



FACULDADE DE EDUCAÇÃO E MEIO AMBIENTE

ADRIANA MARTINS DE SOUZA

**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO EM CÉLULAS
EPITELIAIS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE
FUMANTES, EX-FUMANTES E NÃO-FUMANTES**

Adriana Martins de Souza

**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO EM CÉLULAS
EPITELIAIS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE
FUMANTES, EX-FUMANTES E NÃO-FUMANTES**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Profº. Orientador: Ms. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti.

Adriana Martins de Souza

**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO EM CÉLULAS
EPITELIAIS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE
FUMANTES, EX-FUMANTES E NÃO-FUMANTES.**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Orientador Ms. Dionatas Ulises de Oliveira
Meneguetti
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Prof. Ms. Leandro José Ramos
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Prof^a. Ms. Vera Lúcia Matias Gomes Geron
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Ariquemes, 18 de Maio de 2013.

Aos meus pais pela educação que me deram, base perfeita para construir o meu saber.

Ao meu esposo e filho por tudo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pela dádiva da vida, pela saúde, sabedoria, pela força e coragem durante essa longa caminhada. À minha mãe, Maria Aparecida, ao meu pai, Adenor e aos meus irmãos, Alessandra e Renan por serem meus maiores exemplos e meu porto seguro em todos os momentos da minha vida, em especial, ao meu esposo Marcelo Thiago e ao meu filho Caio Henrique, pela compreensão e paciência que tiveram devido às inúmeras vezes em que estivesse ausente.

Agradeço também às minhas amigas Georgiane Nascimento, Nelimar Spadotto e Aline Marques por tornarem a faculdade um momento inesquecível em minha vida, pelo companheirismo e amizade criados ao longo desses quatro anos e meio que estivemos juntas.

Ao meu orientador Prof. Ms. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, por toda dedicação, pelas orientações a mim prestadas nos momentos solicitados, por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência, contribuindo para meu crescimento profissional.

A todos os professores do curso de Farmácia que foram tão importantes na minha vida acadêmica, pelos ensinamentos que contribuíram imensamente para minha graduação.

E por fim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

A todos o meu profundo: **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

As inúmeras alterações que o tabaco provoca por todo o organismo vivo são amplamente conhecidas e divulgadas. As células da mucosa oral são bioindicadores de alterações mutagênicas provocadas por agentes agressores como o cigarro e o micronúcleo (MN) é um marcador biológico eficaz na detecção dessas alterações. O presente estudo objetivou analisar os efeitos mutagênicos em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes e ex-fumantes. Avaliou-se quarenta pacientes de ambos os sexos com idades variáveis, os quais foram divididos em quatro grupos de estudo (não-fumantes, fumantes > 10 anos, fumantes < 10 anos e ex-fumantes), a coleta das células foi realizada na mucosa oral especificamente na parte jugal (bochecha). As lâminas foram preparadas conforme descrito por Meneguetti et al. (2012). A contagem das células se deu por um observador cego, sendo avaliadas 1000 células por lâmina analisando a presença de MN. Constatou-se que fumantes > 10 anos tem um aumento significativo da frequência de MN em relação aos grupos de fumantes < 10 anos e não-fumantes, sendo que esses danos permanecem no grupo de ex-fumantes não havendo uma redução dos danos provocados pelo tabagismo e sim uma persistência. É importante ressaltar que os grupos de fumantes > 10 anos e ex-fumantes são formados por pessoas com média de idade superior aos grupos de fumantes < 10 anos e não-fumantes, o que pode ter ocorrido como co-fator dos resultados obtidos, o mesmo também foi observado com o consumo de álcool.

Palavras-Chave: Tabaco; Micronúcleo; Mutagenicidade; Mucosa Oral; Cigarro.

ABSTRACT

The numerous changes that tobacco causes in the living organism are widely known and disseminated. The cells of the oral mucosa are bioindicators of mutagenic changes caused by aggressive agents such as cigarette and micronucleus (MN) is an effective biomarker detection of these changes. The present study aimed to analyze the mutagenic effects in buccal mucosa cells epithelial exfoliated of smokers and former smokers. We evaluated forty patients of both sexes with varying ages, which were divided into four study groups (non-smokers, smokers > 10 years, smokers < 10 years and former smokers), material was collected in the oral mucosa specifically the inside of the buccal (cheek). Slides were prepared as described by Meneguetti et al. (2012). The cell count was made by a blind observer that evaluated 1000 cells per slide analyzing the presence of MN. It was observed that smokers > 10 years have a significant increase in MN frequency in the groups smokers < 10 years and non-smokers, and that this damage remains in the group of former smokers with no reduction of the damage caused by smoking, but persistence. It is important to specify that these groups smokers > 10 years and former smokers are formed by people with average of age groups smokers < 10 years and non-smokers, which may have occurred as a co-factor of the results. The same result was observed as in alcohol.

Keywords: Tobacco; Micronucleus; Mutagenicity; Oral Mucosa; Cigarette.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de Micronúcleo.....	16
Figura 2 - Formação do pellet branco após centrifugação da amostra.....	22
Figura 3 – Células Contendo um micronúcleo ou mais de um micronúcleo.....	23
Figura 4 - Média de micronúcleos em 1000 células da mucosa jugal em diferentes grupos.....	26
Figura 5 - Análise descritiva da média de idade dos participantes dos grupos de estudo.....	27
Figura 6 - Análise descritiva da média de micronúcleos versus média de idade dos participantes.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQCT	Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
et al.	e Colaboradores
FAEMA	Faculdade de Educação e Meio Ambiente
MN	Micronúcleo
OMS	Organização Mundial de Saúde
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 HISTÓRIA DE TABACO.....	12
2.2 COMPOSIÇÃO DO CIGARRO E SEUS MALEFÍCIOS.....	13
2.3 MUTAGENICIDADE E TESTE DE MICRONÚCLEO	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 GRUPO DE ESTUDO	20
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	21
4.3 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS	21
4.4 PREPARO DAS LÂMINAS.....	21
4.5 CONTAGEM DAS CÉLULAS	23
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	36
APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO DE HÁBITOS	39
ANEXO - CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	41

INTRODUÇÃO

O tabaco é derivado de duas plantas vegetais, a *Nicotiana tabacum* e a *Nicotiana glauca* (BALBANI; MONTOVANI, 2005). Recebeu esse nome “nicotina” em 1559, em homenagem ao descritor de suas propriedades medicinais e prazerosas, Jean Nicot (VALE, 2002).

Segundo Balbani e Montovani (2005), antigamente o tabaco era muito difundido entre os índios, sendo empregado de diversas formas, das quais, rituais religiosos, inseticidas em plantações, fumado em cachimbos, mascado, aspirado, ingerido ou tomado em preparações de chás. Considerado ainda uma importante planta medicinal, tinha sua utilização para lavagens intestinais, no combate ao piolho, como colírio e adicionados em preparações de unguentos, analgésicos e anti-sépticos.

Nos dias de hoje as inúmeras alterações que o tabaco provoca por todo o organismo vivo são amplamente conhecidas e divulgadas. Por isso, o tabagismo é considerado uma das mais severas pandemias mundiais (FIGUEIREDO et al., 2003).

O tabaco é responsável pela morte de aproximadamente cinco milhões de pessoas por ano em todo o mundo (OLIVEIRA; FUREGATO, 2012; ARORA et al., 2011).

Tem-se o conhecimento que o hábito de fumar dá origem à aproximadamente cinquenta tipos de doenças, onde se destacam as doenças cardiovasculares, o câncer e a doença respiratória obstrutiva crônica (ABREU et al., 2011).

De acordo com Szklo et al. (2011) a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que o tabagismo é um fator a ser ponderado, uma vez que é considerado a segunda causa de mortalidade mundial.

Segundo Duarte et al. (2006) a OMS prioriza campanhas contra o fumo através da imprensa falada e escrita com intuito que esse quadro seja evitado.

Hoje em dia, a grande parte do tabaco fumado no Brasil é referido ao cigarro (SZKLO et al., 2011). Entre os danos que o cigarro provoca à saúde, o potencial de desenvolver câncer é um dos fatores mais relevantes, cerca de 10% das neoplasias que acometem o corpo humano se desenvolvem na cavidade oral (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar da origem do câncer ser bastante confusa, existem inúmeros agentes que representam fatores de risco para sua formação, ou seja, provavelmente o câncer seja oriundo da soma e/ou combinação dos agentes e não causado por um em particular (PRIMO et al., 2010).

Segundo Lourenço et al. (2010) vários agentes tem sido relatados nas literaturas como causas de risco para a progressão de lesões neoplásicas, tendo estes, grande capacidade de alterar alguns processos vitais celulares como duplicação, expressão gênica e alterações cromossômicas.

Embora os sistemas de defesa celular sejam muito eficazes, a estrutura cromossômica tem alta sensibilidade, por isso estão mais suscetíveis a ação dos agentes clastogênicos que são aqueles que rompem a estrutura dos cromossomos e/ou dos agentes aneugênicos que são os que interferem no fuso durante a mitose, gerando aberrações cromossômicas que podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasia (CARRARD et al., 2007).

Destas aberrações cromossômicas, originam-se os micronúcleos (MN), que são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula-filha durante o processo de divisão celular (DIETZ et al., 2000).

O MN é considerado um marcador biológico, e vários estudos demonstraram que o teste do MN é eficaz na detecção de alterações mutagênicas, tanto em células epiteliais da mucosa oral como esofágica e brônquica (CARVALHO et al., 2002).

A utilização de células epiteliais esfoliadas da mucosa oral como bioindicador de alterações mutagênicas se dá pelo fato de ser a primeira barreira física quando expostas a agentes genotóxicos, seja por inalação ou ingestão, devido à capacidade de metabolizar esses agentes (MENEGUETTI et al., 2012).

Devido à grande popularidade e utilização de cigarros industrializados, é importante investigar a presença de MN como marcador de danos citogenéticos para avaliar a intensidade da injúria causada nas células epiteliais da mucosa oral (REIS et al., 2002). O teste do micronúcleo tem sido utilizado nos mais variados tipos de pesquisa para avaliar a ação de diversos agentes agressores e classificá-los como mutagênicos ou não mutagênicos (KERN, 2006).

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DO TABACO

O tabagismo é considerado uma das mais severas pandemias evitáveis criada pelo homem e um grave problema de saúde pública (BALBANI et al., 2006).

O vício do tabaco vem sendo construído na história da humanidade a mais de 500 anos. Difundiu-se pela Europa a partir do momento que Cristovão Colombo, em Cuba, se deparou com o cultivo e uso do tabaco pela população indígena, levando sementes da planta para Portugal, Espanha, França e Inglaterra (HORTENSE et al., 2008).

No ano de 1850 na Inglaterra surgiram os primeiros cigarros industrializados, popularizando o crescimento do seu consumo nas décadas de 1950 e 1960. O tabaco tinha as mais diversas indicações e era considerada uma erva com várias propriedades curativas, porém essas indicações medicinais decaíram a partir de 1971 quando houve uma publicação nos Estados Unidos de um relatório oficial certificando que a utilização de tabaco afeta negativamente a saúde do ser humano, além de cooperar para o progresso de doenças graves (BALBANI; MANTOVANI, 2005).

Mesmo conhecendo os malefícios causados pelo tabaco, a sua utilização está relacionada ao hábito prazeroso, vigor, beleza, poder, charme, no alívio de tensões, tristezas e depressões, como auxílio em momentos de insegurança, para tranquilizar, disfarçar timidez, como ato de independência e rebeldia, para aliviar frio, fome, sono e medo, e ainda acumpliciado ao consumo de álcool e café, jogos e reuniões. (CONSUEGRA; ZAGO, 2004).

De acordo com Malta et al. (2010), dados da OMS computa que aproximadamente cinco milhões de óbitos anuais são atribuídos mundialmente ao tabagismo, o que corresponde há mais de 10 mil mortes diárias, e no Brasil, estima-se que o tabagismo responda por 200 mil óbitos ao ano, diante disto, vários países se unem para sobrepujar o tabagismo, um exemplo é a implantação da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco (CQCT) o qual o Brasil está diretamente ligado visando promover a inspeção e vigilância sobre o predomínio do tabagismo.

Segundo Iglesias et al. (2008), tem-se notado uma queda considerável de fumantes nas últimas décadas, devido aos programas implantados pelo governo brasileiro, como aumento dos preços dos produtos, ambientes isentos de fumaça, campanhas midiáticas, coibição da publicidade e patrocínio dos produtos, mensagens e imagens de advertências no verso dos produtos de tabaco, restrição ao acesso de compra dos produtos por crianças e adolescentes e a fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sobre os produtos e produtores do tabaco.

Chaves e Oyama (2008) relatam ainda sobre os tratamentos oferecidos aos dependentes do tabaco, como farmacológico através de medicações e/ou reposição de nicotina, e não farmacológicas como, material de auto-ajuda, orientação presencial ou telefônico, ação em grupo, tratamento comportamental, acupuntura e hipnose.

Segundo Brasil (2012b), a OMS afirma que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas sejam fumantes, correspondendo a 47% da classe masculina e 12% da classe feminina.

Pinto e Uga (2011) referem sobre cálculos que mostram que para o ano de 2015 o tabaco será responsável por 10% das mortes mundiais e estimativas apontam para o ano de 2030 mais de oito milhões de óbitos, dos quais 83% acontecerão em países em desenvolvimento.

De acordo com Levy et al. (2012), as ações para o controle do tabagismo no Brasil é responsável por 420 mil vidas salvas, e se o país não tivesse adotado nenhuma das ações a prevalência atual de fumantes seria de 31%, mas um dado estatístico mostrou que em 2010 a proporção de fumantes no país foi de 16,8%, sendo 17,9% dos homens e 12,7% das mulheres, e se essas ações implementadas forem ainda intensificadas a perspectiva é que o país chegue em 2050 com índice de aproximadamente 6% da população fumante e 8,3 milhões de mortes evitadas.

2.2 COMPOSIÇÃO DO CIGARRO E SEUS MALEFÍCIOS

O cigarro é constituído por mais de 4.700 tipos de substâncias tóxicas, dentre elas o formaldeído, cetonas, monóxido de carbono e amônia (CHAVES; OYAMA, 2008). Outras são advindas da adição de pesticidas, componentes orgânicos e

metálicos, além daquelas consideradas cancerígenas como níquel, chumbo, polônio e o alcatrão que é uma das substâncias com maior poder carcinogênico responsável por uma elevada ocorrência de cânceres de pulmão, boca, laringe, esôfago entre outros (DUARTE et al., 2006).

Segundo Tamashiro et al. (2009), a queima do cigarro gera uma fumaça com mais de 4000 substâncias nocivas, incluindo, desde gasosa a pequenas partículas, a exemplos acroleína, cotinina, acetaldeído, fenol, cianeto de potássio, nicotina e seus derivados, substâncias essas que promovem mudanças na produção de muco e alterações sobre a estrutura do epitélio do trato respiratório.

Segundo Hortense et al. (2008), dentre as substâncias do cigarro, a nicotina é a grande responsável pela dependência química ao fumo. Diz ainda Chaves e Oyama (2008) que a ação de dependência e tolerância está relacionada às vias dopaminérgicas centrais, que conferem sensações de prazer e recompensa, e ainda atua como incitante do sistema nervoso central, intensificando o estado de alerta e diminuindo o apetite.

De acordo com Szklo et al. (2011), existem muitas doenças tabaco - relacionadas como vários tipos de carcinomas, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença cardiovascular.

No Brasil aproximadamente 14 mil casos novos que surgem de câncer de cabeça e pescoço são atribuídos principalmente ao fumo e ao álcool. Em 2007, considerando tabagismo como principal fator de risco, as doenças cardiovasculares e o câncer ficaram entre primeira e segunda causas de mortes no país respectivamente, a incidência de câncer bucal no Brasil é um dos mais elevados do mundo (BRASILa, 2012).

O tabaco é um fator de risco já bem determinado no surgimento dos cânceres de cabeça e pescoço. As regiões aerodigestivas superior acometidas pelas proeminências malignas são cavidade oral, faringe e laringe. O câncer bucal afeta a mucosa de lábios, base da língua, assoalho bucal e palato duro. Estudos epidemiológicos revelam que a ocorrência de cânceres de cabeça e pescoço tem tendência a aumentar com idade, pois na Europa em 98% dos casos os pacientes apresentam idade superior a 40 anos (ALVARENGA et al., 2008).

Na cavidade oral o tipo de câncer mais comum em 90% dos casos é o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), popularmente conhecido como Carcinoma Epidermóide ou Espinocelular (VENTURI et al., 2004).

Segundo Kern (2006) a ocorrência de CCEO acontece com maior frequência porque o tecido que constitui a boca apresenta maior abertura a ação dos agentes genotóxicos.

Hoshi (2009), retrata sobre o epitélio da cavidade oral como sendo um tecido pavimentoso estratificado não queratinizado, ou seja, ausente de queratinização, o que implica numa maior permeabilidade, aumentando a capacidade de absorção destas células que formam o tecido, e cita como exemplo a mucosa jugal e bordo lateral da língua como regiões com predisposição ao desenvolvimento de lesões malignas.

Carvalho et al. (2002) descreve que dados epidemiológicos demonstram que o vício do fumo e o abuso no consumo de álcool, sendo estas substâncias consideradas genotóxicas, estão associadas ao surgimento de carcinomas orais bem como no aumento da presença de micronúcleos na mucosa das vias aerodigestivas superior.

2.3 MUTAGENICIDADE E TESTE DE MICRONÚCLEO

As mutações dos organismos vivos podem ser induzidas por diversos agentes como fumo, álcool, aditivos alimentares, higienização bucal precária, traumas mecânicos provocados por próteses e aparelhos ortodônticos mal adaptados, pesticidas, radiação e a exposição ocupacional em ambientes que tem elevada inserção de substâncias tóxicas, sendo muitos desses descritos como fonte de risco para o desencadeamento de lesões malignas na cavidade oral (MIRANDA, 2006).

Reis et al. (2002), descreve em seu estudo que o álcool provoca doenças no trato gastrointestinal, alterações vasculares, perturbação no sistema nervoso central e devido a sua ação tóxica tem a capacidade de aumentar a permeabilidade dos tecidos favorecendo a entrada de substâncias carcinógenas, assim o álcool tem sido considerado um agente potencializador que atua de forma sinérgica com os componentes do cigarro no aparecimento de câncer bucal.

Wells et al. (1997), relata que indivíduos que ingerem constantemente bebidas alcoólicas constituem um grupo de alto risco para o desenvolvimento de lesões malignas quando comparados aos indivíduos abstêmios de álcool, isso é

consequente da interação dos metabólitos do álcool com substâncias presentes no cigarro.

Naganuma et al. (2008), relata em seu estudo que o café não tem sido associado a nenhum tipo de lesão maligna, ao contrário, o café auxilia na proteção contra o câncer na cavidade oral, faringe e esôfago devido a atividade de alguns componentes considerados anticarcinogênicos.

Das desordens celulares provocadas por muitos agentes agressores, a cromossômica é bem descrita, as quais dão origem aos MN, que são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros resultantes de mitoses aberrantes. Esses MN (Figura 1), não migram para os pólos durante a anáfase e devido a isso não são incorporados no núcleo das células durante o processo de divisão celular, resultando na formação de um ou mais MN que permanecem próximos ao núcleo celular no citoplasma das células-filhas, podendo ser detectado em análise de microscópio óptico (MILLER, 1973; BOHRER, 2003; KERN, 2006; MENEGUETTI et al., 2012).

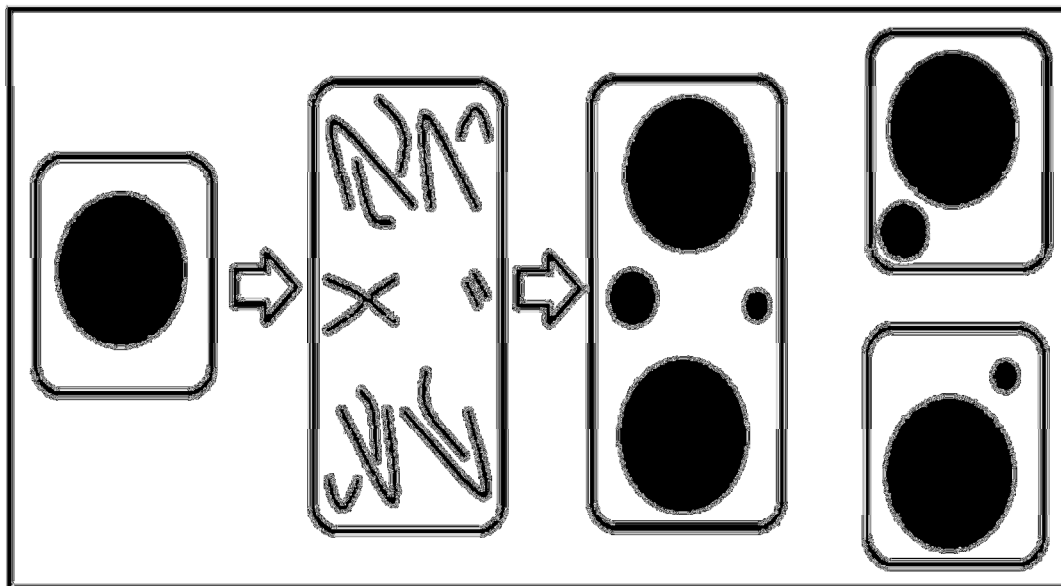


Figura 1 - Formação de micronúcleo

Fonte: Fão et al. (2012)

Kern (2006) descreve que a história do MN tem sido relatada há mais de um século, quando foram identificados por Howell e Jolly, que denominaram respectivamente como “fragmentos de material nuclear” e “corpúsculos intraglobulares”, em consequência disto, nos dias de hoje, os hematologistas utilizam a nomenclatura “Corpúsculos de Howell-Jolly” para indicar o surgimento de

MN em células sanguíneas, e ainda cita o clássico método de Análise de Células Metafásicas, o qual tem seu emprego restrito por necessitar de manipuladores com alta capacitação e requerer amostras que contenham elevadas quantidades de metástases para tornar os resultados confiáveis e, como método alternativo apresenta o teste de MN, sendo este muito eficaz na identificação de alterações do DNA em diversos tecidos induzidos por diferentes fatores.

Dietz et al. (2000), refere-se à utilização do teste de MN para medir dano citogenético induzido por irradiações em raiz de cebola. Desde a década de 1970 o teste de MN foi viável e efetivo, concretizando-o como marcador de danos citogenéticos em medula óssea, eritrócitos e linfócitos de sangue periférico e em células epiteliais esfoliadas.

Fenech et al. (1999), descreve sobre o teste de MN em linfócitos com a utilização da Citocalacina B, droga esta que marca a divisão celular e permite detectar danos em tecidos sistêmicos submetidos à exposição de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, e relata sobre o teste de MN em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral, bexiga e cavidade nasal devido a facilidade de efetuar a coleta dessas células e por apresentar grande potencial para o monitoramento de pessoas expostas a agentes genotóxicos.

Para identificar os efeitos mutagênicos na mucosa oral induzidas por agentes agressores é realizado o teste de MN através do método citopatológico bucal, por ser um exame que se fundamenta na visualização microscópica de células individualizadas, no caso da mucosa oral, as células epiteliais esfoliadas. Para realizar a remoção dessas células utiliza-se uma escova citológica, pois este instrumento é o mais recomendado para fazer a fricção quando comparado a outros métodos como cotonete e espátula de madeira, porque tem a capacidade de remover maior quantidade de células (BOHRER, 2003).

De acordo com Carrard et al. (2007), a constatação de MN em células epiteliais esfoliadas deve ser considerada resultante das ações de agentes genotóxicos ou reparo celular diante de erros instintivos que ocorreram durante a duplicação do DNA.

Segundo Hoshi (2003), a identificação de MN nas células epiteliais retrata o que ocorreu na camada de células basais, uma vez que esta camada tem o processo de divisão celular elevada e, quando ocorrer danos durante o processo

mitótico tem o surgimento dos MN que podem ser evidenciados quando as mesmas migram para a camada superficial da mucosa.

Tolbert et al. (1992), afirma que o revestimento da cavidade oral está continuamente exposto a agentes genotóxicos e relaciona a formação de MN como a resposta do organismo diante de uma determinada agressão.

Estudo realizado por Stich et al. (1982), constata as diversas formas de agressão celular e conclui que se houver uma agressão de baixa intensidade, a célula tem a capacidade de reparar o dano provocado em seu material genético e assim não transmiti-lo durante os processos de divisão celular. Por outro lado, na agressão de intensidade moderada, os danos que não fossem reparados pela própria célula seriam suprimidos por meio de mecanismos de morte celular. Já em casos onde a agressão é mais intensa, a célula não teria possibilidade de reparar o dano causado e como consequência teria a persistência do dano ao material genético e, conseqüentemente, maior produção de MN.

Existe um grande interesse em investigar questões ambientais, genéticas e mudança no estilo de vida em relação à imutabilidade genômica, diante disto a utilização do teste do MN tem sido bem descrito nas literaturas, por permitir uma visualização precisa das mutações ocorridas em células expostas a agentes agressores (FENECH et al., 1999).

Frente a outros testes, é um método de baixo custo, rápido, indolor e não-invasivo, e tem seu uso relacionado ao controle e precaução em indivíduos sob o risco oncogênico, expostos a substâncias genotóxicas, como exemplo o cigarro (CARVALHO et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito mutagênico em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não-fumantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Relacionar a frequência de micronúcleos ao tempo de tabagismo;
- ✓ Identificar a redução de danos mutagênicos provocados pelo cigarro no grupo de ex-fumantes;
- ✓ Averiguar o aumento da frequência de micronúcleos em relação à variante da idade dos participantes;
- ✓ Correlacionar a frequência de micronúcleos com o consumo de bebidas alcoólicas.

4 METODOLOGIA

Todas as análises desta pesquisa foram realizadas nos laboratórios de Farmacognosia e Microscopia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA) na cidade de Ariquemes/RO.

O presente trabalho foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA – Manaus, sob o número de protocolo (021/2011).

4.1 GRUPO DE ESTUDO

O presente estudo contou com a participação de 40 pessoas de ambos os sexos e com idades variáveis para a formação dos grupos, que se disponibilizaram de forma voluntária e aderiram ao mesmo após o esclarecimento sobre a pesquisa, das responsabilidades e direitos, e formalizaram com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice-A).

Os grupos foram divididos em: não-fumantes (controle negativo), fumantes > 10 anos, fumantes < 10 anos e ex-fumantes. Os grupos foram compostos por 10 pessoas cada após preenchimento de um questionário onde esclareceram seus hábitos (Apêndice-B).

Os critérios de inclusão deste estudo estiveram limitados apenas que os fumantes e ex-fumantes não apresentassem lesão na cavidade oral clinicamente visível e que tivessem o hábito de fumar no mínimo uma (01) carteira de cigarro industrializado por dia, ou seja, 20 cigarros, sendo estes associados ou não ao consumo de bebidas alcoólicas. Essa limitação se deu devido ao estudo realizado por Stich e Rosin (1983), onde descreveram que a frequência de MN só é possível de ser detectado em indivíduos que fumam no mínimo 20 cigarros/dia e que ingerem no mínimo 150 mL/dia de bebidas alcoólicas.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Realizou-se enxágue bucal com água destilada (em três repetições) para remover restos de saliva e mucosas de superfície. Em seguida realizou-se a esfoliação na mucosa jugal (bochechas) de ambos os lados para maximizar a amostra celular e eliminar qualquer viés desconhecidos que pudessem ser causados por amostragem em apenas uma face.

A esfoliação foi realizada com a utilização de uma escova de amostragem descartável, semelhante à utilizada para o exame de Papanicolau. Realizou-se 10 rotações da escova em movimentos circulares contra a parede interior das bochechas, iniciando no centro e aumentando gradativamente a circunferência, produzindo um efeito de espiral para aumentar a amostragem de uma área maior e evitar a erosão contínua em uma única região.

4.3 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Após a esfoliação, a cabeça da escova foi introduzida em um recipiente (tubo de ensaio) com 04 mL de solução tampão contendo: 0,01 M Tris Hidroclorato (tris-HCl), 0,1 M Ácido etilodiaminotetracético (EDTA) e 0,02 M Cloreto de sódio (NaCl) com pH 6,8, girando de modo que as células ficassem desalojadas e liberadas na borda interna do recipiente. Em seguida o recipiente foi devidamente identificado com o número do registro do paciente e vedado firmemente a fim de evitar o extravasamento de células durante o transporte para o laboratório.

4.4 PREPARO DAS LÂMINAS

No laboratório, os tubos de ensaio foram homogeneizados no vórtex. Depois retirou-se as escovas dos tubos de ensaio que posteriormente foram centrifugados a 1.000 rpm por 10 minutos. Em seguida retirou-se o sobrenadante descartando-o e deixando apenas o pellet branco (Figura 2) e adicionou-se 04 mL da solução tampão para nova lavagem das células, o que favoreceu a remoção de bactérias. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens.

Em seguida, acrescentou-se 2 mL de triarilmetano a 0,1% e 2 mL de xantenos a 0,1% (solução fixadora), sendo a solução novamente homogeneizada em vórtex e centrifugada a 1.000 rpm por 10 minutos, novamente descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet branco, acrescentando-se o triplo da quantidade do pellet de solução, 50% triarilmetano a 0,1% e 50% xantenos a 0,1%, sendo novamente homogeneizados.



Figura 2 - Formação de pellet branco após centrifugação da amostra

Fonte: Adriana Martins de Souza

Na sequência o produto resultante dessa homogeneização foi retirado com auxílio de uma pipeta de Paster e gotejado três vezes sobre a lâmina (identificada com número do registro do paciente) de forma que os pingos ficaram separados. Sem realizar esfregaço a solução foi apenas escorrida sobre a lâmina com movimentos giratórios e colocou-se para secar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

Após a secagem as lâminas foram coradas com triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%; mergulhou-se as lâminas 10 vezes em cada recipiente com submersão de 1 segundo de duração na sequência acima descrita. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corantes e secas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos para futura contagem das células.

4.5 CONTAGEM DAS CÉLULAS

A contagem das células foi realizada por um observador cego, utilizando um microscópio óptico. Em cada lâmina foram contadas um total de 1000 células bem delimitadas entre si, sendo as mesmas observadas em objetiva de 10X e oculares de 40X.

As células que continham MN foram confirmadas com base em alguns requisitos segundo Bohrer (2003), onde o tamanho do MN tem em média 1/5 do tamanho do núcleo principal; estar inserido no mesmo citoplasma do núcleo principal, tendo uma coloração de intensidade igual ou mais fraca que o núcleo e forma redonda, podendo conter um MN por célula (Figura 3-A), ou mais (Figura 3-B).

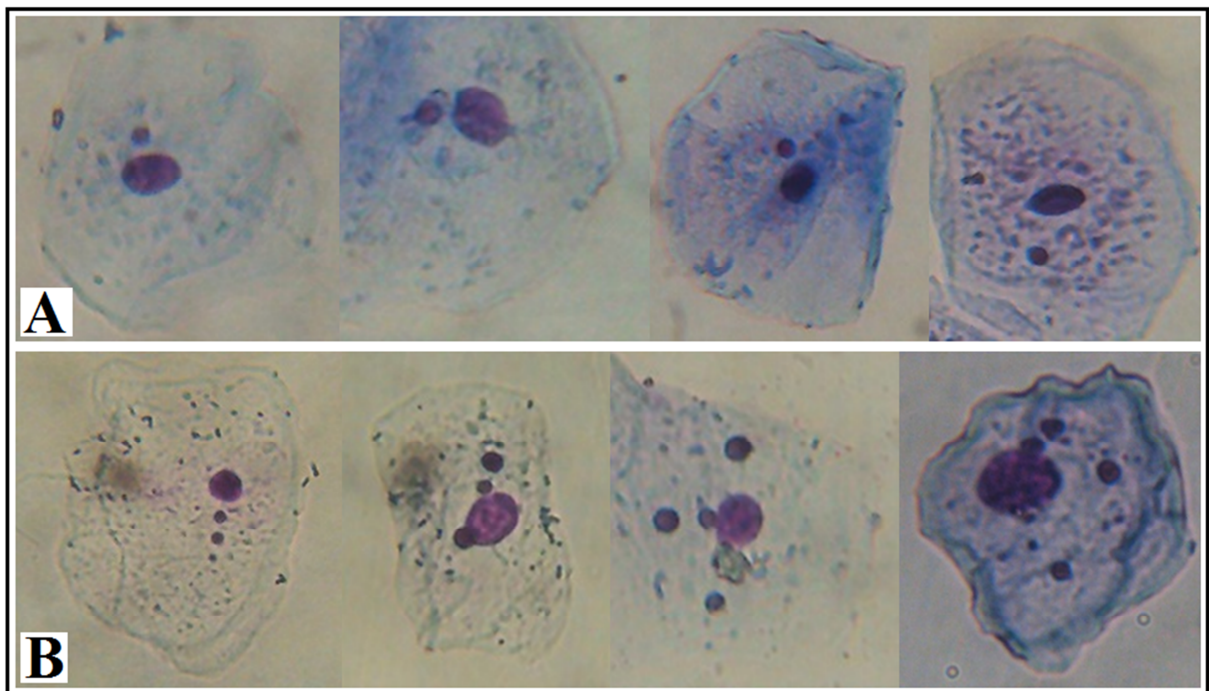


Figura 3 – A: Células contendo um micronúcleo; B: Células contendo mais de um micronúcleo.

Fonte: Adriana Martins de Souza

Os procedimentos realizados nesta pesquisa seguiu o padrão descrito por Meneguetti et al. (2012).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o software Graphad Prism 5.0, onde se realizou o teste de variância (Anova), sendo significativo para *($p < 0,1$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Também foi realizado o Teste Tukey, a média e o desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de MN a cada 1.000 células da mucosa jugal da cavidade oral das pessoas amostradas podem ser observadas na (Tabela 1). Os resultados aqui descritos são referentes à quantidade de células com MN em seu interior e não a quantidade de MN por célula.

Tabela 1. Frequência de micronúcleos na mucosa jugal da cavidade oral				
	Não-Fumantes	Fumantes <10 anos	Fumantes >10 anos	Ex-Fumantes
V1	1	5	13	59
	1	8	14	29
V2	8	9	20	19
	9	4	21	21
V3	1	20	8	22
	0	27	8	25
V4	3	17	10	14
	1	19	14	13
V5	14	5	33	19
	11	4	31	15
V6	2	10	8	12
	1	6	9	32
V7	11	9	9	33
	7	7	2	22
V8	9	11	5	9
	8	9	11	11
V9	8	4	11	13
	6	6	14	9
V10	1	8	27	18
	1	7	30	12
Total	103	195	298	407
Média	5,1	9,7	14,9	20,3

Fonte: Adriana Martins de Souza

Observando os dados da tabela acima nota-se que o maior número e média de micronúcleos foi no grupo de ex-fumantes (407/20,3), seguido dos fumantes > 10 anos (298/14,9), fumantes < 10 anos (195/9,7) e o grupo controle negativo formado por não-fumantes (103/5,1).

Quando comparados os grupos em estudo, pode-se observar que os resultados do grupo de fumantes < 10 anos não apresenta significância estatística em relação ao grupo controle ($p > 0,05$), diferentemente dos grupos fumantes > 10 anos e ex-fumantes, que apresentaram respectivamente a significância de ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), conforme pode ser observado na (Figura 4).

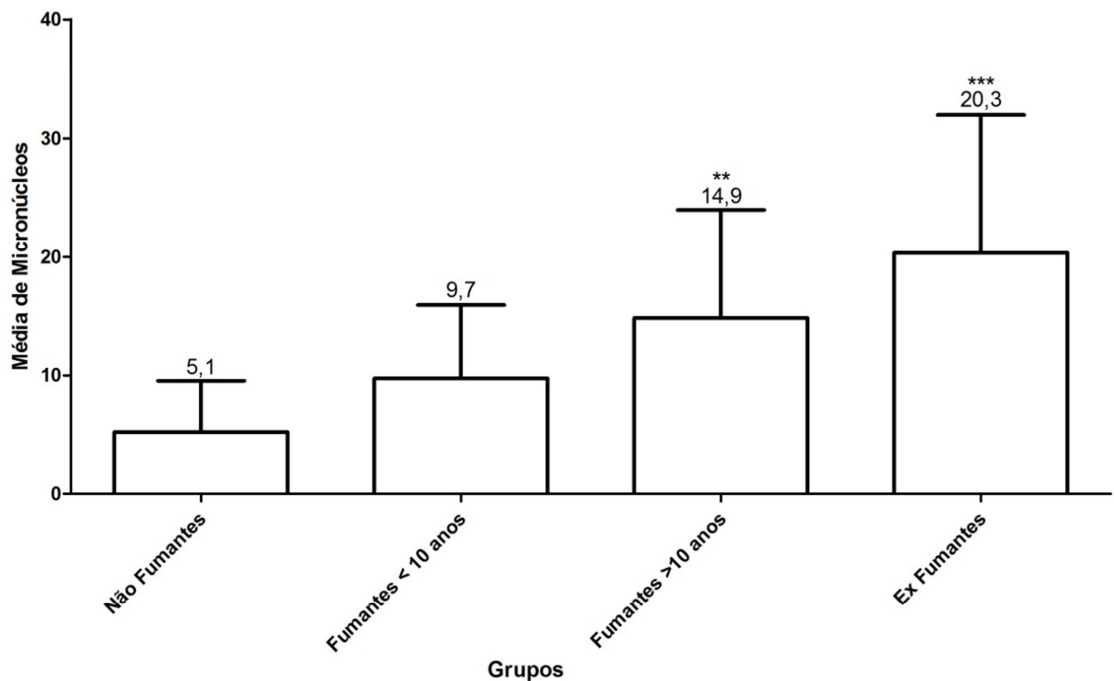


Figura 4. Média de micronúcleos encontrados em 1000 células de mucosa jugal, em diferentes grupos. Significativo para ** ($p < 0,01$). *** ($p < 0,001$)

O resultado obtido neste estudo esteve em conformidade com o estudo realizado por Naderi et al. (2012) onde o número médio de MN encontrado em células da mucosa oral foi maior no grupo de fumantes > 10 anos em comparação com o grupo de estudo de fumantes < 10 anos e não-fumantes.

No grupo de fumantes > 10 anos a média de dependência dos indivíduos foi de 25 anos e consumo de 1 carteira/dia e no grupo de ex-fumantes foi de 23 anos e 1 ½ carteira/dia. Estes dois grupos apresentaram significância entre a frequência de MN, estando em concordância com estudo realizado por Ozkul et al. (1997) que encontrou significância sobre a indução de MN em relação ao tempo de uso/exposição ao tabaco.

A média de idade dos participantes por grupo e sua relação com o aumento na frequência de MN podem ser observados nas figuras 5 e 6.

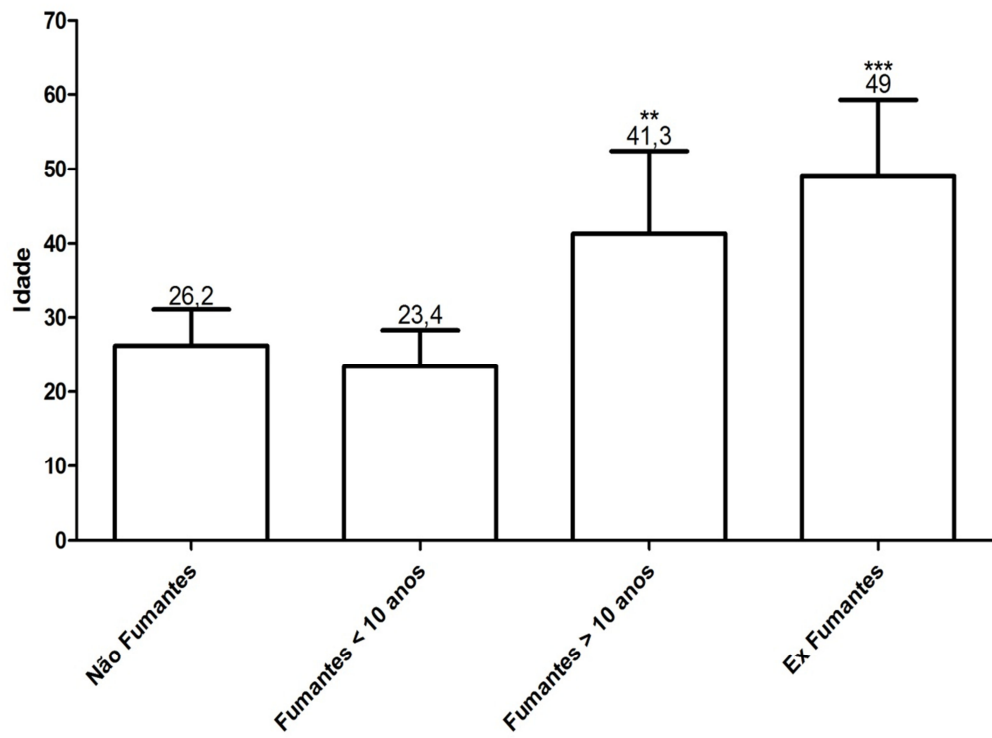


Figura 5. Análise descritiva da média de idade dos participantes dos grupos de estudo

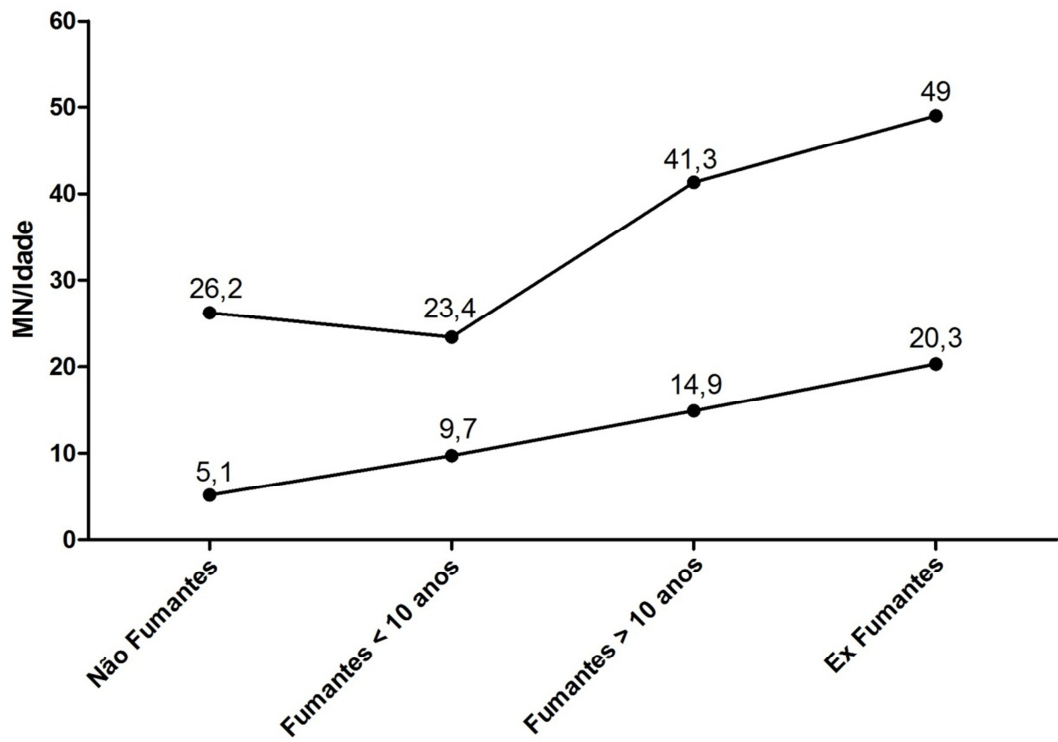


Figura 6. Análise descritiva da média de micronúcleos versus média de idade dos participantes

Esta análise revelou um resultado significativo em relação à frequência de MN e o aumento da idade dos participantes, estando este em concordância com estudo realizado por Ozkul et al. (1997), o qual obteve resultados com significância em relação ao aumento da idade dos participantes e a indução na frequência de MN.

Outro estudo realizado por Gattás et al. (2001) sobre a frequência de MN na mucosa oral de operadores de postos de gasolina também mostrou significância na ocorrência de MN em relação a variável idade, sendo este resultado esperado, uma vez que a mutagenicidade pode aumentar com a idade.

Nos grupos de estudo observou-se também o consumo de bebidas alcoólicas, onde no grupo não-fumantes apenas 30% dos participantes bebem em média de 11,5 anos, no grupo de fumantes < 10 anos 100% dos participantes bebem em média de 7 anos, no grupo de fumantes > 10 anos 90% dos participantes bebem em média de 21,7 anos e no grupo de ex-fumantes 80% dos participantes bebem em média de 21,5 anos. Diante disto, os resultados obtidos nos grupos que apresentaram significância estão em concordância com o estudo realizado por Stich e Rosin (1983) que encontraram aumento na frequência de MN na mucosa oral de indivíduos expostos de forma associada ao tabaco e álcool.

Outra dependência variável relacionada a esses grupos foi o consumo de café, em que o grupo não-fumantes, fumantes < 10 anos, fumantes > 10 anos e ex-fumantes (90%, 40%, 80% e 90%) respectivamente ingerem a bebida diariamente, porém um estudo realizado por Naganuma et al. (2008) relata que o consumo de café não se associa a nenhum tipo de genotoxicidade da cavidade oral e outras partes do tubo digestivo.

CONCLUSÃO

Constatou-se que fumantes > 10 anos tem um aumento significativo da frequência de MN, em relação aos grupos de fumantes < 10 anos e não-fumantes, sendo que esses danos permanecem no grupo de ex-fumantes, não havendo uma redução dos danos provocados pelo tabagismo e sim uma persistência. É importante ressaltar que os grupos de fumantes > 10 anos e ex-fumantes são formados por pessoas com média de idade superior aos grupos de fumantes < 10 anos e não-fumantes, o que pode ter ocorrido como co-fator dos resultados obtidos, o mesmo também foi observado com o consumo de álcool, sendo assim serão necessários estudos adicionais utilizando as variáveis (tabagismo, idade, alcoolismo) de uma maneira isolada para uma melhor compreensão dos resultados.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. N. S.; SOUZA, C. F.; CAIAFFA, W. T. Tabagismo entre adolescentes e adultos jovens de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: influência do entorno familiar e grupo social. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 935 - 943, maio 2011. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2011000500011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 19 Set. 2012.

ALVARENGA, L. M. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Brazilian Journal Otorhinolaryngology**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 68 - 73, jan./feb. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rboto/v74n1/en_a11v74n1.pdf>. Acesso em 10 set. 2012.

ARORA, M. et al. Tobacco use in Bollywood movies, tobacco promotional activities and their association with tobacco use among Indian adolescents. **Tobacco Control**, [S.l.], v. 21, n. 5, p. 482 - 487, jul. 2011. Disponível em: <<http://tobaccocontrol.bmj.com/content/early/2011/07/05/tc.2011.043539.full.pdf+html>>. Acesso em 15 set. 2012.

BALBANI, A. P. S.; MONTOVANI, J. C. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 820 - 826, nov./dec. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003472992005000600021&script=sci_arttext> Acesso em 18 set. 2012.

BALBANI, A. P. S.; MONTOVANI, J. C.; CARVALHO, L. R. Smoking, smoking cessation and otorhinolaryngologists in the state of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 96 - 103, jan./feb. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992006000100015&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em 18 set. 2012.

BOHRER, P. L. **Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos**. (Dissertação) - Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3269/000384819.pdf?sequence=1>>. Acesso em 10 nov. 2012.

BRASILa. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 13 nov. 2012.

BRASILb. Instituto Nacional do Câncer. **Tabagismo: Dados e Números, tabagismo no mundo, tabagismo no Brasil**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=dadosnum&link=mundo.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

CARRARD, V. C. et al. Teste dos Micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77 – 81, jan./dez. 2007. Disponível em: <<http://seer.ufrgs.br/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/7512/4795>>. Acesso em 18 nov. 2012.

CARVALHO, M. B. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 317 - 322, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010442302002000400037&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 Ago. 2012.

CHAVES, E. C.; OYAMA, S. M. R. Aconselhamento telefônico para cessação do tabagismo. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre, v. 29, n. 4, p. 513 - 519, dez. 2008. Disponível em: <<http://seer.ufrgs.br/RevistaGauchadeEnfermagem/article/view/7611/4675>>. Acesso em 01 set. 2012.

CONSUEGRA, R. V. G.; ZAGO, M. M. F. Creencias en fumadores pertenecientes a un programa de salud cardiovascular. **Revista Latino -Americana de Enfermagem**, [S.I.], v. 12, [s.n.], p. 412 - 419, mar./apr. 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010411692004000700017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 out. 2012.

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 207 - 211, set. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010442302000000300004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Aug. 2012.

DUARTE, J. L. et al. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 210 - 216, mar./apr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-72992006000200010&script=sci_arttext&lng=en>. Acesso em 30 ago. 2012.

FÃO, F. et al. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Sabios - Revista de Saúde e Biologia**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 91 - 98, jan./abr. 2012. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1137/414>>. Acesso em 20 set. 2012.

FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project – an internacional collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, [S.I.], v. 428, n. 1 - 2, p. 271 - 283, jan. 1999. Disponível em:

<http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/_documents/mutationresearch_428_1999.pdf>. Acesso em 10 set. 2012.

FIGUEIREDO, D. C. et al. Análise perceptivo-auditiva, acústica computadorizada e laringológica da voz de adultos jovens fumantes e não-fumantes. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 791 - 799, set./out. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992003000600011>. Acesso em 20 ago. 2012.

GATTÁS, G. J. F. et al. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. **Occupational Medicine**, Great Britain, v. 51, n. 2, p. 107 - 113, mar. 2001. Disponível em: <<http://occmed.oxfordjournals.org/content/51/2/107.full.pdf>>. Acesso em 10 mar. 2013.

HORTENSE, F. T. P.; CARMAGNANI, M. I. S.; BRETAS, A. C. P. O significado do tabagismo no contexto do câncer de laringe. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 1, p. 24 - 30, jan./fev. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/reben/v61n1/04.pdf>>. Acesso em 10 nov. 2012.

HOSHI, L. **Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral**. (Dissertação). Rio de Janeiro - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz; 2009. Disponível em: <http://bvssp.iciet.fiocruz.br/pdf/25543_hoshlm.pdf>. Acesso em 5 nov. 2012.

IGLESIAS, R. et al. Documento de discussão - saúde, nutrição e população (HNP) Controle do tabagismo no Brasil: resumo executivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 301 - 304, out./dez. 2008. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S16794974200800040007&lng=pt>. Acesso em: 20 out. 2012.

KERN, R. **Avaliação de micronúcleo em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia**. (Dissertação) Ponta Grossa - Master of Dentistry – State University, 2006. Disponível em: <<http://www.uepg.br/mestrados/mestreodonto/dissertacoes/0028.pdf>>. Acesso em 15 out. 2012.

LEVY, D.; ALMEIDA, L. M.; SZKLO, A. The Brazil SimSmoke Policy Simulation Model: The Effect of Strong Tobacco Control Policies on Smoking Prevalence and Smoking-Attributable Deaths in a Middle Income Nation. **Plos Medicine**, [S.l.], v. 9, n. 11, p. 1 - 12, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1001336>>. Acesso em 20 nov. 2012.

LOURENCO, J. A. et al. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [Tabebuia impetiginosa (Mart. ex DC.) Standl.].

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 414 - 420, dez. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000400003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Ago. 2012.

MALTA, D. C. et al. Prevalence of smoking among adults residing in the Federal District of Brasília and in the state capitals of Brazil, 2008. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 75 - 83, jan./feb. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132010000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em 25 out. 2012.

MENEGUETTI, D. U. O. et al. New method for detection of mutagenicity in oral mucosa the through of micronucleus test. **HOAJ Biology**, [S.l.], v. 1, [s.n.], p. 1 - 4, aug. 2012. Disponível em: <<http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-0874-1-8.pdf>>. Acesso em 15 ago. 2012.

MILLER, R. C. The micronucleus test as an in vivo cytogenetic method. **Environmental Health Perspectives**, [S.l.], v. 6, [s.n.], p. 167 - 170, dec. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475553/pdf/envhper005030168.pdf>>. Acesso em 20 nov. 2012.

MIRANDA, M. A. S. P. **Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal**. (Dissertação) Fortaleza – Universidade Federal do Ceará: Departamento de Patologia e Medicina Legal, 2006. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1882/1/2006_dis_maspmiranda.pdf>. Acesso em 17 out. 2012.

NADERI, N. J.; FARHADI, S.; SARSHAR, S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. **Indian Journal Pathology & Microbiology**, [S.l.], v. 55, n. 4, p. 433 - 438, oct. 2012. Disponível em: <<http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377-4929;year=2012;volume=55;issue=4;spage=433;epage=438;aulast=Naderi>>. Acesso em 15 mar. 2013.

NAGANUMA, T. et al. Coffe consumption and the risk of oral, pharyngeal, and esophageal cancers in Japan. **American Journal of Epidemiology**, [S.l.], v. 168, n. 12, p. 1425 - 1432, oct. 2008. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/585677_2>. Acesso em 20 mar. 2013.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 5, out. 2006. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n5/a10v42n5.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2012.

OLIVEIRA, R. M.; FUREGATO, A. R. F. Esquizofrenia y dependencia del tabaco: una revisión integradora. **Enfermería Global**, Murcia, v. 11, n. 25, p. 381 - 403, enero 2012. Disponível em:

<http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169561412012000100023&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 18 set. 2012.

OZKUL, Y. et al. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. **Mutagenesis**, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 285 - 287, mar. 1997. Disponível em: <<http://mutage.oxfordjournals.org/content/12/4/285.full.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2013.

PINTO, M.; UGA, M. A. D. Cost of treating patients with smoking history in a specialized cancer hospital. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 575 - 582, jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v45n3/en_2061.pdf>. Acesso em 12 nov. 2012.

PRIMO, M. S. et al. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de um biopolímero extraído do microorganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 340 - 347, jun./jul. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2010000300009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Ago. 2012.

REIS, S. R. A. et al. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 221 - 225, jul./set. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-74912002000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 Ago. 2012.

STICH, H. F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 553 - 559, nov. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6759419>>. Acesso em 25 nov. 2012.

STICK, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 305 - 308, mar. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826255>>. Acesso em 20 ago. 2012.

SZKLO, A. S. et al. Perfil de consumo de outros produtos de tabaco fumado entre estudantes de três cidades brasileiras: há motivo de preocupação? **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 11, p. 2271 - 2275, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v27n11/20.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

TAMASHIRO, E. et al. Effects of cigarette smoking on the respiratory epithelium and its role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. **Brazilian Journal Otorhinolaryngology**, [S.l.], v. 75, n. 6, p. 903 - 907, nov./dec. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjorl/v75n6/v75n6a22.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2012.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, [S.l.],

v. 271, n. 1, p. 69 - 77, feb.1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371831>>. Acesso em 15 nov. 2012.

VALE, N. B. A Farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 52, n. 3, p. 368 - 380, maio/jun. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942002000300013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 5 out. 2012.

VENTURI, B. R. M.; CABRAL, M. G.; LOURENCO, S. Q. C. Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 385 - 392, maio/jun. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992004000300015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 18 nov. 2012.

WELLS, P. G. et al. Oxidative damage in chemical teratogenesis. **Mutation Research**, [S.l.], v. 396, n. 1-2, p. 65 - 78, dec. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9434860>>. Acesso em 20 nov. 2012.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento formal de participação no estudo intitulado: **ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO EM CÉLULAS EPITELIAIS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE FUMANTES, EX-FUMANTES E NÃO-FUMANTES.**

Orientador: Prof. Ms Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

Acadêmica: Adriana Martins de Souza

Eu, _____, do sexo _____, portador(a) do RG _____, residente à _____, nº _____, bairro _____, nesta cidade de _____ - _____, declaro que tenho _____ anos de idade e que concordo em participar, voluntariamente, na pesquisa conduzida pela aluna responsável e por seu respectivo orientador acima citados.

Objetivo do Estudo:

Analisar o efeito mutagênico em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não-fumantes.

Explicação do Procedimento:

Durante o experimento, recebi todas as informações necessárias a minha aprovação para participação das condutas de coletas de dados específicos. Fico comprometido a participar da intervenção e avisarei com antecedência no caso da necessidade de me ausentar ou abandonar a pesquisa. Também estou ciente que não serei submetido a nenhum tipo de tratamento sem estar ciente ou sem meu consentimento, e posso me desligar desta pesquisa a qualquer momento, porém, me comprometendo a comunicar o responsável por esta pesquisa.

Desconforto e Riscos:

Fui informado (a) que este experimento não trará nenhum tipo de desconforto ou risco à minha saúde e que o procedimento da coleta das células epiteliais da mucosa jugal (bochecha) é um procedimento indolor, não invasivo e rápido, que

após um enxágue da boca com água destilada é realizado com uma leve fricção com uma escova de cerdas macias apropriada.

Seguro Saúde ou de Vida:

Eu entendo que não existe nenhum tipo de seguro saúde ou de vida que possa vir a me beneficiar em função de minha participação neste estudo.

Liberdade de Participação:

A minha participação neste estudo é voluntária. É meu direito interromper minha participação a qualquer momento sem que isso incorra em qualquer penalidade ou prejuízo à minha pessoa. Também entendo que o pesquisador tem o direito de me excluir deste experimento no caso de eu não me enquadrar nos critérios de inclusão da pesquisa.

Sigilo de Identidade:

As informações obtidas nesta pesquisa não serão de maneira alguma associadas à minha identidade e não poderão ser consultadas por pessoas leigas sem minha autorização oficial. Estas informações poderão ser utilizadas para fins estatísticos ou científicos, desde que fiquem resguardados a minha total privacidade e meu anonimato.

O responsável pelo estudo me explicou todos os riscos envolvidos, a necessidade da pesquisa e se prontificou a responder todas as minhas questões sobre o experimento. Eu aceitei participar deste estudo de livre e espontânea vontade.

Data: ____ / ____ / ____

Nome por extenso

Assinatura do Voluntário

_____ RG: _____

*Responsável

RG: _____

*Testemunha

*ASSINATURA DO RESPONSÁVEL SÓ SERÁ NECESSÁRIA CASO O VOLUNTÁRIO SEJA MENOR DE 18 ANOS.

*ASSINATURA DA TESTEMUNHA SÓ SERÁ NECESSÁRIA CASO O VOLUNTÁRIO NÃO TENHA NENHUM GRAU DE INSTRUÇÃO (ANALFABETO).

Acadêmica: Adriana Martins de Souza

RG: 807.263 SSP/RO

Telefone de contato: (069) – 8424-9311

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA –
Manaus

APÊNDICE B – Questionário de Hábitos

Data: ___/___/___

Nome: _____

Data de Nasc.: ___/___/___

Gênero: () M () F

Cidade: _____ UF _____

Endereço: _____

Bairro _____ Nº _____

Telefone: _____

Grau de Instrução: _____

Idade: () 15-24 () 25-34 () 35-44 () 45 +

Fuma? () sim () não Tempo: () + de 10 anos () – de 10 anos

Já fumou? () sim () não Tempo: () + de 10 anos () – de 10 anos

Início do tabagismo: _____ anos Término do tabagismo: _____ anos

Abstinência: _____ anos

Tipo do tabaco/fumo: _____

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

Intensidade – (1) 1 carteira por dia; (2) 1 ½ carteira por dia; (3) 2 carteiras por dia; (4) 3 carteiras ou mais por dia.

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

Início do consumo: _____ anos Término do consumo: _____ anos Abstinência: _____ anos.

Tipo de bebida: _____

Intensidade de consumo : () 1 () 2 () 3 () 4

Intensidade - (1) para cada dose de destilado ou para cada cerveja ou para cada ½ garrafa de vinho por dia, mas não todos os dias e ainda para quem bebe somente

aos finais de semana; (2) para quem bebe moderadamente durante a semana e fins de semana; (3) para quem bebe moderadamente intercalado com o aumento do consumo, ex: fins de semana; (4) para quem tem alto consumo todos os dias.

Toma café: () sim () não

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

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

Hábito do consumo de chá ou mate () sim Frequência: _____

Possui alguma lesão na cavidade bucal? () sim () não Qual? _____

Faz uso de outras substâncias ilícitas? () sim () não

Acadêmica

Assinatura do voluntário



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE MANAUS

COMUNIDADE EVANGÉLICA LUTERANA "SÃO PAULO"

CREENCIADO PELO DECRETO DE 26/03/2001 - D.O.U. DE 27/03/2001

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo nº 021/2011 – CEP – ULBRA – MANAUS – Projeto de Pesquisa: “Alterações cromossômicas e morfo-celulares em mucosa oral de pacientes antes e após a exposição às drogas anti-tuberculose”.

Interessado(a): Leandro José Ramos

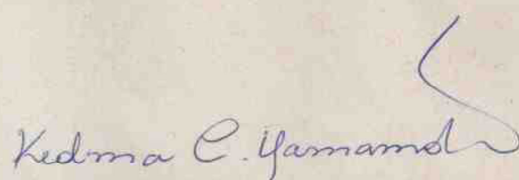
Entrada no CEP: 20/07/2011

ANÁLISE DO PROCESSO

Nesta data, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Luterano de Manaus, acatando voto do(a) eminente relator(a), **APROVADO “ad referendum”** o processo em epígrafe, com base do caput do item VII, na alínea a do sub item VII.13 e na alínea a do sub-item IX.2 da Resolução CNS 196/96 do MS/CONEP, ficando portanto autorizado o início da pesquisa proposta.

Plenário do Comitê de Ética em pesquisa do Centro Universitário Luterano de Manaus, em 01 de setembro de 2011.

Cordialmente,


Profª Dra. Kedma Cristine Yamamoto
Coordenadora do CEP - CEULM - ULBRA