

## **Avaliação da frequência e ocorrência do biomarcador micronúcleo em células de mucosa oral em usuários de cigarro e narguilé.**

Amanda Bernardes Fonseca Silveira<sup>1</sup>, Catheline Deguti Vieira Costa<sup>1</sup>, Dirceu Neto Deguti Vieira Costa<sup>1</sup>, Fabrício Fernandes Maciel<sup>1</sup>, Maria Carolina Batista Martins<sup>1</sup>, Renata Souza Felício<sup>1</sup>, Savio Carvalho Cobianchi<sup>1</sup>, Mariana de Oliveira Mauro<sup>2</sup>.

1. Estudante do curso de Medicina da Universidade Anhanguera Uniderp.

2. Professora Doutora do curso de Medicina da Universidade Anhanguera Uniderp/Orientadora.

### **Resumo**

O consumo de tabaco é sabidamente prejudicial à saúde e está relacionado à genotoxicidade celular. O objetivo deste trabalho foi a avaliação da ação genotóxica/mutagênica do cigarro e do narguilé em células de mucosa oral por meio do biomarcador micronúcleo a fim de estabelecer se há diferença entre os dois tipos de fumos. O ensaio foi realizado em estudantes na Universidade Anhanguera Uniderp, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul e foram divididos em grupo controle, grupo de usuários apenas de cigarro, grupo de usuários apenas de narguilé e grupo de usuários de ambos. Foi realizado um questionário e posteriormente procedeu-se a coleta de uma amostra da mucosa oral e análise em microscópio óptico. Por meio dos resultados obtidos notou-se que os grupos que tiveram uma maior frequência de micronúcleo foram os indivíduos que usam somente cigarro e o grupo que faz uso do cigarro e narguilé em conjunto. Evidenciou-se que o consumo do tabaco mostrou-se mais genotóxico que o uso de narguilé.

**Autorização legal:** O projeto de pesquisa foi submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/CONCEP) alocado na Universidade Anhanguera Uniderp e aprovado sob o número 84331417.8.0000.5161.

**Palavras-chave:** genotoxicidade, mutagenicidade, tabaco.

**Apoio financeiro:** Recursos próprios

### **Introdução**

O câncer é uma questão de saúde pública, e de acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer o Brasil deve registrar cerca de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano (INCA, 2018). Diversos fatores de risco têm sido identificados em associação com o desenvolvimento do câncer oral e dentre eles o hábito de fumar é o mais consistentemente relatado, particularmente quando em concomitância com o hábito de ingerir bebidas alcóolicas (Bloching et al., 2000; Hindle et al., 2000; Reis et al., 2002; Handle et al., 2008).

De acordo com Martins e Filho (2003), indivíduos geneticamente sensíveis a agentes genotóxicos podem apresentar danos no DNA genômico, levando aos mais diversos tipos de alterações celulares. Entre estas alterações se destaca a micronucleação. Na cavidade bucal, a formação de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa tem sido utilizada como marcador biológico intermediário para avaliar o efeito preventivo de protocolos de quimioprevenção ou o grau de comprometimento da mucosa bucal frente à exposição a xenobióticos (Setúbal et al., 2005).

A presente pesquisa avaliou a incidência e a frequência de danos genômicos, por meio do biomarcador micronúcleo, causados pelo uso de um xenobiótico que é frequentemente utilizado no cotidiano da população brasileira, o tabaco. O tabaco pode ser utilizado de diferentes formas: o cigarro e o narguilé que permitem o uso por aspiração e o fumo mascado que é utilizado por absorção da mucosa oral e ingestão gastrointestinal. Desta forma, o estudo aqui descrito avaliou a incidência de micronúcleos em usuários de tabaco por aspiração a fim de comparar e determinar se há diferenças relevantes entre as frequências de micronúcleo de fumantes de cigarro comercial e narguilé.

### **Metodologia**

#### **Grupos Experimentais, Critérios de Inclusão e Exclusão**

Participaram da pesquisa pessoas com da faixa etária de 18 a 30 anos. Foi considerado fumante aquele que faz o uso do tabaco por no mínimo um ano e com frequência mínima de 3 vezes por semana. Já os não fumantes, aqueles que nunca utilizaram ou que pararam há pelo menos 5 anos.

Os participantes do estudo foram divididos em quatro grupos com 20 participantes:

Grupo 1: Grupo controle, participantes não fumantes, entre aqueles que nunca fumaram ou que pararam há no mínimo 5 anos. Grupo 2: Participantes que fumam somente cigarro. Grupo 3: Participantes fumantes que fazem uso apenas do narguilé. Grupo 4: Participantes que fazem o uso dos dois tipos de fumo, narguilé e cigarro.

Foi aplicado um questionário para alunos dos cursos de Medicina, Biomedicina, Enfermagem, Farmácia e Biologia da Universidade Anhanguera Uniderp com 17 perguntas objetivas que determinou a população da pesquisa. Foram excluídos aqueles que apresentavam lesões pré-existentes na mucosa oral. Também foram excluídos aqueles que fazem uso de drogas ilícitas, uso diário de antisséptico oral a base de álcool em sua fórmula e uso de outras formas de tabaco além das estipuladas na pesquisa.

### **Ensaio de Micronúcleo**

Foi realizada a coleta de uma amostra de células da mucosa oral por meio de citologia esfoliativa. O swab foi inserido na cavidade oral e coletado as células da parede da mucosa bucal, com movimentos de leve fricção. Com este material foi realizado o esfregaço em lâmina de vidro limpa na qual foi previamente colocada uma gota de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). As lâminas com o material coletado secaram à temperatura ambiente, e foram, após secas, fixadas em solução de metanol/ácido acético na concentração de 3/1. Transcorridas 24 horas foi feita hidrólise em solução de ácido clorídrico (5N) por 15 minutos seguida de lavagem em água destilada por três vezes. A coloração foi feita utilizando o reativo de Schiff e a contra-coloração com Fast Green a 1%.

Microscopia óptica (200x) e teste cego foram utilizados para a análise citológica, e os resultados foram cruzados aos dados coletados previamente no questionário para a identificação dos micronúcleos, bem como adotados os critérios descritos por Tolbert; Shy; Allen (1991;1992): estruturas arredondadas e separadas do núcleo de forma distinta, que apresentam limites bem definidos, com cerca de 1/3 a 1/5 comparado ao tamanho do núcleo, foram considerados micronúcleos.

Os resultados da análise citológica, juntamente com as informações obtidas através do questionário foram tabulados e analisados estatisticamente por meio do programa estatístico InStat®. Foi utilizado o teste de variância (ANOVA) seguido Tukey, sendo o  $p < 0,05$ .

### **Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos podem ser visualizados no Anexo 1.

Segundo a International Agency for Research on Cancer, o câncer oral é um dos mais incidentes (IARC, 2015). Um dos fatores que intensificam a chance de desenvolvimento desta neoplasia é o tabagismo, este, associado ao uso concomitante de bebidas alcoólicas, aumentam o dano causado pelos agentes genotóxicos (Silverman, 2010). Como forma de minimizar o custo à saúde pública, vem sendo utilizado testes biomarcadores de risco para câncer, visando à prevenção da doença. O teste de micronúcleo constitui uma das possíveis alternativas, com baixo custo e alta sensibilidade (Holand et al., 2008).

Os resultados observados demonstram que os participantes da pesquisa possuem uma homogeneidade em relação a idade atual e a idade que iniciaram o consumo de tabaco. Este fato pode ser explicado por meio das características da população selecionada para a pesquisa, universitários com faixa etária de 18 a 30 anos em cursos diurnos. A frequência de consumo de narguilé e cigarro também são homogêneas nos resultados observados. Já o consumo de álcool possui diferença, sendo o grupo de não fumantes o grupo de menor consumo de álcool e o grupo de fumantes de cigarro e narguilé associado o de maior consumo semanal de álcool.

Estudos indicam que os micronúcleos se desenvolvem a partir de exposições contínuas, podendo desaparecer quando o agente genotóxico deixa de ser utilizado (Setúbal, 2005). Em vista disso, quando se volta o olhar para os resultados relacionados ao micronúcleo observa-se que há ocorrência deste biomarcador em todos os grupos testados. Infere-se que há um nível basal de micronucleação, que se verifica no grupo controle e que pode estar relacionada a exposição a diversos xenobióticos presentes no ambiente. Contudo, observa-se também um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos nos grupos que fazem uso do tabaco na forma de cigarro e cigarro associado ao narguilé. Já o grupo que consome apenas narguilé tem um discreto aumento na frequência de micronúcleos, apesar deste aumento não ter significância estatística. Entende-se que o fenômeno pode ser explicado pela frequência da exposição da mucosa oral ao narguilé, a qual é menor que ao cigarro, como exposto nos gráficos 3 e 4. Isso pois o consumo de narguilé está associado a eventos sociais, que são em sua maioria de frequência semanal, já o consumo de cigarro é diário e em vários momentos do dia.

Quando se trata do consumo associado de narguilé e cigarro verifica-se um aumento da frequência de micronúcleos, contudo não representa diferença estatística relevante se comparada ao grupo de fumantes de cigarro. Importante observar que este grupo também é o que faz o maior consumo de álcool. Desta forma, verifica-se que o aumento do tempo de exposição a diferentes agentes genotóxicos leva a esse resultado.

Os resultados indicam que o álcool e o cigarro podem representar condições suficientes para desenvolver micronúcleos, como observado entre os sujeitos que se declararam usuários destas substâncias. Entretanto, indicam, ainda, que o álcool e o cigarro não representam as condições necessárias, pois como observado sujeitos que não fazem uso destas substâncias também apresentaram micronúcleos.

## Conclusões

O presente trabalho comprovou que o álcool e o tabaco promovem a instabilidade celular, apresentando assim alterações celulares como a formação de micronúcleos na mucosa oral. Contudo, outros agentes genotóxicos também podem provocá-la. A presença dessas alterações, por si só, não garante que o sujeito desenvolverá alguma doença, apesar de representar um sinal de instabilidade importante.

O fumo de narguilé apesar de ser condenado pela mídia como mais nocivo à saúde da mucosa oral em relação ao cigarro, neste estudo pôde constatar que a presença de micronúcleos nesse tipo de fumo é menor, tendo em vista a menor frequência de uso do mesmo, geralmente apenas em ocasiões sociais. Ademais, constatou-se que não houve diferença estatística relevante quanto à presença de micronúcleos na mucosa bucal nos participantes do grupo de fumantes de cigarro e do grupo de fumantes de ambos. Isso pode ser explicado em razão do aumento do tempo e frequência de exposição, pois nesses casos o fumo além de ser diário é realizado em diversos períodos do dia.

Portanto, conclui-se que o uso do cigarro e o uso de ambos são mais maléficos, visto que apresentam maior frequência e ocorrência de micronúcleos de mucosa oral o que acarreta a instabilidade celular, que pode futuramente originar uma neoplasia.

## Referências bibliográficas

BLOCHING, A. et al. **Micronucleus Investigations Of Alcoholic Patients With Oral Carcinomas**. Genetic Molecular Res, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2000.

HINDLE, P., et al. **Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis**. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery; 46: 370–375; 2000.

HOLLAND, N. et al. **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps**. Mutat Res, v. 659, p. 93-108, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e **Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA, 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/monographs-and-supplements-available-online/>. Acesso em: julho de 2018.

MARTINS FILHO, P. et al. **Oral câncer in Brazil: a secular history of public health policies**. RGO, Rev. Gaúcha Odontol, Porto Alegre, v.62, n.2, p. 159-164, abr./jun., 2014.

REIS, C. A. A. **Formas não habituais do uso do tabaco**. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 1069-1073; 2002.

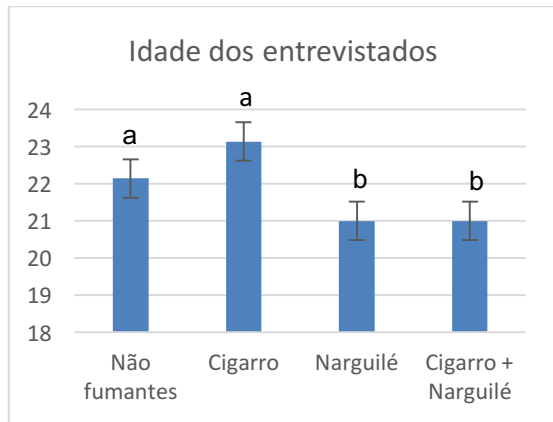
SAILAJA, N. et al. **Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production**. Mutat Res, v. 609, p. 74-80. 2006

SILVERMAN JR. S, KERR AR, EPSTEIN JB. **Oral and pharyngeal cancer control and early detection**. J Cancer Educ. 253:279-81, 2010.

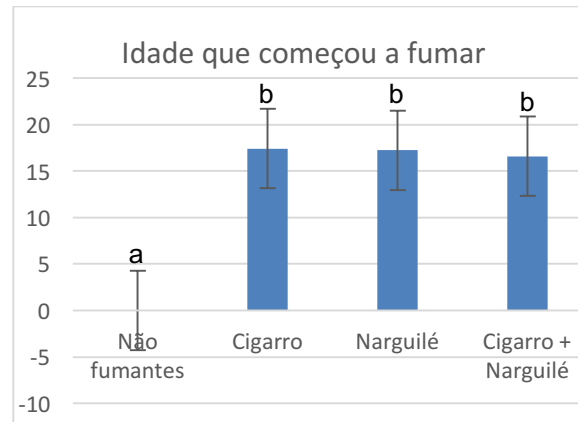
SETÚBAL, A.M.G. et al. **Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal**, Rev Odonto Ciência- Fac.Odonto/PUCRS, v.20, n.28, abr./jun.2005

**Anexo 1**

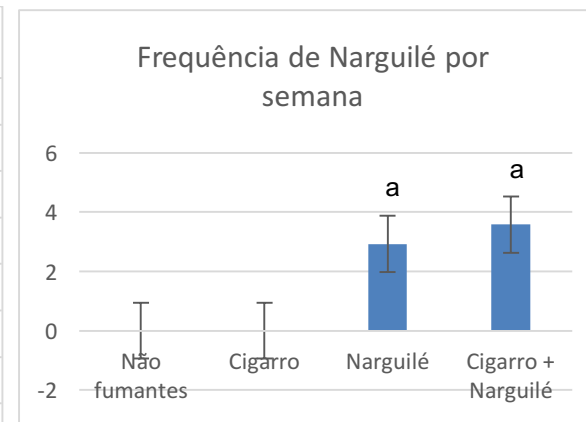
**Gráfico 1.**



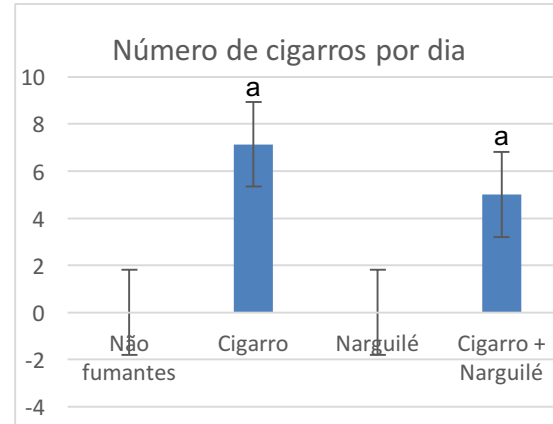
**Gráfico 2.**



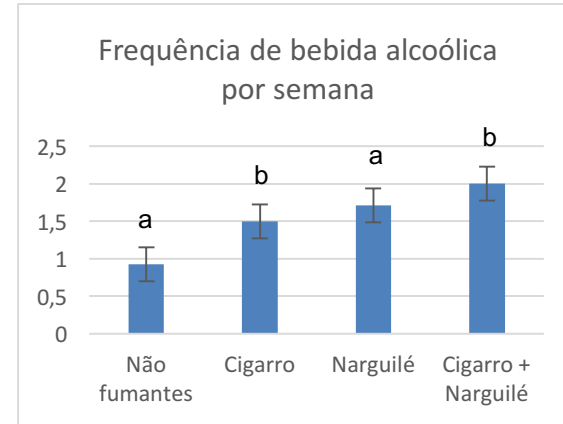
**Gráfico 3.**



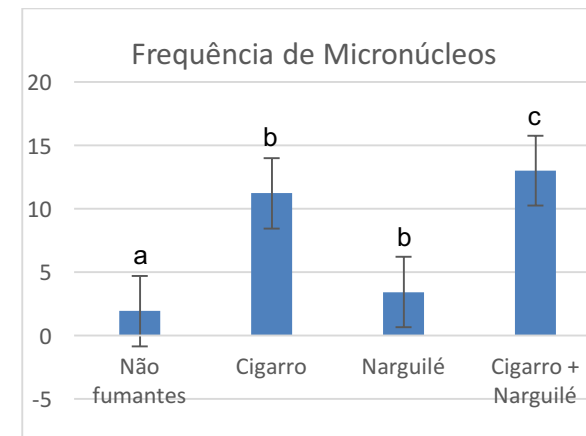
**Gráfico 4.**



**Gráfico 5.**



**Gráfico 6.**



Legenda dos gráficos de 1 ao 6: Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas. Teste estatístico ANOVA/Tukey (P < 0,05).