

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO

GENOTOXICITY ASSESSMENT IN PATIENTS SMOKING CELLS AND NON-SMOKERS IN MICRONUCLEUS TEST ENVIRONMENT

Claudio Roger Batista¹
Edimar Olegário De Campos Júnior²

RESUMO:

Os tecidos epiteliais de revestimento são afetados diretamente por agentes químico-físicos, os quais podem expressar uma condição de genotoxicidade. Diversos testes citogenéticos são utilizados para avaliar os efeitos genotóxicos, dentre eles, o teste do micronúcleo, o qual constitui uma ferramenta eficiente para o biomonitoramento. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas na cavidade oral, o fumo apresenta uma grande relevância. A ingestão de bebidas alcoólicas quando associada ao hábito de fumar é citada como potencializadora do efeito carcinogênico do tabaco. O estudo foi realizado com 45 alunos de uma Faculdade da cidade de Monte Carmelo, com 30 indivíduos compondo o grupo exposto e 15, pertencentes ao grupo controle. Todos os participantes da pesquisa responderam a um questionário e forneceram amostras celulares do epitélio bucal. As lâminas foram tratadas e coradas com o corante azul de metileno. Foi utilizado o teste de Kruscal Wallis para comparação das variáveis entre os grupos de fumantes e não fumantes. O número de micronúcleos encontrados foi significativamente mais frequente no grupo exposto ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Ficou evidenciado que o consumo de tabaco e álcool induz a efeitos genotóxicos, o que aponta para riscos à saúde dos indivíduos.

ABSTRACT

The intake of alcoholic beverages when associated the smoking habit is cited as an aggravator effect of the genotoxicity of the tobacco. The study was performed with 45 students from a faculty of the city of Monte Carmelo, with 30 individuals compounding the exposed group and 15 belonging to control group. All research participants answered a questionnaire and have provided buccal epithelial cell samples. Slides were treated and stained with methylene blue dye. Was used the test Kruscal Wallis for comparison of variables among groups of smokers and nonsmokers. The number of micronuclei found was significantly more frequent in the exposed group ($p < 0.05$) compared to control group.

¹ Graduado em Ciências Biológicas pela Fundação Carmelitana Mário Palmério – FUCAMP – Monte Carmelo-MG. Contato: claudio_r2012@hotmail.com

² Mestre em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU/ Instituto de Genética e Bioquímica. Contato: edimarcampos@yahoo.com.br

Stayed evidenced that the consumption of tobacco and alcohol induces the genotoxic effects, which points to risks the health of individuals.

1 INTRODUÇÃO

Mais de 5 milhões de pessoas morrem por ano devido ao consumo de tabaco, tal fator é mais acentuado em países pobres e em desenvolvimento. A estimativa é que o número de mortes ultrapasse os 8 milhões por ano, até a década de 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2009). No Brasil, segundo levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2008), em parceria com o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer – INCA, tendo como foco indivíduos acima de 15 anos de idade, 17,2% da população fazia uso de tabaco com frequência, aproximadamente 25 milhões de brasileiros, sendo que a porcentagem de homens fumantes foi maior do que a de mulheres.

Os tecidos epiteliais de revestimento são mais afetados diretamente por agentes químico-físicos, que podem expressar uma condição de genotoxicidade (FENECH et al., 1999). Especificamente o epitélio oral (tecido pavimentoso estratificado não queratinizado) apresenta maior capacidade de absorção, devido às estruturas de suas células.

Diversos testes citogenéticos são utilizados para avaliar os efeitos genotóxicos em populações expostas a determinados agentes capazes de causar danos cromossômicos (MAJER et al., 2001). O teste do micronúcleo constitui uma ferramenta eficiente para biomonitoramento, por ser indicativo de danos ao DNA (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Os micronúcleos são corpúsculos constituídos por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros e permanecem separados do núcleo principal nas células filhas ao final do processo de mitose (SCHMID, 1975; RAMIREZ; SALDANHA, 2002). Segundo Tolbert, Shy e Allen (1992), uma célula pode apresentar um ou mais micronúcleos com diâmetro de até 1/5 do núcleo principal.

A ação de agentes genotóxicos como o tabaco e outros, a que as mucosas ficam expostas, pode ser observada em células esfoliadas através do ensaio do micronúcleo, diretamente no tecido alvo (FENECH et al., 1999). A detecção de micronúcleos em células

esfoliativas da mucosa oral, obtidas pelo método do esfregaço é indicativa de efeitos genotóxicos em células epiteliais da camada basal (STICH; ROSIN, 1983), estas células devem ser coletadas entre 5 a 24 dias após serem expostas aos agentes genotóxicos, uma vez que a sua migração ocorre de 5 a 7 dias e ficando assim expostas, se descamam em 3 semanas (VINE, 1990).

Segundo Williams (2000), muitos eventos podem induzir processos de carcinogênese, causando modificações genéticas nas células, alterando o controle da diferenciação, mitose e apoptose celular. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas na cavidade oral, o fumo tem tido uma grande relevância (ROBERTS, 1997; STICH; PARIDA; BRUNNEMANN, 1992). A ingestão de bebidas alcoólicas quando associada ao hábito de fumar é citada como potencializadora do efeito carcinogênico do tabaco, pois facilita a absorção de seus compostos pelas células (STICH; ROSIN, 1983). A indução à morte celular por agentes genotóxicos reflete na iniciação de eventos que podem levar às transformações malignas (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1991). As lesões malignas normalmente acarretam em morbidade e letalidade e dos índices referentes às lesões malignas de cabeça e pescoço, 40% deles ocorrem na cavidade oral (DEDIVITIS et al., 2004; COSTA; MIGLIORATI, 2001).

O trabalho objetiva analisar células de tecido epitelial da mucosa oral de pacientes fumantes regulares e não fumantes do sexo masculino para verificação da frequência de micronúcleos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do Estudo

O estudo foi realizado com indivíduos voluntários, estudantes de uma Faculdade da cidade de Monte Carmelo. As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de Citologia da Fundação Carmelitana Mário Palmério.

2.2 Amostragem

Foram enquadrados na amostragem apenas indivíduos do gênero masculino com idade entre 18 e 30 anos. Participaram da pesquisa 45 estudantes, os quais foram divididos em dois grupos: 30 fumantes ou grupo exposto e 15 não fumantes ou grupo controle. Todos responderam a um questionário (Apêndice I).

2.3 Extração do Material Biológico

Para a coleta de células esfoliadas da mucosa oral, o procedimento foi realizado segundo Thomas et al. (2008), iniciando por um bochecho com água dos indivíduos envolvidos, objetivando remover qualquer resíduo que pudesse comprometer as análises microscópicas. Foi recomendado aos pacientes que engolissem a saliva, em seguida, foi feito um esfregaço na parte interior da bochecha, com a utilização de um swab (haste com algodão estéril). O material coletado foi imediatamente transferido para uma lâmina previamente limpa, logo depois foi adicionado álcool a 70% para fixação do material e após o álcool evaporar totalmente, as lâminas foram coradas com o corante azul de metileno.

2.4 Teste do Micronúcleo

A análise das lâminas para detecção dos micronúcleos foi feita em um microscópio óptico em aumento de 100x e iluminação simples. Segundo os critérios de Coutryman e Heddle (1976), foram observados: Presença de material nuclear; Ter intensidade de luz maior ou igual a do núcleo; Ter forma circular ou oval; Possuir área menor do que 1/5 do núcleo; Estar completamente separado do núcleo. Foram analisadas 1000 células por lâmina para cada fluido coletado. A análise foi realizada por um único observador antes mesmo de se ter algum conhecimento prévio dos dados informados no questionário. Foram computadas somente as células visivelmente normais e distintas entre si, observando a presença ou não de micronúcleos em seu citoplasma.

2.5 Análise Estatística

Foi utilizado o teste de Kruscal Wallis para comparação das variáveis entre os grupos de fumantes e não fumantes com nível de significância de 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das informações obtidas, no grupo controle, os 15 indivíduos participantes eram abstêmios de tabaco e álcool, enquanto no grupo exposto, 4 indivíduos foram classificados como fumantes e 26 como fumantes e etilistas. O número de micronúcleos encontrados foi significativamente mais frequente no grupo exposto ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle (Tabela I), tanto para a frequência de micronúcleos, quanto para as células micronucleadas.

Tabela 1 – Frequência de Micronúcleos (MN) e de células Micronucleadas (CMN) de grupos tabagistas e não tabagistas.

Amostragem	Número de Pacientes	Células Totais	MN Totais	CMN Totais	X(%) ± SD	
					MN	
Grupo controle	15	15000	110	92	0,073±2.895	0,061±7.708
Grupo Exposto	30	30000	583	419	0,194±2.615*	0,139±5.726*

*Diferença significativa comparado ao Grupo controle de acordo com o teste de Kruscal Wallis, $\alpha = 0,05$

O hábito de fumar é um costume crescente dentre os jovens. Os produtos originados pela queima do tabaco são as substâncias químicas voláteis, cerca de 92% e o material particulado, cerca de 8%, os quais compõem a fumaça do cigarro e, dentre os componentes ativos do tabaco, o mais relevante é a nicotina, que é uma amina terciária volátil (BALBANI; MANTOVANI, 2005). Segundo Goodman, Limbird e Hardman (2005), a fumaça resultante da combustão do cigarro libera elementos da fase gasosa, como o monóxido de carbono e substâncias das partículas da fumaça, como a nicotina e o alcatrão, todos eles aumentam os riscos à saúde, sendo que a liberação das partículas irá

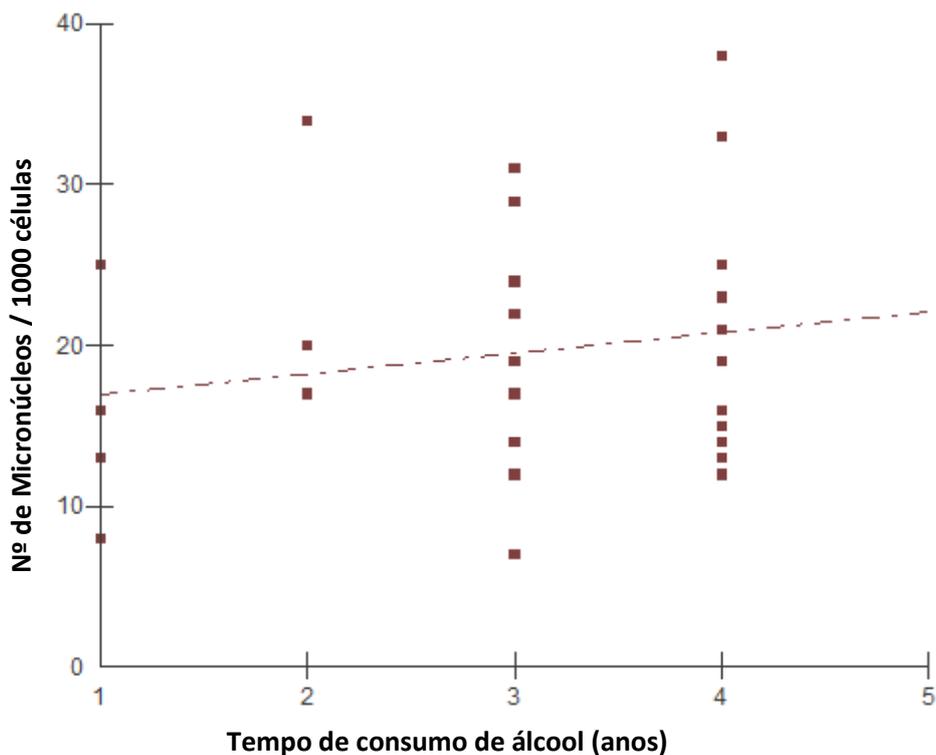
depender da composição do tabaco, do tipo de filtro e papel, da densidade em que foi embalado, e ainda, da temperatura a qual é queimado.

No grupo exposto, composto por 30 indivíduos, em relação ao hábito de fumar, os tipos de tabaco utilizados eram: somente cigarro com filtro – 19 indivíduos (aproximadamente 63%), somente cigarro sem filtro – 1 indivíduo (aproximadamente 3%), somente cigarro de palha – 6 indivíduos (aproximadamente 20%), cigarros com filtro e de palha – 2 indivíduos (aproximadamente 7%), cigarros com filtro, sem filtro e de palha – 2 indivíduos (aproximadamente 7%). Com relação à quantidade de tabaco consumida diariamente: menos de 10 cigarros – 12 indivíduos (aproximadamente 40%), de 11 a 20 cigarros – 13 indivíduos (aproximadamente 43,5%), de 21 a 30 cigarros – 4 indivíduos (aproximadamente 13,5%), mais de 31 cigarros – 1 indivíduo (aproximadamente 3%). O tempo de consumo de tabaco foi: de 01 a 02 anos – 2 indivíduos (aproximadamente 7%), de 03 a 04 anos – 8 indivíduos (aproximadamente 26,5%), de 05 a 07 anos – 12 indivíduos (aproximadamente 40%), 08 ou mais anos – 8 indivíduos (aproximadamente 26,5%). Os dados estatísticos analisados não determinaram significância quanto as variáveis: taxa de micronúcleo e tipo de cigarro, taxa de micronúcleo e frequência de tabagismo, nem mesmo entre taxa de micronúcleo e tempo de tabagismo, diferentemente dos estudos de Franco et al. (1989) e Kaugars et al. (1992), que determinaram haver uma correlação entre a quantidade e o tempo de consumo de tabaco, aumentando o risco para o surgimento de lesões na cavidade oral.

Ainda no grupo exposto, excetuando 4 indivíduos, os quais declararam não ingerir bebidas alcoólicas, dos 26 indivíduos com este hábito, os tipos de bebidas consumidas foram: bebidas fermentadas – 6 indivíduos (aproximadamente 23%), bebidas destiladas – 3 indivíduos (aproximadamente 12%), ambas – 17 indivíduos (aproximadamente 65%). A frequência de bebidas ingeridas semanalmente foi: de 01 a 02 vezes – 18 indivíduos (aproximadamente 69%), de 03 a 05 vezes – 7 indivíduos (aproximadamente 27%), todos os dias – 1 indivíduo (aproximadamente 4%). O tempo de consumo de álcool foi: de 01 a 02 anos – 1 indivíduo (aproximadamente 4%), de 03 a 04 anos – 4 indivíduos (aproximadamente 15,5%), de 05 a 07 anos – 10 indivíduos (aproximadamente 38,5%), 08 ou mais anos – 11 indivíduos (aproximadamente 42%).

Os resultados também evidenciaram que os indivíduos amostrados do grupo exposto que fazem uso de álcool (aproximadamente 87%), potencializam o incremento de micronúcleo, visto que tal acréscimo se mostrou dependente do tempo (em anos) de ingestão de bebidas alcoólicas (Gráfico I). O consumo de álcool associado ao uso de tabaco, já foi descrito na literatura como sendo potencializador dos efeitos do tabaco. Este sinergismo foi evidenciado nos estudos de Stich (1987) e Ghose e Parida (1995), onde avaliaram uma frequência aumentada dos micronúcleos em pacientes que faziam uso de tabaco e álcool simultaneamente.

Gráfico 1 – Diagrama de distribuição de indivíduos quanto à relação Tempo (em anos) de ingestão de bebidas alcoólicas e frequência de Micronúcleos.



Durante toda a sua vida, os indivíduos estão constantemente expostos a diversos fatores químicos, como por exemplo, o tabaco e o álcool, fatores físicos, como a radiação solar, e fatores biológicos, como a predisposição a fatores de sensibilidade. Neste estudo, foram levados em consideração somente dois fatores de risco: o tabaco e o álcool. Muitos

testes têm sido desenvolvidos para monitorar indivíduos expostos a diversos fatores, neste caso, foi utilizado o teste do micronúcleo, por ser um método não invasivo, ser de fácil realização e ainda ter um baixo custo. Este teste com a utilização dos micronúcleos, tem se mostrado um eficiente biomarcador, podendo ser empregado para avaliar injúrias genotóxicas e detectar danos precocemente em pacientes mais expostos a fatores de risco (WÜNSCH-FILHO; GATTÁS, 2001).

4 CONCLUSÃO

O grupo exposto, não apresentou uma correlação dose dependente em relação ao tabaco, visto que as anormalidades celulares são variáveis para cada indivíduo, de acordo com fatores de sensibilidade. Independentemente desse fator, ficou evidenciado que o consumo de tabaco e álcool induz a efeitos genotóxicos, o que aponta para riscos à saúde dos indivíduos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALBANI, A.P.S.; MONTOVANI, J.C. Métodos para abandono do tabagismo e tratamento da dependência da nicotina. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 820-827, 2005.
- COSTA, E.D.; MIGLIORATI, C.A. Câncer bucal: avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 283-289, 2001.
- COUNTRYMAN, P.I.; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 41, p. 321-332, 1976.
- DEDIVITIS, R.A.; FRANÇA, C.M.; MAFRA, A.C.B.; GUIMARÃES, F.T.; GUIMARÃES, A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 35-40, Jan-Fev. 2004.
- FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, P.W.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; CURADO, M.P.; PEREIRA, R.N.; SILVA, M.E.; FAVA, A.S.; TORLONI, H. Risk factors for oral câncer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, v. 43, p. 992-1000, 1989.

GHOSE, U.R.; PARIDA, B.B. Cythological study of exfoliated buccal mucosa cells of tribes in Orissa State (India) with high risk for oral cancer. **Indian J. of Cancer**, v. 32, p. 95-99, 1995.

GOODMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E.; HARDMAN, J.G. (ed.). Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução: Carla de Mello Vorsatz. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). Tabagismo, 2008*. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1505 [Acessado em 23 de Março de 2012].

KAUGARS, G.E.; RILEY, W.T.; BRANDT, R.B.; BURNS, J.C.; SVIRSKY, J.A. The prevalence of oral lesions in smokeless tobacco users and an evaluation of risk factors. **Cancer**, v. 70, n. 11, p. 2579-2585, 1992.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE JR., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v. 540, p. 153-163, 2003.

MAJER, B.J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutat. Res.**, v. 489, p. 147-172, 2001.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 1, no. 3, p. 246-260, Sept. 2002.

ROBERTS, D.M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. **Acta Cytol**, v. 41, no. 4, p. 1008-1014, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 31, no. 1, p. 9-15, Feb. 1975.

STICH, H.F. Micronucleated exfoliated cells as indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials. **J. of Nutrition, Growth and Cancer**, V. 4, n. 1, 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.

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

THOMAS, P.; HARVEY, S.; GRUNER, T.; FENECH, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutat. Res.**, v. 638, p. 37-47, 2008.

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. 840-850, 1991.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 271, no. 1, p. 69-77, Feb. 1992.

VINE, M.F. Micronuclei. In: Hulka B.S.; Wilcosky T.C.; Griffith J.D. Biological markers in epidemiology. New York: Oxford Univ, 1990.

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 Março de 2012].

WILLIAMS, H.K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Clin Pathol: Mol. Pathol**, v. 53, p. 165-172, 2000.

WÜNSCH-FILHO, V.; GATTÁS, G.J.F. Biomarcadores moleculares em Câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 467-480, Jun. 2001.