estudando, não fumantes, fumantes e ex-fumantes verificaram que os participantes que declararam ser não fumantes apresentaram média inferior de micronúcleos. Resultado semelhante também foi observado por Martins e Filho (2003), pois observaram maior frequência de micronúcleos em fumantes.

CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos, conclui-se que maioria da amostra possui o hábito de fumar, usar medicamentos de modo frequente e ficar exposta a radiação, enquanto que, maioria relatou consumir bebidas alcoólicas. Quanto ao valor de micronúcleos observado, verificou-se que as maiores médias encontradas foram entre os que possuíam o hábito de fumar, porém, a menor média também foi encontrada nesse grupo populacional, demonstrando, portanto, a necessidade de continuidade deste estudo, visto que existe uma diversidade de fatores além dos aqui relatados que interferem no aparecimento ou não, de micronúcleos, podendo assim explicar a discrepância constatada.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, C. R.; JUNIOR, E. O. C. Avaliação da genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. *Getec*. v. 3, n. 6, p. 49-54, 2014.
- DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Rev Ass Méd Brasil*, v 46, n 3, p. 207-11, 2000.
- GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultravioleta radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol*. V. 92, P. 119-131, 2006.
- KERN, R. Avaliação de micronúcleos em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia. Dissertação. 66f. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.
- KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res*, v. 540, p. 153-163, 2003.
- MARTINS, K. F.; FILHO, J. B. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.
- MARTINS, K. F.; FILHO, J. B. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes, *Rev Fac Ciênc Méd*, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; BOSSO, R.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J. New method for detection of mutagenicity in oral mucosa through of micronucleus test. *HOAJ Biology*, v. 1, n. 8, p. 1-4, 2012.

OGDEN, G. R.; MACLUSKEY, M. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 1. Prevention. *Dent Update*. 2000; 27: 95-9.

SETÚBAL, A. M. G.; REIS, S. R. A.; ROBINSON, W. M.; BOR-GES-OSÓRIO, M. R. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal, *Revista Odonto Ciência*. V. 20, N. 48, P. 137-141, 2005.

SILVERMAN, S. JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends the challenge. *J Am Dent Assoc*. v. 132, n. 7S-11S, 2001.

SOUZA, A. M.; SILVA, A. M.; RAMOS, L. J.; ZAN, R. A.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do efeito mutagênico em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, e-fumantes e não-fumantes. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*. v. 9, n. 3, p. 43-53, 2014.

THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, v. 4, n. 6, p. 825-37, 2009.

VISAPAA, J. P.; TILLONEM, J. S.; SALASPURO, M. P. Microbes and mucosa in the regulation of intracolonic acetaldehyde concentration during ethanol challenge. *Alcohol and Alcoholism*. v. 37, n. 4, p. 322-326, 2002.

WHO. World Health Organization. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563918_eng_full.pdf [Acessado em 23 de junho de 2017].

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*. v. 38, p. 737-746, 2002.