



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**HAYDEE GINA QUISPE JIMÉNEZ**

**AVALIAÇÃO SUBCLÍNICA DA FREQUÊNCIA DE  
MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL  
EM PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES**

**SOBRAL**  
**2019**

HAYDEE GINA QUISPE JIMÉNEZ

AVALIAÇÃO SUBCLÍNICA DA FREQUÊNCIA DE  
MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL  
EM PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva  
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza  
Batista

SOBRAL  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- Q83a Quispe Jimenez, Haydee Gina.  
Avaliação subclínica da frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal em pacientes fumantes e não fumantes / Haydee Gina Quispe Jimenez. – 2020.  
83 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Ana Liza Paz Souza Batista.
1. Micronúcleos com defeito cromossômico. 2. Mucosa Bucal. 3. Tabagismo. I. Título.
- CDD 660.6
-

HAYDEE GINA QUISPE JIMÉNEZ

AVALIAÇÃO SUBCLÍNICA DA FREQUÊNCIA DE  
MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL  
EM PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Aprovada em: 13 / 12 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Marcelo Bonifácio da Silva Sampieri (Membro externo)  
Universidade Federal do Ceará

## RESUMO

A mucosa bucal pode ser exposta a agentes cancerígenos, em especial o tabaco, tornando-se suscetível a danos celulares devido aos múltiplos metabólitos reativos gerados. Os micronúcleos são indicativos de danos no DNA e poderiam contribuir no rastreamento e na compreensão da etiopatogênese de lesões subclínicas. Este diagnóstico celular é pouco explorado e bastante heterogêneo na comunidade científica. O objetivo deste trabalho visou determinar a frequência de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa oral hígida em pacientes fumantes e não fumantes. Foi realizada a coleta e fixação em etanol 95% de 100 células esfoliadas da mucosa oral com *cytobrush* em mucosa jugal, borda lateral de língua e assoalho de boca de 16 pacientes de ambos sexos, separados em 2 grupos: fumantes (G1) e não fumantes (G2). Após processamento citológico e coloração de Papanicolau, as lâminas foram analisadas usando microscópio óptico, sendo fotodocumentadas 100 células/amostra e um total de 4.800 imagens foram analisadas, com contagem da presença de células micronucleadas (CMN) e a quantidade de micronúcleos (MNs) por célula. Os dados paramétricos permitiram comparações intergrupos e intragrupos considerando as variáveis sexo (masculino e feminino), regiões anatômicas, faixa etária (40-50 e 50-60 anos) e faixas de micronúcleos por célula (1, 2, 3 ou  $\geq 4$ ), com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey e significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). A quantidade geral de CMN em G1 foi quase o dobro (50,53%) de G2. A frequência de CMN foi mais expressiva em G1 em todas as regiões anatômicas analisadas, representando um aumento de 72,49% em assoalho da boca. As demais regiões estudadas não apresentaram diferença significativa. A presença de CMN entre G1 e G2 não mostrou nenhuma diferença significativa para o sexo masculino. Já no sexo feminino, entre os grupos G1 e G2, se observou diferença significativa ( $p < 0,01$ ), alcançando aumento de 72,38% de células micronucleadas em pacientes fumantes. Considerando a faixa etária de 40-50 anos e comparando os grupos G1 e G2, não houve nenhuma diferença significativa. Mas em relação à faixa de 50-60 anos entre os grupos G1 e G2, verificou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), o que representa uma frequência aumentada de 68,92% de CMN em pacientes de G1. Houve prevalência geral da quantidade de 1 e 2 micronúcleos por célula em G1 e G2, havendo aumento de 46,68 e 67,5% respectivamente em G1. Com respeito às regiões estudadas, mucosa jugal, borda lateral da língua e assoalho da boca foram significativamente diferentes entre G1 e G2 ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Tais resultados indicam diferenças na presença geral de micronúcleos e quantidade de MN/célula entre fumantes e não fumantes, bem como entre diferentes regiões anatômicas intraorais, sexo e idade, sugerindo que a citopatologia oral pode contribuir para o diagnóstico subclínico de alterações genotóxicas celulares.

**Palavras-chave:** Micronúcleos com defeito cromossômico. Mucosa bucal. Tabagismo.

## ABSTRACT

The oral mucosa can be exposed to carcinogens, especially tobacco, becoming susceptible to cell damage due to the multiple reactive metabolites generated. Micronuclei are indicative of DNA damage and could contribute to the monitoring and understanding of the etiopathogenesis of subclinical lesions. However, this cellular diagnosis is little explored and quite heterogeneous in the scientific community. The objective of this study was to determine the frequency of micronuclei in epithelial cells of the healthy oral mucosa in smokers and non-smokers. It was performed a collection and fixation of exfoliated cells from oral mucosa in alcohol of 95%, it was used a cytobrush in the inner cheek mucosa, lateral border of the tongue and floor of the mouth of 16 patients of both sexes. They were separated into two groups: smokers (G1) and non-smokers (G2). After the cytological processing and Papanicolau test, the slides were analyzed with an optical microscope, 100 cells/sample were documented and 4800 images were analyzed, where the presence of micronucleated cells (MNC) and the number of micronuclei were counted per cell. Parametric data allowed intergroup and intragroup comparisons. It were considered the variables gender (male and female), anatomical regions, age (40-50 years and 50-60 years) and micronucleus per cell (1, 2, 3 or  $\geq 4$ ). It was used analysis of variance (ANOVA) and multiple Tukey comparisons with statistical significance of 5% ( $p < 0.05$ ). The total amount of MNC in G1 was almost double (50.53%) than G2. The frequency of MNC was more expressive in G1 for all the anatomical regions analyzed, with an increase of 72.49% in floor of mouth region. The other regions studied showed no significant differences. The presence of MNC between G1 and G2 did not show significant differences in men. For women, between groups G1 and G2, a significant difference was observed ( $p < 0.01$ ) reaching an increase of 72.38% in micro-nucleated cells in smoking patients. Regarding the age group of 40-50 years and comparing between groups G1 and G2, there was no significant difference. For the 50-60 year group of G1 and G2 respectively, there is a significant difference ( $p < 0.05$ ), which represents an increased frequency of 68.92% in micro-nucleated cells in G1 patients. There was a general prevalence of 1 and 2 micronuclei per cell in G1 and G2, with an increase of 46.68 and 67.5% respectively in G1. About the regions studied, the inner cheek lining, the lateral edge of tongue and the floor of mouth were significantly different between G1 and G2 ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.0001$ , respectively). These results indicate differences about the general presence of micronuclei and the number of micronuclei per cell between smokers and non-smokers, as well as between different intraoral anatomical regions, sex and age, suggesting that oral cytopathology may contribute to the sub-clinical diagnosis of cellular genotoxic alterations.

**Keywords:** Micronuclei, chromosome-defective. Mouth mucosa. Tobacco use disorder.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Cavidade bucal.....	15
Figura 2	- Epitélio estratificado.....	17
Figura 3	- Fotomicrográfica dos diferentes tipos de mucosa bucal especializadas: (A) Mucosa mastigatória; (B) Mucosa de revestimento e (C) Mucosa especializada .....	17
Figura 4	- Variações regionais da mucosa bucal.....	19
Figura 5	- Etapas do processo de desenvolvimento tumoral.....	20
Figura 6	- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	23
Figura 7	- Incidência do tabagismo por regiões - 2015.....	24
Figura 8	- Incidência do tabagismo em América Latina - 2016.....	25
Figura 9	- Distribuição dos fumantes no período de 2006 a 2018.....	27
Figura 10	- Fumantes passivos em domicílio por sexo, no período 2009-2018.....	28
Figura 11	- Fumantes passivos no local de trabalho por sexo no período 2009-2018	28
Figura 12	- Variação anual da prevalência de fumantes antes e após da Lei 12.546/2011.....	29
Figura 13	- Demonstração de diferentes formas de formação de micronúcleos: (a) Defeito do fuso mitótico, (b) Quebra de DNA, (c) DNA cromossômico extra (d) Amplificação de DNA.....	31
Figura 14	- Biomarcadores que ajudam na detecção de câncer oral e outros cancerres.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média $\pm$ DP da faixa de micronúcleos por células (1, 2, 3 e $\geq$ 4) de pacientes fumantes e não fumantes de acordo com as regiões anatômicas intraorais, sexo e idade.....	51
--	----



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fotomicrografia de um queratinócito esfoliado de mucosa jugal; (a) Paciente não tabagista, b) Paciente tabagista.....	50
Gráfico 2 - Presença de CMN segundo: (a) Amostra geral (2400 células/grupo), (b) Regiões anatômicas intraorais, (c) Sexo, (d) Idade.....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos celulares no epitélio.....	16
Quadro 2 - Morfologia de Micronúcleos.....	30
Quadro 3 - Resumo dos fatores que modificam o número de micronúcleos em culturas de células humanas.....	33
Quadro 4 - Síntese de vantagens e desvantagens do teste para micronúcleos.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AB	Assoalho de boca
BLL	Borda lateral de língua
CMN	Célula micronucleada
CQCT/OMS	Convenção-Quadro da OMS para o Controle do Tabaco
CEB	Carcinoma epidermóide bucal
HPV	Papiloma vírus Humano
GBD	Global Burden of Disease
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGBE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MN	Micronúcleo
MJ	Mucosa jugal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

## AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo de Universidades Brasileiras Coimbra (GCUB), através do Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC OEA-GCUB) que, junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), me permitiram a realização do mestrado no Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado (CAPES-DS, código 001).

Ao Laboratório de Biomateriais da UFC *Campus* Sobral e à Clínica de Odontologia da UFC Sobral, fundamentais para a viabilização desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva, pela sua orientação neste trabalho e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista, pelo apoio na pesquisa.

A meus professores Dr. José Roberto Viana, Dr. Rodrigo Maranguape e Prof. Victor Carneiro por sua paciência e me ajudar a apreender as novas disciplinas.

À Mestre Edla Freire de Melo por seu apoio (muito obrigada), assim também como Rafaela Mesquita por sua paciência e por disponibilizar-se a me ensinar para melhorar a minhas destrezas no laboratório, muito obrigada. Ao Francisco Gomes por seu apoio no laboratório e a minha estadia em Sobral. A meus colegas Efigênia e Sandro pelas dicas para realizar a pesquisa e seu camaradagem durante as horas de trabalho.

Aos meus pais, Hector e Gabina, minhas irmãs, por estarem sempre presentes comigo apesar da distância, e por acompanharem e cuidarem de Charly até o fim durante a minha ausência.

Um agradecimento especial a minha amiga Yaneth Carita (minha irmã) que sempre me apoiou, embora a distância, uma amizade que quebra tempo e longos viagens.

A meus colegas e amigos Paulo de Tarso, Nívea, Jesus, Francisco, Edinara, Erivan e Bruno, membros do NUBIS, agradeço muito por sua paciência e seu carinho. Graças a vocês foi muito melhor minha estadia em Sobral. Vocês são minha família brasileira.

Conheci pessoas maravilhosas, Ítalo, Erika, Jean, agradeço a vocês por sua amizade e solidariedade, pelas conversas no almoço e caminhadas em Sobral.

Aos funcionários Senhores Rodrigo, Clever, José, Almino, Iran, Valdinar, Felipe, Eder, e Sras. Delane e Edilda, por sua gentileza e sempre disponibilizar-se a ajudar me quando precisar.

A todos, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Cavidade oral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Epitélio bucal.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Mucosa bucal.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1</b>	<i>Mucosa de revestimento.....</i>	<b>18</b>
<b>2.3.2</b>	<i>Mucosa mastigatória.....</i>	<b>18</b>
<b>2.3.3</b>	<i>Mucosa especializada.....</i>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Câncer.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.1</b>	<i>Etiologia do câncer.....</i>	<b>20</b>
<b>2.4.2</b>	<i>Câncer da cavidade oral .....</i>	<b>21</b>
<b>2.4.2.1</b>	<i>Fatores de risco para o câncer oral.....</i>	<b>21</b>
<b>2.4.2.2</b>	<i>Panorama do câncer oral no Brasil.....</i>	<b>23</b>
<b>2.4.3</b>	<i>Tabagismo.....</i>	<b>24</b>
<b>2.4.3.1</b>	<i>Efeitos citotóxicos do tabaco.....</i>	<b>26</b>
<b>2.4.3.2</b>	<i>O tabagismo no Brasil.....</i>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Micronúcleos.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1</b>	<i>Teorias de origem do micronúcleo.....</i>	<b>30</b>
<b>2.5.2</b>	<i>Causas da formação de micronúcleos.....</i>	<b>32</b>
<b>2.5.3</b>	<i>Fatores de variabilidade.....</i>	<b>33</b>
<b>2.5.4</b>	<i>Utilização do teste de micronúcleo.....</i>	<b>33</b>
<b>2.5.4.1</b>	<i>Micronúcleos em células esfoliada.....</i>	<b>34</b>
<b>2.5.4.2</b>	<i>Citopatologia esfoliativa convencional.....</i>	<b>34</b>
<b>2.5.5</b>	<i>Vantagens e desvantagens do teste para micronúcleos.....</i>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Biomarcadores para detecção do câncer oral.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO FORMATADO .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE B - FICHA DE ANAMNESE, EXAME CLÍNICO E CITOLÓGICO .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE C - DADOS DEMOGRÁFICOS GERAIS DA AMOSTRA (n=16) .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE D - CITOLOGIA EXFOLIATIVA EM MUCOSA ORAL.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE E - MÉDIA±DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS, PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE F - MÉDIA±DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DA QUANTIDADE DE MICRÓNÚCLEOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A - DIRETRIZES PARA AUTORES.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO C - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO D - INSTRUÇÕES PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO (REGIMENTO INTERNO DO PPGb) .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O impacto de fatores ambientais, genéticos e de estilo de vida na estabilidade genômica em populações humanas tem gerado um crescente esforço mundial na busca de ferramentas diagnósticas laboratoriais mais efetivas. Uma técnica que tem sido adotada por numerosos laboratórios é a medição de micronúcleos (MN) em linfócitos de sangue periférico e, em menor extensão, células epiteliais, eritrócitos e fibroblastos. Tecidos epiteliais estão em contato imediato com agentes genotóxicos inalados pelo ar, ingeridos com comida e água, expostos por hábitos viciosos (tabaco e álcool) na mucosa oral, assim como junto aos metabólitos excretados na urina (ALEXANDRESCU; HAVÂRNEANU; POPA, 2006). O uso de células epiteliais esfoliadas de mucosa oral na avaliação de MN corresponde a uma técnica minimamente invasiva de coleta (BONASSI *et al.*, 2009).

A avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos, físicos e biológicos permite uma maior compreensão dos fatores de predisposição à ocorrência de neoplasias. Neste sentido, a elaboração de estudos controlados por meio da aplicação do teste do MN permite a avaliação dos fatores de pré-disposição para o desenvolvimento do câncer bucal em grupos expostos a agentes genotóxicos (FARIA; BRAGA, 2015). O hábito de fumar e o consumo de bebidas alcoólicas representam os fatores de maior contribuição para o desenvolvimento de lesões malignas na cavidade oral, pelo dano causado ao DNA celular, podendo aumentar em até 38 vezes seu risco quando estão simultaneamente presentes (RAMIREZ; SALDANHA, 2002; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011; FARIA; BRAGA, 2015).

O tabagismo é, isoladamente, a principal causa de câncer no mundo (WUNSCH FILHO *et al.*, 2010). Desde o clássico estudo de Doll e Hill (1950), que identificou a estreita associação entre consumo de cigarros e câncer de pulmão, novas evidências foram acumuladas para outros tumores malignos. De acordo com a revisão conduzida pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), existem 20 tipos de tumores malignos associados com o tabagismo (WUNSCH FILHO *et al.*, 2010). Dentre eles, câncer da cavidade oral, orofaringe, nasofaringe e hipofaringe, esôfago (adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas), estômago, fígado, pâncreas, cavidade nasal e seios paranasais, laringe, pulmão, uterino, etc. (SECRETAN *et al.*, 2009), incluindo o câncer de ovário e o de cólon (WUNSCH FILHO *et al.*, 2010).

A fumaça do tabaco entra no corpo pela boca e sai através dele e pelo nariz. Essa circulação de fumaça é uma microagressão contínua que afeta os dentes, a cavidade oral, a faringe, a laringe, os seios paranasais e a parte superior do esôfago, além de brônquios e

pulmões. Geralmente, a fumaça é inalada nos pulmões, onde grande parte da nicotina é absorvida. Essa substância também é absorvida, em menor grau, pela mucosa oral, plexos sublinguais e pele; nesse caso, a absorção pode ser variável e dependente de vários fatores, como temperatura, pH da pele, umidade e higiene pessoal (TRAVIESAS *et al.* 2011).

O câncer é um problema de saúde mundial e representa uma das três principais causas de morte humana, ou seja, juntamente com doença cardíaca isquêmica e acidente de trânsito (NOGUEIRA *et al.*, 2012). A estimativa de câncer de boca como localização primária do desenvolvimento desta doença, para o ano de 2018 no Brasil alcançou 14.700 casos novos e destes, 3,27% no Ceará, ocupando a 8ª posição no *ranking* nacional (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017). A realidade socioeconômica também interfere no quadro do câncer bucal no país, dada a maior incidência em pessoas de baixa renda, carentes de recursos e de informações. A dificuldade de acesso aos serviços básicos de saúde e a falta de hábito no autocuidado tornam essa população mais vulnerável à malignização de lesões ou condições precursoras do câncer bucal (MATOS; ARAUJO, 2003; SILVA *et al.*, 2017). Dessa forma, prevenção e diagnóstico precoce revestem-se de extrema importância, para a limitação desse problema de saúde pública e um melhor prognóstico para o paciente.

O teste do MN, por sua facilidade de implantação e baixo custo, poderia ser utilizado como ferramenta de investigação epidemiológica e genotóxica em indivíduos que têm hábitos nocivos à saúde e pela exposição a fatores ambientais diversos (FARIA e BRAGA, 2015). O procedimento laboratorial para identificação de MN é reprodutível, fácil, barato, preciso e rápido, com resultados finais por coloração citológica obtidos em até 2 horas (ALEXANDRESCU; HAVÂRNEANU; POPA, 2006; SOUTO *et al.*, 2008).

Diante do contexto citado, o estudo teve como objetivo analisar a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal hígida de pacientes fumantes e não fumantes em busca de um método eficaz de rastreamento de alterações citogenéticas subclínicas e de possíveis associações com o consumo de tabaco.



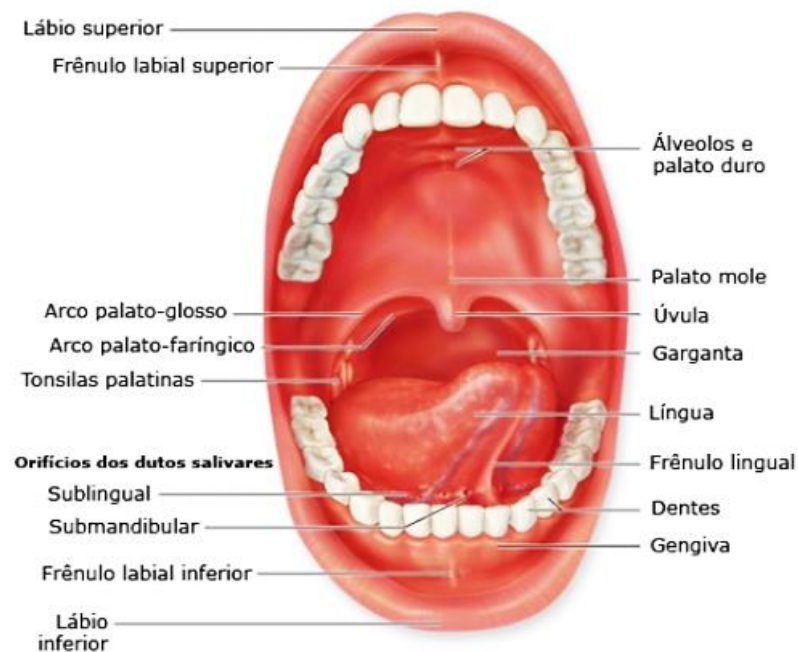
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cavidade oral

A boca é uma cavidade do tipo virtual que é quase inteiramente ocupada pelo órgão lingual e uma cavidade real, a cavidade oral propriamente dita (a região posterior à gengiva e às arcadas dentárias) (BENTES *et al.*, 2016). A cavidade bucal é a porta natural de entrada de alimentos para o organismo e a abertura do sistema digestivo. Além disso, a cavidade oral, juntamente com outros órgãos associados, como os músculos mastigatórios, os complexos da articulação temporomandibular e as glândulas salivares, formam o chamado sistema estomatognático (GÓMEZ; CAMPOS, 2009).

A cavidade oral (FIGURA 1) é limitada anteriormente pelos lábios, posteriormente pelo istmo das fauces, lateralmente pelas bochechas, inferiormente pelo assoalho bucal e superiormente pelo palato duro e pelo palato mole (BENTES *et al.*, 2016). É composta por um conjunto de órgãos associados que desempenham múltiplas funções específicas comuns, como mastigação, deglutição, fonação etc. Alguns desses constituintes são compostos por tecidos duros, como elementos dentários e osso alveolar. Outros são tecidos moles que circundam, sustentam e protegem o primeiro, ou preenchem e lubrificam a cavidade oral (mucosa e glândulas salivares) (GÓMEZ; CAMPOS, 2009).

Figura 1 - Cavidade oral



Fonte: SISTEMA DIGESTIVO HUMANO (2019).

## 2.2 Epitélio bucal

O epitélio bucal constitui uma barreira primária entre o meio oral e os tecidos mais profundos. Ele é um epitélio escamoso estratificado que consiste em células firmemente unidas umas às outras e arranjadas em camadas ou estratos distintos. Assim como a epiderme e o revestimento do trato intestinal, o epitélio bucal mantém sua integridade estrutural pelo processo de renovação celular contínuo, no qual as células são produzidas por divisões mitóticas nas camadas mais profundas e migram para a superfície. Pode-se considerar que as células epiteliais consistem em duas populações funcionais diferentes: uma população progenitora (cuja função é dividir e fornecer novas células) e uma população em maturação (cujas células sofrem continuamente um processo de diferenciação ou maturação, para formar uma camada protetora na superfície) (NANCI, 2013). O Quadro 1 mostra os tipos celulares encontrados no epitélio.

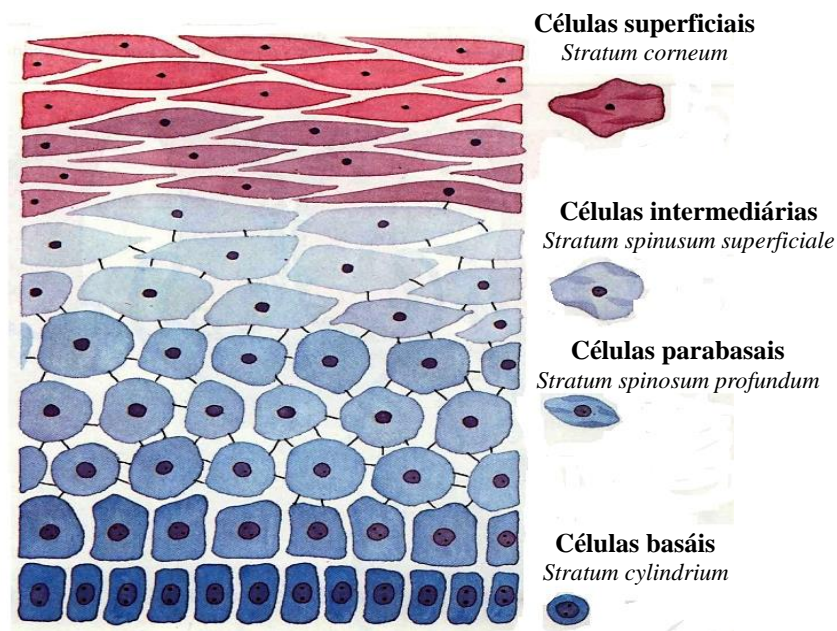
Quadro 1 - Tipos celulares no epitélio.

<b>Camada córnea ou queratinizada</b>	Sem definição de membrana celular ou nuclear, esta camada corresponde ao grande depósito de queratina e células mortas durante a renovação do tecido.
<b>Células superficiais</b>	Células cornificadas; grandes, poligonais e com citoplasma pouco transparente. As mais superficiais sofrem descamação ou se desprendem com o envelhecimento. Estão presentes no estrato granuloso.
<b>Células intermediárias</b>	Células pré-cornificadas, de formato poliédrico, empilhadas, que parecem maiores ou mais volumosas que as células da camada basal por terem maior quantidade de citoplasma. Estão presentes nos estratos espinhoso superficial do epitélio.
<b>Células parabasais</b>	Raramente encontradas em esfregaços bucais. As células menores são ligeiramente ovaladas e as maiores são ovaladas. Estão presentes no estrato espinhoso profundo.
<b>Células basais</b>	São células com pouca capacidade esfoliativa com núcleos centrais e muito grandes em relação ao tamanho da célula, cromatina abundante e finamente granular. Encontra-se em íntimo contato com a membrana basal.

Fonte: adaptado de BATH-BALOGH e FEHRENBACH (2012).

O desenho esquemático da Figura 2 reproduz os queratinócitos, células do epitélio bucal estratificado, com diferentes morfologias e localizações.

Figura 2 - Epitélio estratificado.

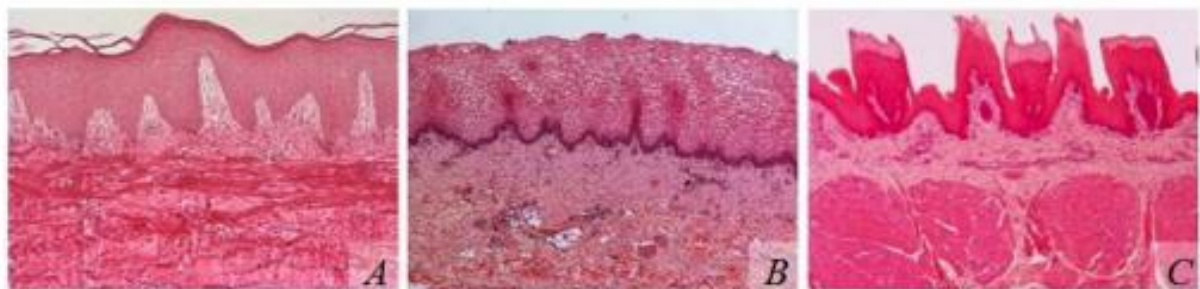


Fonte: adaptado de SESMA (2015).

### 2.3 Mucosa bucal

Os tecidos moles que recobrem a cavidade oral constituem uma membrana chamada mucosa. A mucosa oral está formada por duas camadas de tecido de origens embriológicas distintas: o epitélio e a lâmina própria. O epitélio pode ser do tipo não-queratinizado, paraqueratinizado ou queratinizado e é classificado como estratificado pavimentoso. O tecido conjuntivo que forma a lâmina própria é composto por fibras colágenas, fibroblastos, células de defesa, vasos sanguíneos e nervos. Os dois tecidos interagem por meio das papilas conjuntivas da lâmina própria e as cristas epiteliais que se formam no epitélio sobrejacente (BENTES *et al.*, 2016). A mucosa da cavidade oral pode ser classificada de acordo com sua localização e função: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada (GÓMEZ; CAMPOS, 2009). A Figura 3 evidencia os três padrões de mucosa oral.

Figura 3 - Fotomicrografia dos diferentes tipos de mucosa oral



Fonte: GARBELOTTO (2017). **Legenda:** A: mucosa mastigatória, B: mucosa de revestimento e C: mucosa especializada.

A divisão da mucosa em três grandes grupos está relacionada ao tipo de epitélio que reveste o tecido conjuntivo subjacente. Nas regiões nas quais são maiores os impactos sofridos pela mastigação, a mucosa deve ser mais firme e resistente e, portanto, recoberta por um epitélio que pode variar entre o paraqueratinizado e o ortoqueratinizado. Nas áreas nas quais a demanda mastigatória não é tão grande, o epitélio de revestimento é normalmente bastante fino e composto por células não queratinizadas. A região lingual distingue-se das demais áreas da cavidade bucal por apresentar uma grande quantidade de botões gustativos. Por esta razão, a região do dorso da língua é classificada como mucosa especializada (BENTES *et al.*, 2016).

### ***2.3.1 Mucosa de revestimento***

A mucosa de revestimento aparece principalmente no envolvimento das bochechas, do palato mole, das porções lateral e ventral da língua, dos lábios internos e o assoalho da boca. Ela raramente percebe o impacto direto do ato mastigatório. Portanto, é constituída por epitélio estratificado pavimentoso e não queratinizado. Além disso, abaixo do córion, há outra camada conjuntiva chamada submucosa, o que lhe proporciona uma grande mobilidade (GÓMEZ; CAMPOS, 2009).

### ***2.3.2 Mucosa mastigatória***

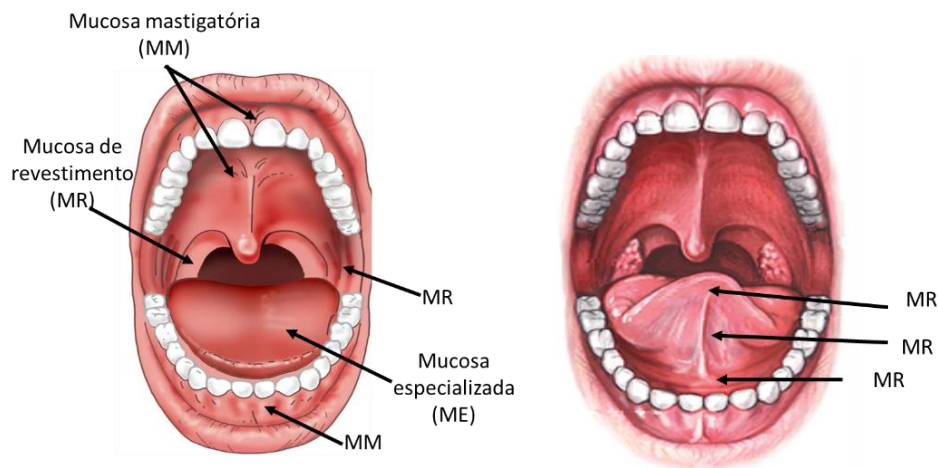
Corresponde à área da gengiva e palato duro. Essa mucosa é a que recebe todo o atrito e forças que são feitas durante a mastigação. Do ponto de vista histológico, a mucosa mastigatória é constituída por epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado ou por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado e o córion pode ser mais ou menos fibroso. A submucosa está ausente e, portanto, está fortemente ligada aos ossos e dentes, além de apresentar a falta de mobilidade (GÓMEZ; CAMPOS, 2009).

### ***2.3.3 Mucosa especializada***

Esta mucosa compreende a superfície dorsal da língua, já que a maioria das papilas linguais possui corpúsculos intraepiteliais ou papilas gustativas. Essas estruturas são responsáveis por receber estímulos para capturar as diferentes sensações gustativas (GÓMEZ; CAMPOS, 2009). As papilas linguais são: filiformes, fungiformes, folhadas e circunvaladas (BALOGH; FEHRENBACH, 2012). A mucosa especializada está associada ao epitélio ortoqueratinizado, que é o tipo menos comum de epitélio encontrado na cavidade oral. Tanto o

epitélio ortoqueratinizado como o não queratinizado possui uma camada basal única, ou estrato basal, onde ocorre a mitose. Essa camada também produz a lâmina basal da membrana basal adjacente (BALOGH; FEHRENBACH, 2012). Conforme migram para a superfície, as células da camada espinhosa perdem a capacidade de sofrer mitose, como ocorre na camada basal mais profunda. A camada espinhosa representa a maior parte do epitélio ortoqueratinizado (BALOGH; FEHRENBACH, 2012). A Figura 4 mostra as diferentes regiões da mucosa oral.

Figura 4 - Variações regionais da mucosa bucal



Fonte: adaptado de LA ROSA-GARCÍA; ANAYA-SAAVEDRA; GODOY-RIVERA (2003).

## 2.4 Câncer

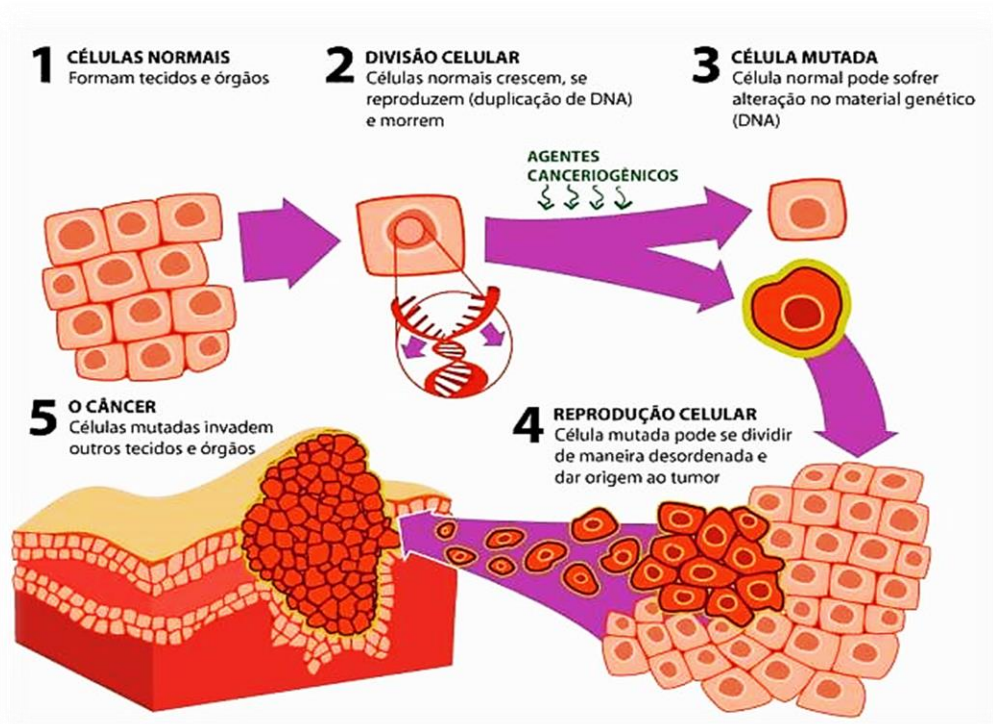
O câncer é considerado uma doença genética que ocorre por um acúmulo de mutações responsáveis por alterar pontos específicos do DNA, podendo afetar os genes supressores tumorais (oncogenes) ou os genes comprometidos com o reparo do DNA (CONTRAN *et al.*, 2000). Na atualidade, o câncer é uma das doenças crônicas prevalentes em todo o mundo e é a segunda principal causa de morte no mundo; em 2015, causou 8,8 milhões de mortes e cerca de 70% das mortes por câncer são registradas em países de média e baixa renda. Os cânceres que causam o maior número anual de mortes são pulmão, fígado, estômago, cólon e mama. (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2018). No Brasil, o câncer ocupa o segundo lugar em mortalidade e foi estimada a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para o ano de 2019. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, ocorrerão 420 mil casos novos de câncer (INCA, 2018).

### 2.4.1 Etiologia do câncer

O câncer não tem uma causa única, há diversos fatores de risco que estão relacionados com câncer, podendo se classificar em fatores endógenos ou exógenos. Os endógenos estão ligados a fatores genéticos e dependem da capacidade de cada organismo em reagir às agressões externas, por isso apresentam grande variabilidade interindividual (RIBEIRO *et al.*, 2003). As causas exógenas representam entre 80-90% dos casos de câncer e estão associadas às mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, ou aos hábitos e costumes próprios de uma população que podem aumentar o risco de diferentes tipos de câncer. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinogênicos. As ações de fatores endógenos e exógenos alteram a estrutura genética do próprio DNA das células (INCA, 2018).

A Figura 5 mostra as etapas do processo das células normais sofrendo alterações, e, conseqüentemente o desenvolvimento do tumor.

Figura 5 – Etapas do processo de desenvolvimento tumoral



Fonte: ROCHA; MARCHETE (2018).

## 2.4.2 Câncer da cavidade oral

O câncer da cavidade oral (também conhecido como câncer de lábio e câncer de boca) é um tumor maligno que afeta lábios, estruturas da boca, como gengivas, bochechas, céu da boca, língua (principalmente as bordas) e a região embaixo da língua. A parte posterior da língua, as tonsilas palatinas e o palato fibroso fazem parte da região chamada orofaringe e seus tumores têm comportamento diferente do câncer da cavidade oral (INCA, 2018).

Embora o câncer da cavidade oral esteja localizado em regiões acessíveis ao exame físico, a maioria dos pacientes é diagnosticada em estágios avançados quando as chances de cura são remotas, o que dificulta o tratamento e piora o prognóstico dos pacientes (SOUSA *et al.*, 2014). Segundo a OMS (2018), para o câncer de lábios e câncer da cavidade oral, o número estimado da incidência de casos e mortes em todo o mundo foi de 297.569 e 146.197 respectivamente, tanto para homens quanto para mulheres.

### 2.4.2.1 Fatores de risco para o câncer oral

Os agentes cancerígenos agem interagindo com o DNA, induzindo mutações genéticas (NIH, 2019). Os fatores de risco para desenvolver o câncer podem ser químicos, físicos, tipo viral, nutricional, por faixa etária ou higiene bucal.

Os carcinógenos químicos podem agir como agentes iniciadores, promotores ou ambos, dependendo das propriedades químicas de cada um ou de seus metabólitos assim como o seu mecanismo de lesão celular. Dentro desse grupo, podem ser citados: nitritos, benzopirenos, asbestos, nitrosoaminas, medicamentos (muitos quimioterápicos e hormônios), além do fumo ou tabaco e do álcool etílico (GONSEBATT, 1997).

La Vecchia *et al.* (1997) consideram que as ingestões excessivas de bebidas alcoólicas em concomitância com o consumo de tabaco podem potencializar o desenvolvimento do câncer da cavidade oral e da faringe. Tais autores também sugerem que o álcool pode atuar como um solvente, facilitando a passagem de carcinógenos, especialmente daqueles presentes no tabaco, através da membrana celular. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2003) classifica o acetaldeído, metabólito principal do etanol, como de efeito mutagênico e carcinogênico.

Os carcinógenos físicos são mais bem representados pelas radiações, que agem como iniciadoras do processo neoplásico, por causarem lesão direta no DNA da célula exposta. A exposição à radiação solar, além de provocar queimaduras na pele, pode provocar alterações

pré-neoplásicas e neoplásicas na mesma, principalmente pela ação dos raios UVB (BARACAT *et al.*, 2000; HIRVONEM, 1995). As radiografias panorâmicas têm sido muito utilizadas na rotina da clínica odontológica como meio auxiliar no diagnóstico de lesões e fraturas faciais, e também como exame complementar de rotina nos tratamentos ortodônticos. Tendo em vista o uso crescente, foram observados níveis aumentados de genotoxicidade (apoptose) e citotoxicidade (necrose) nas células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos submetidos a esse tipo de exame (CERQUEIRA *et al.*, 2004). De acordo com a revisão de Hwang *et al.* (2018), verificou-se que: em estudos de tumores cerebrais, a associação entre exposição dentária a raios-x e meningioma foi estatisticamente significativa em 5 de 7 estudos, em 4 de 5 estudos relacionados com a tireoide, houve correlação significativa com as radiografias de diagnóstico odontológico. Nos estudos das áreas de cabeça e pescoço, os tumores incluíram câncer de laringe, glândula parótida e salivar. Houve também uma correlação estatisticamente significativa entre radiografias da boca completa e câncer de glândula salivar, mas não câncer de glândula parótida.

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é um vírus carcinogênico bem estudado pela literatura e quando associado a outros carcinógenos como fumo e álcool, pode estar relacionado ao aparecimento de lesões benignas, pré-malignas e malignas da cavidade oral. É um vírus de DNA, ubíquo, pertencente à família *Papovaviridae*, epitéliotrópico e que tem como principais sítios de infecção a pele e as mucosas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Além desse vírus, a Organização Mundial da Saúde – OMS (2018) também inclui os vírus da hepatite B e C e vírus da imunodeficiência humana (HIV) como carcinógenos virais. A microbiota também pode estar associada às neoplasias; *Candida albicans* em áreas traumatizadas por próteses mal adaptadas podem predispor a mucosa ao aparecimento do câncer oral e *Helicobacter pylori* associada ao tecido linfóide encontrado em mucosa (MALT) pode favorecer o surgimento de linfoma na boca (JOHNSON, 2001).

As deficiências nutricionais, especialmente vitaminas e minerais, favorecem o aparecimento de câncer da cavidade oral como também em todo o organismo. A condição nutricional mais importante associada ao câncer de boca é a anemia por deficiência de ferro. No déficit de ferro, há uma atrofia da mucosa, que, associada a outros fatores de risco, pode aumentar a atividade mitótica e diminuir a capacidade de reparo epitelial. Além disso, a deficiência nutricional de ferro é acompanhada por deficiências de micronutrientes que favorecem a carcinogênese oral. Pacientes com deficiência de vitamina A são considerados de alto risco de transformação maligna da mucosa da cavidade oral. O papel da vitamina A é



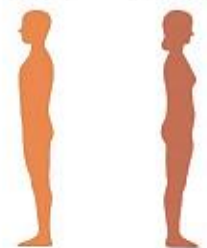
controlar a diferenciação celular e sua deficiência nutricional desencadeia alterações celulares semelhantes às induzidas por agentes cancerígenos químicos (CRUZ *et al.*, 2016).

A idade é um fator importante, pois as pessoas com mais de 45 anos têm maior risco de câncer oral, embora esse tipo de câncer possa se desenvolver em pessoas de qualquer idade (ASCO, 2019). Pessoas cuja higiene bucal ou atendimento odontológico são ruins, podem ter um risco maior de não ser detectado o câncer da cavidade oral em uma fase inicial. A falta de saúde dental ou a irritação constante causada por próteses mal adaptadas, especialmente em pessoas que consomem álcool e produtos de tabaco, podem aumentar o risco de desenvolver câncer oral e orofaringe (ASCO, 2019).

#### 2.4.2.2 Panorama do câncer oral no Brasil

Para o Brasil, estimam-se 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres por ano. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os cânceres (INCA, 2018). A Figura 6 mostra os dados relativos à estimativa de 2018 da incidência de câncer no Brasil para homens e mulheres.

Figura 6 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Côlon e Reto	18.980	9,4%
Côlon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\* Números arredondados para múltiplos de 10.

**Fonte:** INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA, 2018).

No Estado de Ceará, a estimativa para o câncer da cavidade oral é de 480 casos, para os homens 290 casos e entre as mulheres, 190 casos. Na cidade de Fortaleza, a expectativa é que existam 100 novos casos entre os homens e 190 casos entre as mulheres por 100.000 habitantes (INCA, 2018). Dentre as lesões malignas que mais comumente se desenvolvem na cavidade oral, destaca-se o carcinoma epidermóide bucal (CEB). Este, também conhecido como carcinoma de células escamosas, carcinoma escamo celular e carcinoma espinho celular, é uma

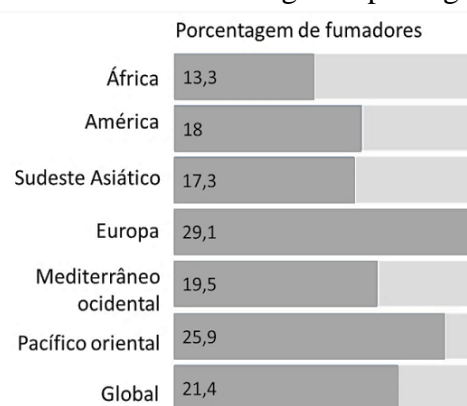
neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento e o seu desenvolvimento está intimamente relacionado ao consumo de fumo e álcool (BRENER *et al.*, 2007).

### 2.4.3 Tabagismo

Como foi mencionado anteriormente, o câncer está associado a vários fatores de risco ambiental e, um dos mais comuns é a exposição ao tabaco (FLORES, 2001). O tabagismo é definido como a dependência do tabaco, causada por um de seus componentes ativos, a nicotina. O mecanismo de ação dessa substância não é apenas estimular o sistema nervoso central, mas condicionar o abuso de seu consumo; a nicotina sozinha não é cancerígena, mas viciante (SZYMAŃSKA *et al.*, 2011; MARANDAS P. e MARANDAS N, 2005).

O uso do tabaco tem sido correlacionado com o câncer de cavidade oral, laringe, pulmão, bexiga e esôfago em muitos estudos epidemiológicos (Flores, 2001). O tabaco industrializado contém uma grande quantidade de mutagênicos e carcinógenos, caracterizando-os como um agente cancerígeno completo, atuando tanto na iniciação como na promoção e progressão tumoral. Fora a nicotina, já foram identificadas mais de 4.700 substâncias diferentes na composição do cigarro (SBMFC, 2019). Dentre elas, se destacam os hidrocarbonetos aromáticos, o benzopireno e as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNs): nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopirrollidina (NPYR), nitrosodimetilamina (NDMA), e 4-(methylnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (JOHNSON, 2001), fósforo P<sub>4</sub>/P<sub>6</sub>, monóxido de carbono presente na fumaça do cigarro e alcatrão (SBMFC, 2019). A Figura 7 mostra a porcentagem da média de incidência geral de fumantes no mundo e por continentes, onde a América exibe porcentagem aquém da média global.

Figura 7 - Incidência do tabagismo por regiões - 2015.



Fonte: adaptado de LINDE (2019).

A Figura 8 exibe a incidência específica nos países de América Latina, onde o Brasil apresenta 14% da sua população geral fumante, em maiorias homens.

Figura 8- Incidência do tabagismo em América Latina - 2016.

País latino-americano	Taxa de fumantes	Homens	Mulheres
13. Bolívia	38,9%	67,3%	10,5%
15. Chile	37,9%	41,5%	34,2%
20. Cuba	35,2%	53,3%	17,1%
75. Argentina	22%	27,7%	16,2%
99. Jamaica	17%	28,6%	5,3%
100. Uruguay	17%	19,9%	14%
114. México	14,2%	21,4%	6,9%
115. Brasil	14%	17,9%	10,1%
119 República Dominicana	13,8%	19,1%	8,5%
122. Paraguay	13,3%	21,6%	5%
124. Haití	13%	23,1%	2,9%
129. Costa Rica	11,9%	17,4%	6,4%
134. El Salvador	10,7%	18,8%	2,5%
138. Colombia	9,1%	13,5%	4,7%
146. Ecuador	7,2%	12,3%	2%
148. Panamá	6,2%	9,9%	2,4

**Fonte:** ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2016).

Existem dois tipos de tabagismo, o ativo e o passivo. O ativo é caracterizado pelo uso direto de derivados do tabaco. O passivo é a inalação da fumaça de derivados do tabaco, tais como cigarro, charuto, cigarrilhas, cachimbo, narguilé e outros produtores de fumaça, por indivíduos não fumantes, que convivem com fumantes em ambientes fechados respirando as mesmas substâncias tóxicas que o fumante inala (INCA, 2018).

A fumaça emitida do cigarro se difunde homoganeamente no ambiente, contém em média três vezes mais nicotina, três vezes mais monóxido de carbono e até 50 vezes mais substâncias cancerígenas do que a fumaça que o fumante inala. A exposição involuntária à fumaça do tabaco pode acarretar desde reações alérgicas (rinite, tosse, conjuntivite, exacerbação de asma) em curto período, até infarto agudo do miocárdio, câncer do pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema pulmonar e bronquite crônica) em adultos expostos por longos períodos. Em crianças, aumenta o número de infecções respiratórias (INCA, 2018).

Outro agravante em relação ao uso do cigarro é que a ação mecânica produzida pelo atrito com a mucosa somado a agressão térmica devido às altas temperaturas da fumaça aspirada pela boca e pelas vias aéreas provoca inúmeras alterações na mucosa bucal como ressecamento,

mudanças no pH, alterações das respostas imunológicas e alterações da resistência às infecções fúngicas e virais; alterações do epitélio como as leucoplasias, eritroplasias, hiperqueratoses; doença periodontal (aumento de placa e depósitos de cálculos, isquemia e inflamação gengival, bolsa periodontal, recessão gengival e perda óssea); cáries de raiz; alterações gustativas; halitose; manchas nos dentes e nas restaurações e peri-implantites (SHAM *et al.*, 2003; MASHERBERG *et al.*, 1993; KAUGARS *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1989).

Embora o cigarro manufacturado ainda seja a forma mais utilizada do tabaco, inúmeras outras formas são utilizadas variando de acordo com os hábitos culturais de cada país (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2005).

#### 2.4.3.1 *Efeitos citotóxicos do tabaco*

O tabaco tem muitas substâncias citotóxicas presentes em sua composição (nitrogênio, acetaldeído, acroleína, cianidro, nicotina, etc.). Estas substâncias têm um potencial tóxico para alterar algumas funções teciduais, em consequência de sua disseminação por via hematogênica, por sua rápida absorção pelos tecidos moles da cavidade bucal e pela propriedade de adesão às superfícies dentárias. Este efeito citotóxico sobre as células e estruturas dos tecidos do periodonto reduz o potencial de reparo desses tecidos. Em geral, a maioria dos pesquisadores tem concluído que os pacientes fumantes apresentam uma resposta tecidual clinicamente menos favoráveis após diferentes formas de tratamento (MARTINEZ *et al.*, 2002).

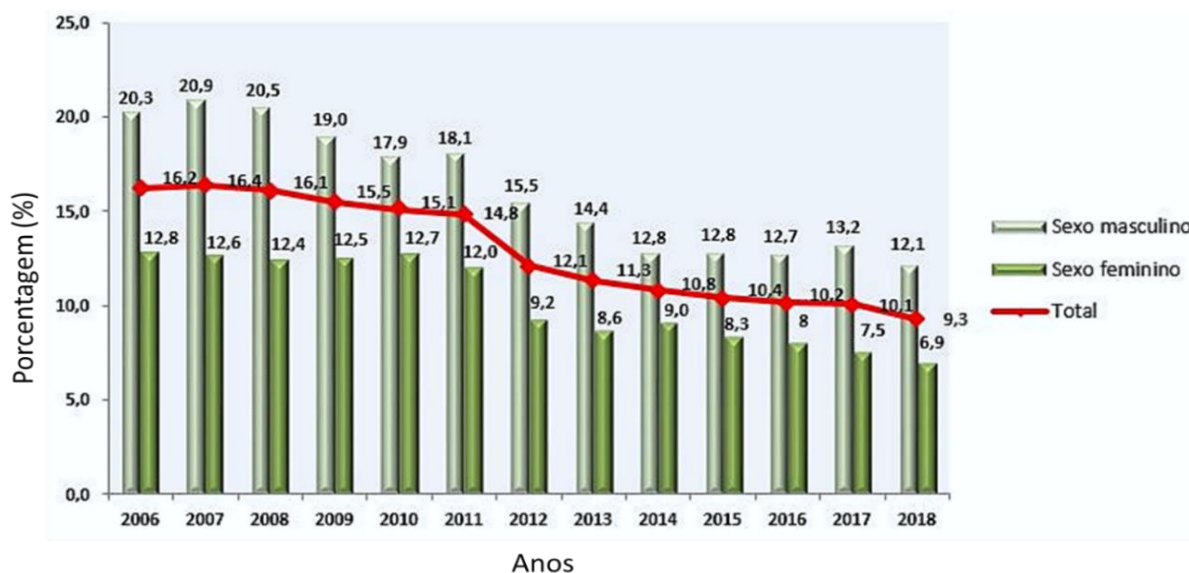
Por outro lado, a nicotina e seu metabólito, a cotinina, estão presentes na saliva e no líquido gengival e podem ser usadas como marcadores bioquímicos de exposição à fumaça do cigarro (ROSEMBERG, 2003). Essas informações podem ser marcadoras de dependência e maior absorção de nicotina entre fumantes. (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

#### 2.4.3.2 *O tabagismo no Brasil*

A prevalência de tabagismo é o resultado da iniciação (novos usuários de tabaco) e da interrupção do consumo (por cessação do tabagismo ou morte). No Brasil, o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) revelou que a queda de uso do tabaco é significativa em pessoas de 18 a 24 anos de idade (12% em 2006 e 6,7%, em 2018), 35 e 44 anos (18,5% em 2006 e 9,1% em 2018) e entre 45 a 54 anos (22,6% em 2006 e 11,1% em 2018). As mulheres, no ano 2018, se

destacaram por serem as que menos fumaram, com índice de 6,9%, quase a metade dos homens, com 12,1%, em tal sentido várias rotas de pesquisa mostram que homens e mulheres diferem em seu comportamento de fumar (NIH). A Figura 9 demonstra no período de 2006 a 2018 a queda de prevalência de tabagismo em adultos em números totais e por sexo.

Figura 9 - Distribuição dos fumantes no período de 2006 a 2018.



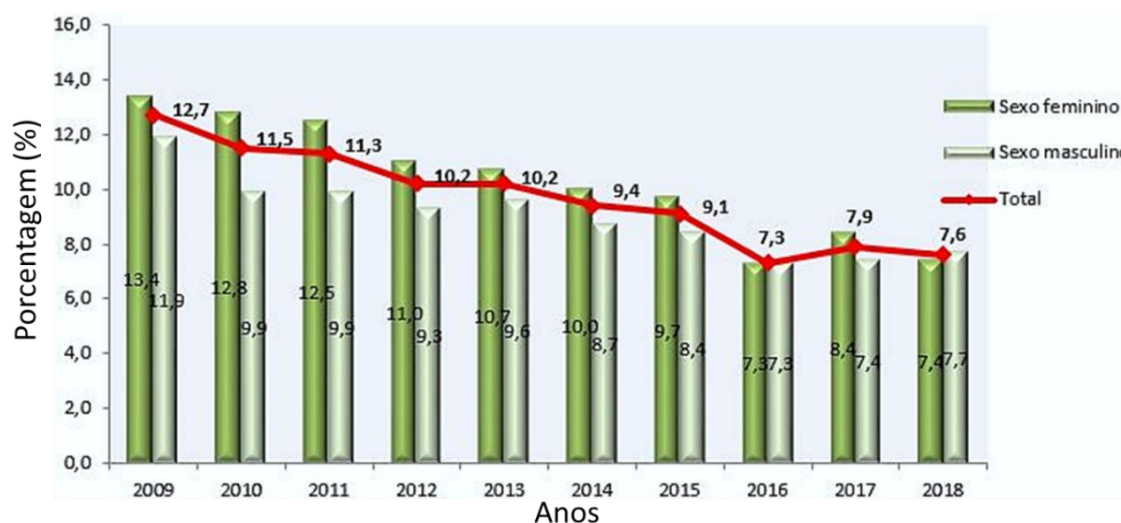
**Fonte:** SISTEMA DE VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (VIGITEL, 2019).

Quando analisado o fator etário, a menor prevalência de tabagismo foi entre aqueles com 65 anos ou mais (6,1%) e em jovens de 18 a 24 anos (6,7%). A maior prevalência foi registrada naqueles com idade entre 55 a 64 anos, em que o índice é igual a 12,3%. (VIGITEL, 2019).

Segundo dados do VIGITEL (2019), na capital do Estado de Ceará, Fortaleza (Região Nordeste do Brasil), 5,7% da população afirmou ter o hábito de fumar, onde 708 foram homens e 1.367 mulheres.

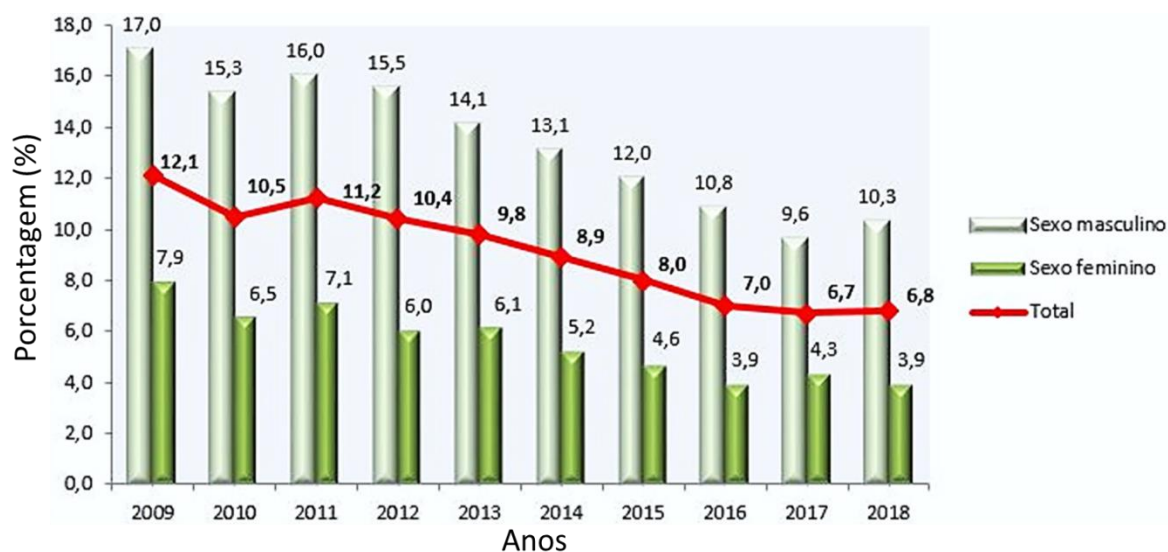
Dados numéricos do VIGITEL (2019), com a população acima de 18 anos em 26 capitais brasileiras e Distrito Federal, mostraram um percentual médio de fumantes passivos em domicílio de 7,6%, sendo 7,4% mulheres e 7,7% homens (FIGURA 10). A frequência média de fumantes passivos no local de trabalho foi de 6,8%, sendo maior em homens (10,3%) do que em mulheres (3,9%) (FIGURA 11). Entre os anos 2009 e 2018, os percentuais totais, em homens e mulheres, reduziram tanto em domicílio quanto em ambiente de trabalho (FIGURAS 10, 11).

Figura 10 - Fumantes passivos em domicílio por sexo, no período 2009-2018.



Fonte: SISTEMA DE VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (VIGITEL, 2019).

Figura 11- Fumantes passivos no local de trabalho por sexo, no período 2009-2018.

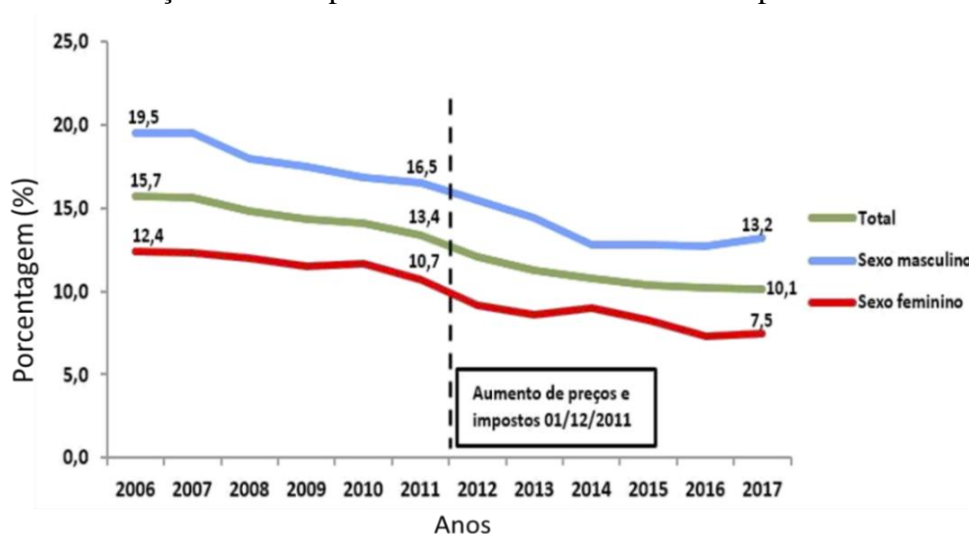


Fonte: SISTEMA DE VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (VIGITEL, 2019).

O Brasil é membro da Convenção-Quadro da OMS para o Controle do Tabaco (CQCT/OMS), que é um tratado internacional de saúde pública (INCA, 2019). O cumprimento das próprias obrigações legais do Estado Brasileiro (Lei 12.546/2011) alterou a sistemática de tributação e preços para os cigarros, o que impactou negativamente no seu consumo (VIGITEL, 2019).

A Figura 12 mostra a variação anual da prevalência de fumantes antes e após a Lei 12.546/2011, entre os anos de 2006 a 2017.

Figura 12 - Variação anual da prevalência de fumantes antes e após da Lei 12.546/2011.



Fonte: MINISTERIO DA SAUDE (2017).

## 2.5 Micronúcleos

Micronúcleos podem se formar durante a divisão celular de qualquer tipo de célula. Um micronúcleo (MN) é um pequeno núcleo adicional facilmente identificável por microscopia óptica (QUADRO 2). Ele está localizado ao redor do núcleo principal na metade interna do citoplasma, exceto nas células do anel de vedação ou nas células cheias de mucina, onde pode ser visto na periferia da célula. A textura da cromatina e a intensidade da coloração do MN são semelhantes ao núcleo principal. O diâmetro do micronúcleo é inferior a 1/3 do diâmetro do núcleo principal e, portanto, pode ser facilmente distinguido de uma célula binucleada. Também é diferente de uma célula *broken egg*, uma vez que não tem conexão com o núcleo principal. O micronúcleo deve sempre ser diferenciado dos depósitos de coloração, bactérias, pós nucleares, fragmentos citoplasmáticos agrupados, cariorrexe parcial ou núcleo necrótico, fragmentos nucleares sobrepostos de outras células e grânulos de querato-hialina (FENECH *et al.*, 2003).

Quadro 2 - Morfologia de Micronúcleos.

<b>Localização</b>	Intracitoplasmática perto do núcleo principal; geralmente dentro da metade interna do citoplasma. Se o núcleo principal é oval ou fino, o MN geralmente está próximo de uma extremidade. O MN é sempre separado do núcleo principal.
<b>Tamanho</b>	1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal
<b>Coloração</b>	Geralmente a mesma intensidade ou de mais intensidade com o núcleo principal. Ocasionalmente mais pálido.
<b>Textura</b>	Igual ao núcleo principal. Pode ser mais amontoadado. O perímetro é suave, sugerindo uma membrana. Não refratário.
<b>Forma</b>	Principalmente oval ou redondo; pode ser piramidal, hemisférica, elíptica, cilíndrica ou muito raramente irregular.
<b>Número</b>	Geralmente ocorre isoladamente em uma célula. Ocasionalmente, o dobro, especialmente em casos de HSIL (Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau) e IC (carcinoma invasivo). Triplo ou mais, não visto ou raro.
<b>Outros</b>	O plano de foco coincide ou quase o mesmo que o núcleo principal.
<b>Células de ocorrência</b>	Visto nas células de aparência benigna, bem como célula maligna ou displásica.
<b>Mimetizadores</b>	Depósitos de coloração, bactérias, pós nucleares, fragmentos citoplasmáticos agrupados, carioréxes parciais, núcleo necrótico, fragmentos nucleares sobrepostos de outras células.

Fonte: adaptado de SAMANTA, S.; DEY, P. (2012).

### 2.5.1 Teorias de origem do micronúcleo

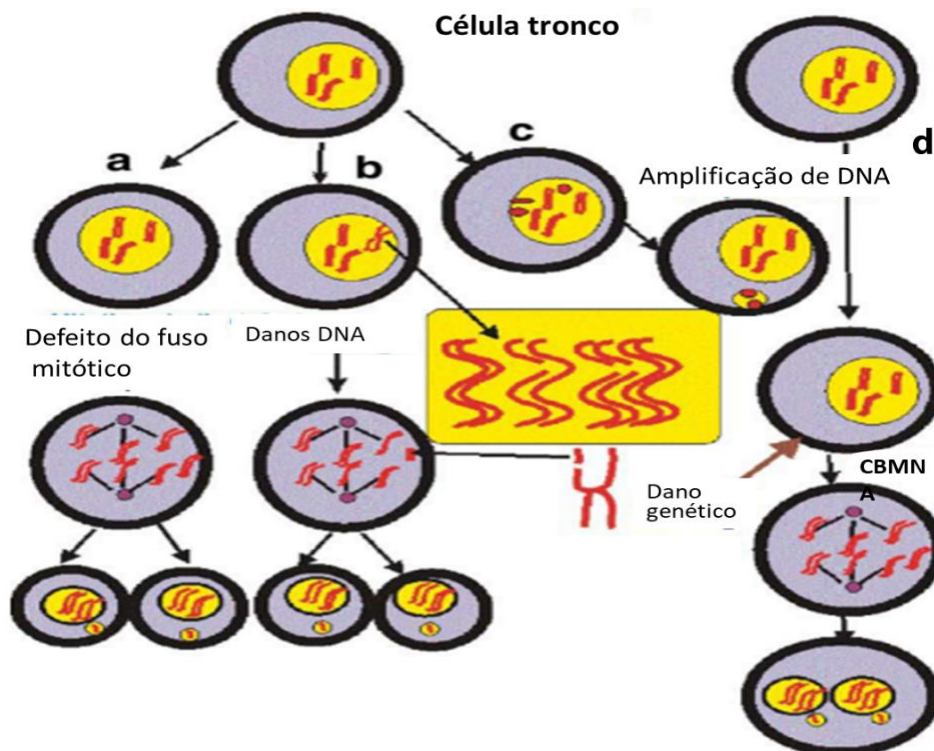
Existem dois mecanismos predominantes que levam à formação de micronúcleos em uma célula mitótica: (1) quebra cromossômica e (2) disfunção do aparelho mitótico. Clastógenos induzem quebras cromossômicas e produzem fragmentos acentrados. Esses fragmentos cromossômicos são incluídos diretamente nos micronúcleos (FALCK *et al.*, 2002; FORD *et al.*, 1988).

No outro mecanismo, agentes aneugênicos impedem a formação do aparelho do fuso durante a mitose. Como resultado, os cromossomos inteiros ficam para trás na anáfase. O cromossomo é cercado pelo envelope nuclear, formando micronúcleos. Portanto, as células filhas têm micronúcleos contendo cromossomos inteiros (CIMINI *et al.*, 2002).

O desenho esquemático da Figura 13 sumariza a série de eventos celulares clastogênicos ou aneugênicos.



Figura 13 – Demonstração de diferentes formas de formação de micronúcleos; (a) Defeito do fuso mitótico, (b) Quebra de DNA, (c) DNA cromossômico extra (d) Amplificação de DNA.



Fonte: adaptado de SAMANTA, S.; DEY, P. (2012).

Além desses dois importantes mecanismos, o micronúcleo pode ser formado devido a pontes anafásicas quebradas. Isso pode ser devido a cromátides dicêntricas, anel cromossômico mesclado ou união de cromátides irmãs (SAUNDERS *et al.*, 2000). O micronúcleo nem sempre pode representar a perda de material cromossômico, pois também pode ser formado devido à amplificação do DNA. Estruturas extra cromossômicas autenticamente replicadas e acêntricas são formadas durante a amplificação do oncogene em tumores humanos. Isso é conhecido como cromossomo de minuto duplo (DM). Foi demonstrado que esse cromossomo DM é removido do núcleo por um novo mecanismo de micro nucleação iniciado pela brotação da membrana nuclear durante a fase S (FISHER *et al.*, 2010; SHIMIZU *et al.*, 1998).

A quebra de fitas duplas de DNA é um fenômeno fisiológico quando uma célula se compromete de G0 a G1 do ciclo celular e pode ocorrer em células saudáveis normais. Portanto, o micronúcleo também pode ser observado em indivíduos saudáveis normais, mas o número de células micronucleadas pode ser menor (PICKERING e KOWALIK, 2006; BARTKOVA *et al.*, 2005).

Outras alterações nucleares chamadas de metanucleares podem ser identificadas quando se estuda micronúcleos. Tolbert; Shy e Allen (1992) propuseram que as mesmas também

fossem levadas em conta na medida em que representam diferentes fenômenos celulares degenerativos e/ou adaptativos próprios do tecido epitelial. Esses fenômenos sofrem influência de processos inflamatórios, do processo de reparo e até mesmo da intensidade da raspagem. Essas alterações, às vezes, se assemelham morfológicamente aos micronúcleos, e não as considerar poderia levar a interpretações incorretas no diagnóstico geral (SARTO *et al.*, 1987; TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992; CASARTELLI *et al.*, 2000).

Dentre as alterações genotóxicas diferenciais, a cromatina condensada ou núcleo picnótico é caracterizada pelo aumento de intensidade da coloração do núcleo e redução de volume respectivamente, fenômenos próprios da diferenciação e maturação epitelial, processo que culmina com a morte celular e descamação, que pode aumentar frente à injúria celular, como a resultante do trauma crônico ou consumo de fumo. Células binucleadas, apresentando dois núcleos, provavelmente não estão relacionadas às alterações do DNA, mas parecem estar envolvidas com atraso da divisão celular. A cariorrexe ou fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto é uma das etapas da morte celular, seja por apoptose, seja por necrose. A cariólise consiste na dissolução do núcleo caracterizada pela sua ausência, também constituindo uma etapa do processo de morte celular por necrose. “*Broken egg*” (BE) ou brotos nucleares são corpos arredondados de coloração semelhante à do núcleo, lembrando um MN, porém mantendo-se ligados ao núcleo por um filamento de cromatina (CARRAD *et al.*, 2007).

### **2.5.2 Causas da formação de micronúcleos**

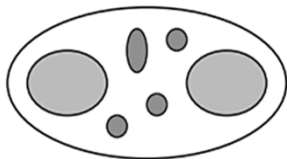
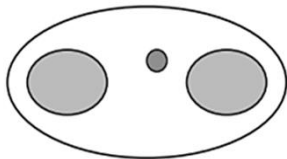
Há um grande número de causas da formação de micronúcleos. Isso pode ser observado espontaneamente no indivíduo saudável normal devido à exposição a poluentes ambientais, radiação, materiais de risco biológico, drogas, outros produtos químicos venenosos, hábitos alimentares, consumo não-alimentar (tabagismo e etilismo) e lesões por radicais livres. As outras causas da formação de micronúcleos são inflamação crônica de longa data, envenenamento por metais pesados, quimioterapia, lesões por radiação e várias condições pré-neoplásicas e neoplásicas. Além disso, um grande número de doenças genéticas, infecções e deficiência nutricional também são responsáveis pela formação de micronúcleos. Danos diretos no DNA ou quebra, aberrações cromossômicas, disfunções do aparelho mitótico e interferência na síntese do DNA são as possíveis explicações da formação de micronúcleos (SWAPAN e PRANAB, 2010).

### 2.5.3 Fatores de variabilidade

Existem vários fatores que podem influenciar a frequência de MN. A idade tem sido amplamente estudada, com a idade avançada sendo associada a uma maior taxa de micronúcleos (ZALACAIN *et al.*, 2005).

No caso da análise de gênero, as mulheres têm uma frequência basal mais alta que os homens e o número de micronúcleos aumentam quando eles têm mais de 35 anos de idade. A presença de homocisteína no plasma, deficiência de folato e vitamina B12 leva a um aumento na frequência basal de micronúcleo (QUADRO 3). No caso das mulheres, a entrada na menopausa e o possível desenvolvimento da osteoporose estão relacionados a uma maior taxa de micronúcleos. Outros estudos relacionam uma diminuição no número de micronúcleos suplementando a dieta com agentes antioxidantes, como vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, ginseng e até infusões de chá (ZALACAIN *et al.*, 2005).

Quadro 3 - Resumo dos fatores que modificam o número de micronúcleos em culturas de células humanas.

<p><b>Aumentar o número de micronúcleos %</b></p> 	<p>Idade [<math>&gt;</math> idade] MN %</p> <p>Sexo (<math>\text{♀} &gt; \text{♂}</math>)</p> <p>Presença de homocisteína plasmática</p> <p>Déficit de folato e vitamina B12</p> <p>Processos fisiológicos (menopausa e osteoporose)</p> <p>Medicamentos citostáticos (tratamentos antitumorais)</p> <p>Álcool</p> <p>Exposição diária a agentes tóxicos</p>
<p><b>Reduzir o número de micronúcleos %</b></p> 	<p>Agentes antioxidantes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamina E e C</li> <li>• <math>\beta</math>-caroteno</li> <li>• infusões de ginseng e chá</li> </ul>

Fonte: adaptado de ZALACAIN; SIERRA SESUMAGA; PATIÑO (2005).

### 2.5.4 Utilização do teste de micronúcleo

O estudo histórico que desenvolveu o procedimento original de teste de micronúcleo foi realizado pelos pesquisadores Von Ledebur e Schmid em 1973 *in vivo* em medula óssea de roedores. Os autores estudaram os micronúcleos em eritrócitos jovens com a finalidade de avaliar danos citogenéticos (HEDDLE *et al.*, 1983; RABELLO-GAY, 1991).

No mesmo ano, Countryman e Heddle mudaram o procedimento original proposto por Schmid e colaboradores. Neste novo procedimento, os micronúcleos eram produzidos *in vitro*

em cultura de linfócitos, tentando medir a normalidade cromossômica. Assim, estabeleceram que os micronúcleos são capazes de indicar dano cromossômico e que por isso o teste é potencialmente sensível para monitoramento biológico de danos ao DNA (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

O teste de micronúcleos (MNs) pode ser realizado *in vitro* ou *in vivo* em vários modelos eucariontes que incluem tanto plantas como animais. Em humanos, a avaliação pode ser realizada em células esfoliadas de epitélios, mas as culturas de sangue entérico ou linfócitos associados são os sistemas mais utilizados (MÜLLER e STREFFER, 1994).

#### 2.5.4.1 *Micronúcleos em células esfoliadas*

Micronúcleos detectados em células epiteliais esfoliadas refletem alterações cromossômicas e/ou cromatídicas, ou irregularidades mitóticas que ocorrem nas células da camada basal em proliferação. Os micronúcleos detectados nestas células de superfície epitelial se originaram em células da camada basal em divisão que, quando atingem a camada superficial, são esfoliadas. A análise dos micronúcleos pode ser feita em células obtidas a partir da mucosa bucal, bexiga e ureter, cérvix uterino, brônquios e mucosa nasal. A mucosa bucal permite a coleta de um grande número de células esfoliadas viáveis para a análise e a obtenção das mesmas é um processo simples e bem tolerado pelos indivíduos, sendo útil no monitoramento biológico de grupos de pessoas expostas a genotóxicos. Nesse caminho, a coleta por raspagem e análise de células de mucosa bucal podem ser realizadas para ajudar no diagnóstico de indivíduos com alto risco de câncer oral (AGOSTINI, 1993).

#### 2.5.4.2 *Citopatologia esfoliativa convencional*

A citologia esfoliativa pode ser definida como o estudo morfológico e morfométrico de células descamadas da mucosa, principalmente suprabasais, por meio de microscópio óptico (MACCLUSKEY e OGDEN, 2000).

Cuidados na coleta, na fixação e no processamento são fundamentais a fim de garantir resultados satisfatórios para o diagnóstico de lesões bucais, dando qualidade ao esfregaço e evitando a deterioração das células. A coleta do material na citologia esfoliativa convencional envolve a raspagem da superfície da lesão com uma espátula ou escova, com posterior esfregaço desta sobre uma lâmina de vidro. O material é fixado à lâmina, utilizando-se álcool 95° ou uma solução álcool/éter 1:1 (SCHEIFELE *et al.*, 2004).

Tais células podem receber a coloração Papanicolaou ou a do ácido periódico de Schiff (PAS), que possibilitam a visualização de células malignas, doenças virais ou fúngicas. A sobreposição celular no esfregaço pode ser um problema do processamento do material, causada pelo excesso de saliva sobre a lesão no momento da coleta (MARTINS *et al.*, 2005).

Dessa forma, o esfregaço citológico ideal é aquele que possui uma quantidade adequada de células, distribuição uniforme da amostra ao longo da lâmina, número reduzido de artefatos e debris de tecido (tecidos mortos ou danificados) e boa fixação (ANSCHAU e GONÇALVEZ, 2006).

### 2.5.5 Vantagens e desvantagens do teste para micronúcleos

O estudo dos micronúcleos da mucosa oral é relativamente simples; uma síntese das vantagens e desvantagens acerca do teste de micronúcleos se mostra no Quadro 4.

Quadro 4 - Síntese de vantagens e desvantagens do teste para micronúcleos.

Vantagens	Desvantagens
Os micronúcleos podem ser observados em células interfásicas.	Os micronúcleos só aparecem quando a célula alvo se divide e é inteiramente dependente da divisão celular.
São facilmente reconhecidos.	Não detecta não-disjunção mitótica, quando não há perdas de cromossomos na anáfase.
O tempo de coleta é menos crítico, pois os micronúcleos formados durante a divisão celular persistem pelo menos através da próxima interfase.	Aberrações que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos acêntricos, tais como translocações ou inversões, não são detectadas.
A frequência espontânea é baixa.	Somente com a frequência de micronúcleos, é difícil distinguir os efeitos clastogênicos daqueles que resultam da perda cromossômica por lesão do fuso.
É um teste claro, que mesmo necessitando de interpretação é menos laborioso que outros testes como o de troca de cromátides irmãs.	
Detecta a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos.	

Fonte: adaptado de HEDDLE *et al.*, 1983.

## 2.6 Biomarcadores para detecção do câncer de boca

Pode haver uma relação entre alterações no nível molecular e no nível tecidual que levam a modificações malignas no tecido, atuando assim na progressão da doença. Desta forma, pode-se inferir que o estudo das moléculas biológicas envolvidas em tais processos venha fornecer dados valiosos para seu diagnóstico, atuando como biomarcadores (SANTOS *et al.*, 2016).

Biomarcadores são moléculas cruciais na distinção entre presença ou ausência de doenças e podem ser usados como importantes ferramentas de triagem para um diagnóstico precoce do câncer, agilizando o processo de tratamento, dando mais chances aos indivíduos acometidos. Além disto, biomarcadores podem ser usados para identificar alvos terapêuticos, bem como, mensurar a eficácia da terapia e seu prognóstico e potencial recorrente em pacientes com câncer bucal pós tratamento, seja este cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico (SANTOS *et al.*, 2016).

Um bom candidato para biomarcador pode ser identificado por várias abordagens, como a identificação da célula tumoral, microambiente tumoral, tecido adjacente ao tumor ou pelo metabolismo de agentes farmacêuticos e terapêuticos. Entender a biologia do câncer é, portanto, crucial na escolha do melhor biomarcador (SANTOS *et al.*, 2016).

Os biomarcadores genômicos baseiam-se na análise de alterações na expressão ou sequência de genes, juntamente com o estudo de modificações epigenéticas, para encontrar essas diferenças entre indivíduos saudáveis ou de controle e indivíduos afetados pela patologia (RUIZ; VEJA, 2010).

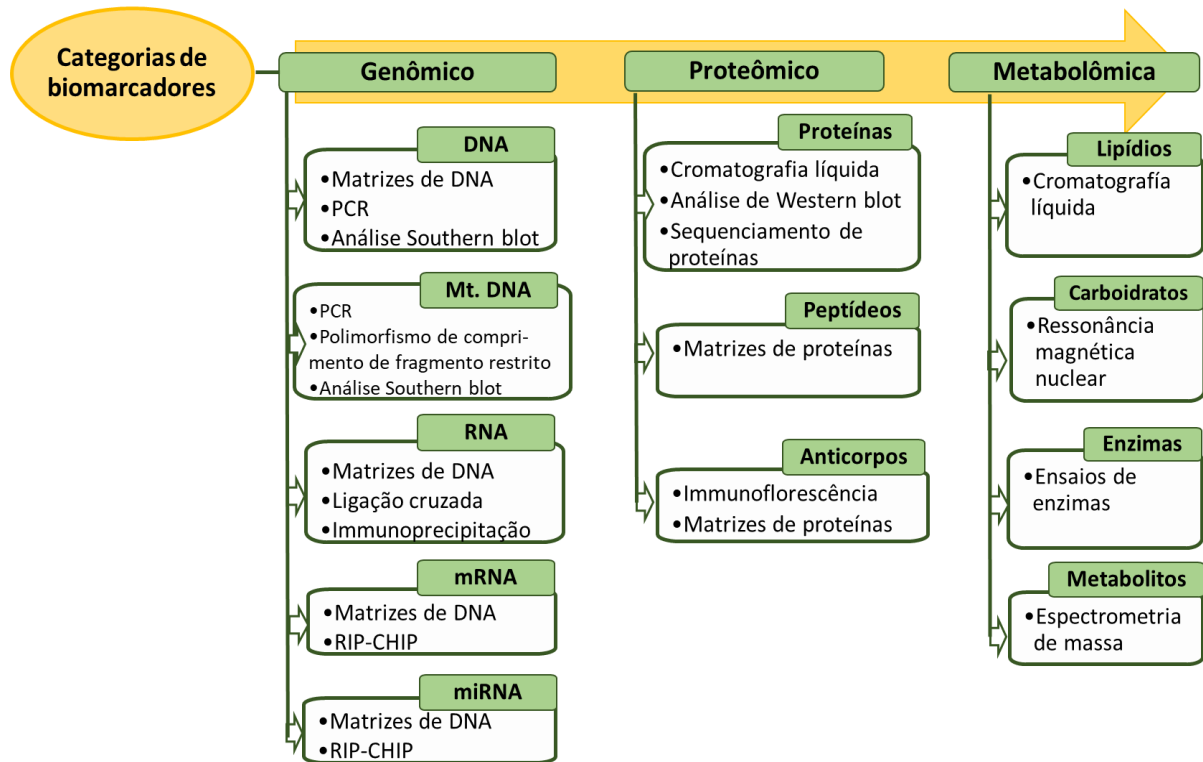
A proteômica tem como objetivo estudar o conjunto de proteínas que são expressas num determinado momento e sob condições específicas nas células, tecidos ou órgãos. Este conjunto de proteínas que são expressas na célula é chamado de proteoma. As modificações pós-traducionais das proteínas podem ser uma fonte de biomarcadores proteômicos para diferentes patologias (RUIZ; VEJA, 2010).

A metabolabômica estuda os metabólitos ou o que é o mesmo, os produtos e subprodutos das reações bioquímicas que se desenvolvem continuamente em cada célula do corpo humano. O metaboloma representa uma fotografia do conjunto de metabólitos presentes na célula sob certas condições, pois incorpora o efeito ambiental, dieta ou estilo de vida do paciente em estudo. Os biomarcadores metabólicos associados a patologias específicas comparam os metabólitos característicos dos estados fisiológicos normais e patológicos (RUIZ; VEJA, 2010).

Os biomarcadores salivares sugerem uma abordagem muito promissora além de ser um método não invasivo para detecção do câncer bucal, assim como no monitoramento do processo da doença (SANTOS *et al.*, 2016).

A Figura 14 mostra os diferentes biomarcadores usados para a detecção de câncer oral e outros tipos de câncer.

Figura 14 – Biomarcadores que ajudam na detecção de câncer oral e outros cânceres



Fonte: adaptado de SANTOS *et al.*, 2016

### 3 JUSTIFICATIVA

Em a maioria dos casos de câncer, entre eles o câncer oral, as causas exógenas são as mais relevantes (entre 80-90%) e estão fortemente associadas às modificações no meio ambiente pelo ser humano, ou aos hábitos próprios das pessoas. Nesta perspectiva, é importante tomar medidas preventivas.

A detecção subclínica de alterações citopáticas em células esfoliadas da mucosa bucal em diferentes sítios da cavidade oral poderia contribuir positivamente para um diagnóstico precoce de lesões ainda sem aparência macroscópica ou clínica, contribuindo assim para o tratamento, monitoramento e melhora da qualidade de vida de pacientes com hábito tabágico.

Sob o ponto de vista biotecnológico, a avaliação citomorfométrica de micronúcleos poderia representar uma técnica eficaz na biomarcação de genotoxicidade, corroborando a validade da citopatologia em exames iniciais e de acompanhamento em pacientes com fatores de risco associados ao câncer de boca.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Analisar a frequência de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa bucal hígida em pacientes fumantes e não fumantes.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Determinar a frequência de células micronucleadas em pacientes fumantes e não fumantes, considerando regiões anatômicas (mucosa jugal, borda lateral de língua e assoalho de boca) e fatores demográficos (sexo e faixa etária);
- b) Determinar a frequência de número de micronúcleos por célula em pacientes fumantes e não fumantes, considerando regiões anatômicas (mucosa jugal, borda lateral de língua e assoalho de boca) e fatores demográficos (sexo e faixa etária);

## 5 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO FORMATADO

### AVALIAÇÃO SUBCLÍNICA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL EM FUMANTES E NÃO FUMANTES

#### SUBCLINICAL EVALUATION OF MICRONUCLEUS IN MUCOSA BUCAL CELLS IN SMOKERS AND NON-SMOKERS

Haydee Gina Quispe Jiménez<sup>1,2</sup>, Rômulo Melo Mesquita<sup>1</sup>, Victor Bento Oliveira<sup>3</sup>, Ana Larissa de Queiroz França<sup>3</sup>, Marcelo Miranda de Melo<sup>1</sup>, Ana Liza Paz Sousa Batista<sup>1</sup>, Igor Iuco Castro Silva<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE.

<sup>2</sup>Laboratório de Biomateriais, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE.

<sup>3</sup>Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE.

#### \*Autor de correspondência

Endereço: Universidade Federal do Ceará, Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 100 - Bloco de laboratórios da pós-graduação / Laboratório de Biomateriais. Jocely Dantas de Andrade Torres, Sobral, CE, Brasil, CEP: 62042-280. E-mail: igor.iuco@sobral.ufc.br

#### ABSTRACT

**Introduction:** The oral mucosa when exposed to carcinogens, especially tobacco, becomes susceptible to cell damage due to the reactive metabolites generated. Micronuclei are indicative of DNA damage and contribute to the tracking and understanding of the etiopathogenesis of subclinical lesions. **Objective:** To determine the frequency of micronuclei (MNs) in the epithelial cells of the healthy oral mucosa in smoking and non-smoking patients. **Methods:** 16 patients of both sexes, separated into two groups (G1: smokers and G2: non-smokers), were compared using the micronucleus test on exfoliated cells of the oral mucosa of three anatomical regions (inner cheek mucosa, lateral edge of tongue and floor of the mouth). After Papanicolaou staining, micronucleated cells (MNC) were counted. **Results:** The amount of MNC in G1 was 50.53% higher than in G2. Between G1 and G2, in females, there was an increase of 72,38% in MNC. In the range of 50-60 years of G1 there was a significant difference ( $p < 0.05$ ), being the increase in the frequency of MNC equivalent to 68,92%. The number of 1 and 2 micronuclei per cell in G1 increased by 46.68% and 67,5%, respectively, in comparison to G2. Floor of the mouth showed a greater increase in MNC (72.49%) in G1. The inner cheek mucosa, the lateral border of tongue and floor of the mouth were significantly different between smokers and non-

smokers ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.0001$ , respectively). **Conclusion:** The study showed differences in the presence of MNC and the number of MNs per cell according to the anatomical oral regions, sex and age groups between smokers and non-smokers.

**Keywords:** Micronuclei chromosome-defective; oral mucosa; tobacco use disorder.

## RESUMO

**Introdução:** A mucosa bucal ao ser exposta a agentes cancerígenos, em especial o tabaco, torna-se suscetível a danos celulares devido aos metabólitos reativos gerados. Os micronúcleos são indicativos de danos no DNA e contribuem no rastreamento e na compreensão da etiopatogênese de lesões subclínicas. **Objetivo:** Determinar a frequência de micronúcleos (MNs) nas células epiteliais da mucosa bucal hígida em pacientes fumantes e não fumantes. **Método:** 16 pacientes de ambos sexos, separados em 2 grupos (G1: fumantes e G2: não fumantes), foram comparados utilizando o teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de três regiões anatômicas (mucosa jugal, borda lateral da língua e assoalho da boca). Após da coloração por Papanicolaou, as células micronucleadas (CMN) foram contadas. **Resultados:** A quantidade de CMN em G1 foi de 50,53% mais que em G2. Entre G1 e G2, no sexo feminino observou-se um aumento de 72,38% de CMN. Na faixa de 50-60 anos do G1 observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sendo o aumento na frequência de CMN de 68,92%. A quantidade de 1 e 2 micronúcleos por célula em G1 aumentou 46,68% e 67,5% respectivamente, comparado a G2. O assoalho da boca apresentou maior aumento de CMN (72,49%) em G1. A mucosa jugal, a borda lateral da língua e assoalho da boca foram significativamente diferentes entre fumantes e não fumantes ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). **Conclusão:** O estudo demonstrou diferenças na presença de CMN e quantidade de MNs por célula segundo as regiões anatômicas bucais, sexo e faixas etárias entre fumantes e não fumantes.

**Palavras-chave:** Micronúcleos com defeito cromossômico; mucosa bucal; tabagismo.

## INTRODUÇÃO

O tabagismo é uma doença de impacto global considerada uma das principais causas de mortalidade no mundo<sup>1</sup>. Se forem analisados os fatores de risco associados ao desenvolvimento de eventos cancerígenos, o tabagismo representa um fator muito importante na epidemiologia da doença<sup>2</sup>. Salienta-se o impacto do tabagismo no aumento relativo das principais doenças relacionadas com o tabaco, como a doença coronária e enfarte do miocárdio (25%), doenças pulmonares obstrutivas crônicas (85%), neoplasias pulmonares (90%), neoplasias de boca, faringe, laringe, esófago, estômago, pâncreas, rim, bexiga, colo de útero, mama (30%), e doenças cérebro vasculares (25%)<sup>3,4</sup>. Na última década, apareceram novas formas de tabagismo, publicitadas como tendo risco ausente ou risco reduzido que associam nicotina a outras substâncias, mas potencialmente indutores de risco para a saúde<sup>5,6</sup>, como é o caso da maioria dos cânceres orais resultantes de fumar ou usar tabaco de outras maneiras<sup>7</sup>.

Embora muitos usuários estejam cientes que o tabaco prejudica sua saúde, a maioria ainda aceita fumar como parte de suas vidas<sup>8</sup>. A mucosa bucal ao ser exposta a agentes cancerígenos, em especial aqueles que provierem do tabaco, como nicotina, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), gases irritantes, formaldeído, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), derivados fenólicos e óxido nítrico (NO), dentre outros<sup>9</sup>, torna-se suscetível a danos celulares devido aos múltiplos metabólitos reativos gerados. Cada cigarro é feito de muitos ingredientes, e algumas empresas de tabaco usam certos aditivos aromatizantes para tornar seus produtos de tabaco mais atraentes, o que também pode ser prejudicial à saúde<sup>10</sup>.

O hábito de fumar ou mascar tabaco pode causar reações oxidativas nos tecidos, que implicam na iniciação de reações que produzem radicais livres nos eventos celulares. A presença de oxigênio reativo pode causar danos às proteínas, carboidratos, lipídios e DNA manifestando-se fisicamente em lesões pré-malignas e malignas<sup>11</sup>. Sendo a boca uma área de fácil acesso, considera-se que qualquer alteração nessa região possa ser de fácil percepção, o que deveria resultar em diagnóstico precoce de qualquer lesão em estágio inicial, por meio do auxílio de biópsias e exames histopatológicos<sup>12</sup>.

A citologia esfoliativa é um procedimento simples que tem sido objeto de controvérsia sobre sua real validade na patologia oral, mas ressurgiu com base em sua aplicação no pré-câncer e no câncer bucal, tanto como uma metodologia de diagnóstico e preditiva quanto para o monitoramento de pacientes<sup>13</sup>. Assim, os MNs são indicativos de danos no DNA e poderiam contribuir no rastreamento e na compreensão da etiopatogênese de lesões subclínicas. Os MNs são formações globulares de DNA, originados a partir de fragmentos cromossômicos ou

cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular<sup>14</sup>. Outras aberrações cromossômicas, como picnose, células binucleadas ou anucleadas<sup>15</sup>, *broken eggs* entre outras são biomarcadores de exposição aos agentes prejudiciais do tabaco nos cromossomos<sup>16</sup>. Entretanto, este diagnóstico celular é pouco explorado e bastante heterogêneo na comunidade científica, com alta variabilidade geopopulacional de frequências, assim por exemplo, na pesquisa de Dosi *et al.*<sup>17</sup> na Índia foi observado, em pacientes com hábito de fumar, uma frequência de 23 MNs/100 células. Em outra pesquisa no Iraque, Shafi<sup>18</sup> mostrou que a incidência na frequência de micronúcleos em pacientes fumantes foi de 12 MNs/100 células. Já Lazalde-Ramos *et al.*<sup>19</sup> no México observou em grupos de nativos uma incidência na frequência de MNs de 33 MNs/100 células.

Partindo destas premissas, o objetivo deste trabalho visou determinar a frequência de MNs nas células epiteliais da mucosa bucal hígida em pacientes fumantes e não fumantes.

## **MÉTODOS**

### **Aspetos éticos**

Este estudo adotou os princípios bioéticos vigentes no Brasil da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº. 466/2012 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos local (CEP/UVA, Sobral/CE, CAAE no. 50957615.1.0000.5054, parecer no. 1.403.786)

### **Casuística**

Participaram 16 pacientes voluntários (entre homens e mulheres) que buscaram atendimento no serviço odontológico da Clínica Integrada da Universidade Federal do Ceará—Campus de Sobral, entre os anos de 2016 e 2017. Foram classificados em dois grupos, G1 (fumantes) e G2 (não fumantes) com faixa etária entre 40 e 60 anos.

### **Crítérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes que: aceitaram participar voluntariamente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (após esclarecimentos da pesquisa pelo pesquisador), estivessem na faixa etária adulta, entre 40 e 60 anos; fossem de ambos os sexos (metade homens e metade mulheres); relataram histórico de consumo intenso de tabaco ( $\geq 20$  unidades por dia).

Foram excluídos os pacientes que: apresentaram alguma lesão na mucosa oral detectável depois do exame clínico; os pacientes que não tiveram preenchimento correto ou completo da ficha de anamnese, exame clínico e citológico; ou relataram consumo não intenso de tabaco (para os fumantes) ou consumo adicional de álcool (para os não fumantes).

### **Coleta das amostras**

Antes da coleta de células da mucosa bucal, os pacientes selecionados enxaguaram a boca com água corrente para eliminar a presença de restos de alimentos e diminuir a concentração bacteriana nas lâminas dos esfregaços. Foi aplicada a técnica de citologia esfoliativa utilizando um *cytobrush* individual descartável para cada região bucal escolhida por paciente: mucosa jugal, borda lateral de língua e assoalho de boca. Foram coletadas 3 lâminas com células por paciente, fixadas em etanol (95%) por 24 horas, processadas e coradas pela técnica de Papanicolaou (kit Laborclin<sup>®</sup>, Curitiba, PR, Brasil). Nesta técnica citológica, o núcleo cora-se no tom de magenta, resultante da hidrólise ácida da 2-desoxirribose, o açúcar da molécula de DNA. O citoplasma cora-se de rosa avermelhado em células mais superficiais do epitélio oral (maior concentração de cito queratina) ou de verde para células intermediárias (menor queratinização). Essa contra-coloração permitiu uma melhor observação de pequenos fragmentos nucleares, além de minimizar as interferências nas leituras cito genéticas.

### **Análise dos dados**

As fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital Cybershot DSC-W300 (Sony, Manaus, Brasil) conectada a um microscópio óptico FWL-1000 (FWL-1000; Feldman Wild Leitz, Manaus, Brasil) com magnificação de 1000x com auxílio de óleo de imersão. Para cada uma das 48 lâminas histológicas coradas, 100 imagens fotográficas não-superpostas de células individualizadas e bem distendidas foram registradas. A análise citomorfométrica foi realizada por um patologista bucal.

Para as 4.800 fotomicrografias foram consideradas: (i) presença de células com micronúcleo e (ii) quantidade de micronúcleos por célula. Para determinação de micronúcleos, foram considerados: localização (intracitoplasmática, próxima ao núcleo principal), tamanho (1/16 a 1/3 do diâmetro no núcleo principal), coloração (similar ao núcleo principal, ocasionalmente mais intensa ou mais pálida) e forma (ovalada ou redonda). Foram excluídas da análise outras possíveis alterações citogenéticas (binucleação, picnose, *broken egg*, cariorrexe ou cariólise), grânulos citoplasmáticos de querato-hialina (de menor tamanho, amorfos e com coloração

diferente da nuclear) ou unidades formadoras de colônia bacteriana sobrepostas aos queratinócitos em análise.

Os dados foram tabulados em Excel (Microsoft Office, EUA), de acordo com grupo (fumante ou não fumante) e as variáveis independentes (região anatômica, sexo e faixa etária). Foram analisadas: (i) presença de células com micronúcleo/número total de células por região anatômica (800 células) e (ii) quantidade de micronúcleos por célula, seguindo as faixas de 1, 2, 3 ou  $\geq 4$  micronúcleos. Os resultados da média $\pm$ desvio padrão dispostos em gráficos e os dados paramétricos analisados foram executados usando programa Prism 7.0 (GraphPad, EUA) segundo os intragrupos e intergrupos. A análise estatística foi através da Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando diferenças significantes de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A análise morfológica dos queratinócitos esfoliados de mucosa bucal hígida sugeriram maior presença de CMN e maior quantidade de MNs no grupo de fumantes (G1) em relação ao grupo de não fumantes (G2), conforme demonstram o Gráfico 1a e 1b.

O Gráfico 2a mostra que os pacientes fumantes apresentaram um acréscimo de 50,53% na presença de CMN com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Ao comparar as regiões bucais isoladas dos pacientes fumantes em relação aos não fumantes, o assoalho da boca apresentou um aumento de 72,49%; a significância estatística foi de  $p < 0,05$  na incidência de CMN (Gráfico 2b). As outras regiões não apresentaram diferença significativa. A respeito da variável sexo, foi possível constatar uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) no sexo feminino, num aumento de 72,38% de CMN em pacientes fumantes em relação às não fumantes (Gráfico 2-c). O sexo masculino não apresentou diferença.

A Gráfico 2d mostra os dados em relação a faixa de 50-60 anos entre fumantes e não fumantes, se constatando diferença significativa ( $p < 0,05$ ), o que representa um aumento de 68,92% de CMN em pacientes fumantes.

Na Tabela 1, a comparação da frequência de MNs/célula entre pacientes fumantes e não fumantes, segundo a variável região anatômica intraoral, mostrou aumento significativo ( $p < 0,001$  – Anova e Tukey) e as frequências de 1 e 2 MNs/célula aumentaram 46,68 e 67,5%, respectivamente no grupo fumante. Assim mesmo, dentro de cada grupo experimental, se observou que as frequências 3 e  $\geq 4$  foram significativamente diferentes ( $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, em fumantes e  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, em não fumantes).

Considerando as regiões estudadas, tanto mucosa jugal, borda lateral da língua e assoalho da boca foram significativamente diferentes entre fumantes e não fumantes ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente).

Segundo a variável sexo, observou-se que no grupo dos fumantes, a quantidade de MNs/célula variou significativamente ( $p < 0,05$ ) no sexo masculino, ao comparar a frequência de 1 MN com as frequências de 3 e  $\geq 4$  MN. Também houve diferença significativa de  $p < 0,05$  com o grupo de não fumantes nas mesmas frequências. O sexo feminino do grupo fumante também apresentou diferença significativa na frequência 1MN e as frequências 3 e  $\geq 4$  MN ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Observou-se que a frequência de 1 MN e as frequências de 1, 2, 3 e  $\geq 4$  entre fumantes e não fumantes do sexo feminino, houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$  para 1 MN e  $p < 0,001$  para as demais). Dentro do grupo de não fumantes, existiu uma diferença entre o sexo masculino e feminino em relação à frequência de 1 MN e frequências de 2, 3 e  $\geq 4$  MN ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$  respectivamente).

Nos resultados da variável idade, entre fumantes e não fumantes na frequência de 1 MN, na faixa de 50 a 60 anos, existiu diferença significativa ( $p < 0,001$ ), que variou em 58,9%. A mesma faixa etária também apresentou uma diferença significativa entre a frequência de 1 MN e as frequências 3 e  $\geq 4$  MN em fumantes ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) e não fumantes ( $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ ) respectivamente. Outra diferença significativa ocorreu na faixa etária de 40 a 50 anos de pacientes não fumantes na frequência de 1 MN e frequências de 3 e  $\geq 4$  MN (significância de  $p < 0,05$ ).

Os pacientes que apresentaram maior quantidade de células micronucleadas foram informados de sua situação e revisões periódicas foram programadas como medida preventiva, a fim de monitoramento contínuo e forma de minimizar o risco de desenvolvimento de neoplasias orais.

## **DISCUSSÃO**

A expressão de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral é uma boa fonte para biomonitoramento de danos genéticos. O teste de micronúcleo é simples, uma técnica não invasiva para avaliar o dano ao DNA.<sup>20</sup>

No presente estudo, a frequência geral de micronúcleos encontrados nas células da mucosa bucal de fumantes foi marcadamente superior à de não fumantes ( $p < 0,05$ ). Esses resultados são consistentes com outros estudos,<sup>21</sup> nos quais o aumento do número de micronúcleos se deveu ao tabagismo.



Com referência à frequência de micronúcleos encontrados nos grupos de fumantes e não fumantes, segundo as regiões anatômicas, o assoalho da boca foi o local que apresentou o maior aumento de micronúcleos; isso concorda com Morales *et al.*<sup>22</sup> já que este sítio é composto de tecidos moles e sem planos de referência óssea. É uma das regiões mais delicadas da boca e região frequente de ocorrência de neoplasias malignas. Neste estudo, nem a mucosa jugal nem a borda lateral da língua apresentaram aumento significativo na frequência de micronúcleos quando comparados os dois grupos de estudo. Em contrapartida, Mohanda *et al.*<sup>23</sup> argumenta que é a mucosa jugal que possui a maior presença na quantidade de micronúcleos. Essa diferença pode ser devido a fatores como estilo de vida.

Com relação à frequência de micronúcleos encontrados de acordo com o sexo nos grupos estudados, fumantes e não fumantes, foi o sexo feminino que apresentou maiores valores de micronúcleos. Esse resultado é controverso, pois alguns pesquisadores relataram valores mais altos em homens e outros em mulheres.<sup>23,24,25</sup>

Em relação à frequência de micronúcleos encontrados nos grupos de fumantes e não fumantes, de acordo com a idade, nesta investigação não houve diferença na faixa etária de 40 a 50 anos; no entanto, outras investigações observaram diferença significativa.<sup>20,26</sup> O grupo de 50-60 anos, que apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, corrobora com a pesquisa de Hilada *et al.*<sup>25</sup> A influência da idade na promoção de danos ao material genético é amplamente registrada na literatura. Assim, os efeitos do envelhecimento parecem ser uma combinação de processos geneticamente programados e alterações genéticas induzidas por fatores exógenos e endógenos.<sup>26</sup> O uso do micronúcleo como biomarcador de genotoxicidade pode exibir vantagens frente a outros métodos, incluindo a coleta e a análise direta, alta confiabilidade, rapidez, simplicidade e economia do processo. Entretanto, cabe ressaltar que há limitações, não sendo útil em células com baixa taxa de divisão celular.

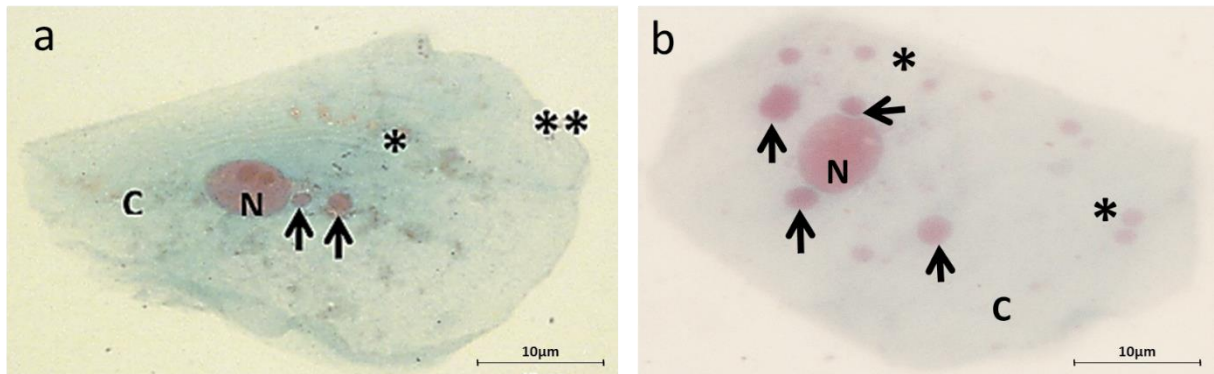
Em conclusão, nesse trabalho foram evidenciadas diferenças significativas na quantidade da presença geral de células micronucleadas e quantidade de micronúcleos por célula entre os grupos estudados, com pacientes fumantes mostrando uma maior incidência que os não fumantes, bem como entre diferentes regiões anatômicas intraorais, sexo e faixas etárias, sugerindo que a citopatologia oral pode contribuir para o diagnóstico subclínico de alterações genotóxicas celulares.

## Referências

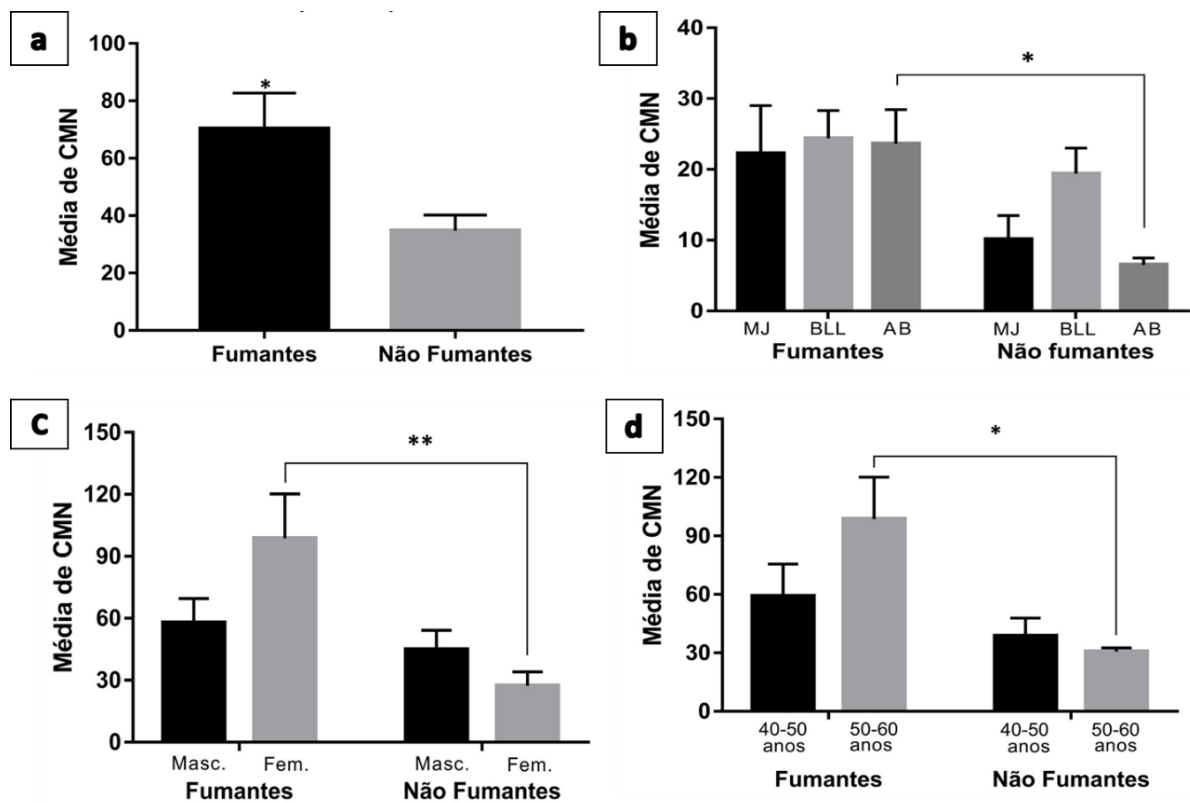
1. West R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health*. 2017; 32(8):1018-1036.
2. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016; .48(3): 889-902.
3. GBD 2017 Mortality Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 GBD Mortality Collaborators. **The Lancet**, 2018; 392(10159):1684-735.
4. OHS, Office on Smoking and Health. **Smoking & Tobacco Use: Health Effects of Cigarette Smoking**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018. Disponível em: [https://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/fact\\_sheets/health\\_effects/effects\\_cig\\_smoking/index.htm](https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm). Acesso em: 13 jan. 2020.
5. Rigotti NA, Benowitz NL, Cummings KM, Jazayeri MA, Morris PB, Ratchford EV, et al. 2018 ACC expert consensus decision pathway on tobacco cessation treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72(25): 3332-365. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.10.027
6. Kalkhoran S, Benowitz N L, Nancya N A. Prevention and treatment of tobacco use: JACC health promotion series. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72(9):1030-1045.
7. Chaturvedi P, Singh A, Chienchih-Yen, Warnakulasuriya S. Tobacco related oral cancer. *BMJ*. 2019; 365(2142):1-10.
8. Jiang X, Wu J, Wang J.; Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob. Induc. Dis*. 2019; 17(29):1-9.
9. Fernández E, Figueroa D, Tabaquismo y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *Rev haban cienc méd*. 2018; 17(2): 225-35.
10. Lisko J, Stanfill S, Watson CH. Quantitation of ten flavor compounds in unburned tobacco products. *Anal Methods*. 2014; 6(13): 4698-704.
11. Freitas A M, Rodrigues A, Oliveira, G. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal: uma revisão de literatura. *Rev. Bras. An. Clín*. 2016; 48(1): 13-18.
12. Domingos P, Passalacqua M, Martins de Oliveira, A. Câncer bucal: um problema de saúde pública. *Rev. Odontol. Univ. Cid*. 2014; 26(1): 46-52.
13. Almirón M, Montenegro M, Gili M, Segovia S. Importancia de la citología exfoliativa en el diagnóstico de lesiones bucales. *Rev. Facul. Odont*. 2015; 8(1): 26-33.
14. Degen A, Valiatti T, Freitas V, Azambuja de Souza D, Romão N, Sobral F. Ensino e pesquisa. *Revista UNILUS*. 2017; 14(36): 90-95.

15. Geus JD, Wambier L, Loguercio A, Reis A. The smokeless tobacco habit and DNA damage: a systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019; 24 (2):145-55.
16. Biswas S, Garai B, Banerjee M. Genotoxic effects of tobacco on buccal epithelium: Cell Nuclear Anomalies as Biomarker. *APJMT*. 2014; 3(4): 157-62.
17. Dosi T, Gupta D, Hazari A, Rajput R, Chauhan P, Rajapuri AS. Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016; 6(2):143-7. doi: 10.4103/2231-0762.189745
18. Shafi F. The effects of smoking on micronucleus frequencies in buccal cells of healthy iraqi individuals. *WJPR*. 2015; 44(9): 406-415.
19. Lazalde-Ramos BP, Zamora-Pérez AL, Sosa-Macías M, Galaviz-Hernández C, Zúñiga-González GM. Micronuclei and nuclear anomalies in Mexico's indigenous population. *Salud Pública de México*. 2017; 59(5): 532-539.
20. Sadav A, Saini M. Increased frequency of nuclear anomalies in exfoliated buccal mucosa of cigarette smokers. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2015; 3(2): 07-10.
21. Merlin T, Ramesh M, Seka B. Study of exfoliated cells in the buccal mucosa of smokers and non-smokers - a cytological comparative study, *International Journal of Current Advanced Research*.2017;6(8):5010-5014.
22. Morales R, Reina YM, Viamontes J. Estudio clínico-epidemiológico de pacientes con cáncer en suelo de boca. *Medisur*. 2019; 17(5): 698-705.
23. Mohanta A, Mohanty P, Parida, G. Keratinized tadpole cells in human oral neoplasm: a cytodiagnostic approach. *IOSR-JDMS*. 2014; 3(9):110-119.
24. Navya BN, Najem H, Alva S. Comparison of cytogenetic abnormality of exfoliative buccal cells among smokers and non-smokers. *Archives of cytology and histopathology research*. 2017; 2(1):1-4 .
25. Nefi H, Musanovic J, Kurteshi K, Prutina E, Turcalo E. The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. *Journal of Health Sciences*. 2014; 3(3):196-204.
26. Ferraz GA., Costa AO, Marcílio EM, Cardoso JR. Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol*. 2016; 19(4):627-634.

## Figuras e tabelas



**Gráfico 1:** Fotomicrografia de um queratinócito esfoliado de mucosa jugal; (a) Paciente não tabagista, (b) Paciente tabagista. **Legenda:** Citoplasma (C), núcleo (N), micronúcleos (↑), grânulos de querato-hialina (\*) e bactérias (\*\*). Coloração: Papanicolaou. Magnificação: 1000x.



**Gráfico 2:** Presença de CMN segundo: (a) Amostra geral (2400 células/grupo), (b) Regiões anatômicas intraorais, (c) Sexo, (d) Idade. **Legenda:** MJ= Mucosa jugal; BLL= Borda lateral de língua; AB= Assoalho de boca. Os valores representam a média  $\pm$  SEM do número de células micronucleadas. Para análise estatística foram utilizados os testes two-way ANOVA seguido por Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

**Tabela 1:** Média  $\pm$  desvio padrão da faixa de micronúcleos por células (1, 2, 3 e  $\geq$  4) de pacientes fumantes e não fumantes de acordo com as regiões anatômicas intraorais, sexo e idade.

Variável	Faixa de micronúcleos por célula				p-valor
	1	2	3	$\geq$ 4	
<b>Regiões intraorais</b>					
<b>Fumantes</b>	<b>31,50<math>\pm</math>15,45<sup>aaa</sup></b>	<b>19,88<math>\pm</math>11,48<sup>aaa</sup></b>	<b>10,00<math>\pm</math>5,15<sup>bb</sup></b>	<b>8,88<math>\pm</math>5,77<sup>bb</sup></b>	
Mucosa Jugal	11,25 $\pm$ 10,26	6,63 $\pm$ 5,71	2,25 $\pm$ 2,92	2,13 $\pm$ 2,10	aaaa
Borda lateral da língua	10,50 $\pm$ 4,66	7,13 $\pm$ 3,14	3,13 $\pm$ 1,73	3,63 $\pm$ 3,34	aa
Assoalho da Boca	9,75 $\pm$ 4,92	6,13 $\pm$ 4,91	4,63 $\pm$ 3,20	3,13 $\pm$ 2,64	aaaa
<b>Não Fumantes</b>	<b>22,50<math>\pm</math>10,17</b>	<b>9,25<math>\pm</math>6,07</b>	<b>2,75<math>\pm</math>2,31<sup>bbb</sup></b>	<b>1,50<math>\pm</math>2,27<sup>bb</sup></b>	
Mucosa Jugal	5,88 $\pm$ 5,51	2,75 $\pm$ 3,01	1,25 $\pm$ 1,49	0,25 $\pm$ 0,71	
Borda lateral da língua	12,50 $\pm$ 5,40	4,88 $\pm$ 4,52	1,13 $\pm$ 0,99	0,88 $\pm$ 1,73	
Assoalho da Boca	4,13 $\pm$ 2,30	1,63 $\pm$ 0,92	0,38 $\pm$ 0,52	0,38 $\pm$ 0,52	
<b>Sexo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b><math>\geq</math> 4</b>	
<b>Fumantes</b>	<b>31,50<math>\pm</math>15,45</b>	<b>19,88<math>\pm</math>11,48</b>	<b>10,00<math>\pm</math>5,15</b>	<b>8,88<math>\pm</math>5,77</b>	
Masculino	24,25 $\pm$ 6,70	17,00 $\pm$ 7,79	7,75 $\pm$ 2,99 <sup>b,a</sup>	8,75 $\pm$ 6,50 <sup>b,a</sup>	
Feminino	38,75 $\pm$ 19,28 <sup>a</sup>	22,75 $\pm$ 15,00 <sup>aaa</sup>	12,25 $\pm$ 6,29 <sup>bb,aaa</sup>	9,00 $\pm$ 5,94 <sup>bbb,aaa</sup>	
<b>Não Fumantes</b>	<b>22,50<math>\pm</math>10,17</b>	<b>9,25<math>\pm</math>6,07</b>	<b>2,75<math>\pm</math>2,31</b>	<b>1,50<math>\pm</math>2,27</b>	
Masculino	27,50 $\pm$ 11,70	12,25 $\pm$ 6,40	3,00 $\pm$ 2,58	2,00 $\pm$ 2,71	
Feminino	17,50 $\pm$ 6,14	6,25 $\pm$ 4,57 <sup>c</sup>	2,50 $\pm$ 2,38 <sup>cc</sup>	1,00 $\pm$ 2,00 <sup>cc</sup>	
<b>Idade</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b><math>\geq</math> 4</b>	
<b>Fumantes</b>	<b>31,50<math>\pm</math>15,45</b>	<b>19,88<math>\pm</math>11,48</b>	<b>10,00<math>\pm</math>5,15</b>	<b>8,88<math>\pm</math>5,77</b>	
40 – 50 anos	25,00 $\pm$ 8,00	17,00 $\pm$ 9,54	1,00 $\pm$ 0,15	1,13 $\pm$ 0,33	
50 – 60 anos	35,40 $\pm$ 18,30 <sup>aaaa</sup>	21,60 $\pm$ 13,24	11,20 $\pm$ 5,93 <sup>bb</sup>	8,80 $\pm$ 5,17 <sup>bbb</sup>	
<b>Não Fumantes</b>	<b>22,50<math>\pm</math>10,17</b>	<b>9,25<math>\pm</math>6,07</b>	<b>2,75<math>\pm</math>2,31</b>	<b>1,50<math>\pm</math>2,27</b>	
40 – 50 anos	26,25 $\pm$ 13,00	12,50 $\pm$ 6,56	4,50 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup>	2,75 $\pm$ 2,75 <sup>b</sup>	
50 – 60 anos	18,75 $\pm$ 5,91	6,00 $\pm$ 3,83	1,00 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	0,25 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	

**Legenda:** Os valores representam a média  $\pm$  DP do número de células micronucleadas. Para análise estatística foram utilizados os testes two-way ANOVA seguido por Tukey.

<sup>a</sup> mostra diferença significativa em comparação intergrupos: <sup>a</sup> p<0,05, <sup>aa</sup> p<0,01, <sup>aaa</sup> p<0,001, <sup>aaaa</sup> p<0,0001;

<sup>b</sup> mostra diferença significativa em comparação intragrupos: <sup>b</sup> p<0,05, <sup>bb</sup> p<0,01, <sup>bbb</sup> p<0,001;

<sup>c</sup> mostra diferença significativa entre subgrupos de cada grupo: <sup>c</sup> p<0,05, <sup>cc</sup> p<0,01.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p.1-19, 1993.
- AGOSTINI, J.M. **Análise Citogenética em Trabalhadores de Minas de Carvão Mineral de Criciúma-SC**. 1993. 158 f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 1993.
- ALEXANDRESCU, I.; HAVÂRNEANU D, POPA D. New approaches in biomonitoring human populations exposed to genotoxic agents: epithelial cell micronucleus assay. **J Preventive Medicine**, v.14, n. 4, p.57–65, 2006.
- ALMIRÓN, M.; MONTENEGRO, M.; GILI, M.; SEGOVIA, S. Importancia de la citología exfoliativa en el diagnóstico de lesiones bucales. **Rev. Facul. Odont.**, v. 8, n. 1, p. 26-31, 2015.
- ANATOMIA EM FOCO. Sistema digestivo humano – anatomia e função dos órgãos. São Paulo, 2019. Altura: 510 pixels. Largura: 450 pixels. Formato JPEG. Disponível em: <https://www.anatomiaemfoco.com.br/sistema-digestivo-anatomia/>. Acesso em: 20 out. 2019.
- ANSCHAU, F.; GONÇALVEZ, M. **Citologia cervical em meio líquido versus citologia convencional feminina**. v. 34, n. 5, p. 329-35, 2006.
- ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2019. **Oral and Oropharyngeal Cancer: Risk Factors and Prevention**. Disponível em: <https://www.cancer.net/cancer-types/oral-and-oropharyngeal-cancer/risk-factors-and-prevention>. Acesso: 14 out. 2019.
- AZEVEDO, R. B. FABER, J. LEAL, S. LUCCHI, C. Histologia da Cavidade Oral. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016, p. 215 -226.
- BARACAT, F. F. *et al.* Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar. In: **Cancerologia Atual: um enfoque multidisciplinar**, São Paulo; Roca; 2000, 548 p.
- BARTKOVA, J.; HOREJSI, Z; KOED, K. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 1, p. 864–870, 2005.
- BARUA, R.S. et al., 2018 ACC expert consensus decision pathway on tobacco cessation treatment. **J Am Coll Cardiol.**; v.72, n. 25 p. 3332-3365, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. VIGITEL BRASIL 2018. **Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2018**. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Brasília, DF, 2019, 131 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 18 out. 2019.

BISWAS, S.; GARAI, B.; BANERJEE, M. Genotoxic Effects of Tobacco on Buccal Epithelium: Cell Nuclear Anomalies as Biomarker. **Asia Pacific Journal of Medical Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 157-162, 2014.

BONASSI S, et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay a first stage in the HUMNXL project initiative. **Mutagenesis**, v. 24, n.4, p. 295–302, 2009.

BRENER, S. *et al.* Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 1, p. 63-9, 2007.

GOMEZ DE FERRARI, M.; CAMPOS, A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. *In*: GOMEZ DE FERRARI, M.; CAMPOS, A. **Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental**. 3. ed. Madrid: Médica Panamericana, 2009. cap. 1, p. 1-12. Disponível em: [http://bibliotecas.unr.edu.ar/muestra/medica\\_panamericana/9786077743019.pdf](http://bibliotecas.unr.edu.ar/muestra/medica_panamericana/9786077743019.pdf). Acesso em: 20 out. 2019.

CASARTELLI, G. *et al.* Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 22, n. 6, p. 486-492, 2000.

CARRARD, V.C.; COSTA, CH.; FERREIRA LA, LAUZEN, I.S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Rev Fac. Odontol Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p.77–81, 2007.

CERQUEIRA, E. M. *et al.* Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 562, n. 1-2, p. 111-117, 2004.

CHATURVEDI, P.; SINGH, A., CHIENCHIH-YEN, WARNAKULASURIYA SAMAN. Tobacco related oral cancer. **BMJ**, v.365, n. 2142, p. 1-10, 2019;

CIMINI, D.; FIORAVANTI, D.; SALMON, E.D.; DEGRASSI, F. Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 3, p.507–515, 2002.

CONTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins-Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ, M. *et al.* Factores de riesgo de cáncer bucal. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 53, n. 3, p. 128-145, 2016.

DEGEN, A.; VALIATTI, T.; FREITAS, V.; AZAMBUJA DE SOUZA, D.; ROMÃO N.; SOBRAL, F. Ensino e Pesquisa. **Revista UNILUS**, v. 14, n. 36, p. 90-95. 2017.

DOMINGOS, P.; PASSALACQUA, M.; MARTINS DE OLIVEIRA, A. câncer bucal: um problema de saúde pública. **Rev. Odontol. Univ. Cid**; v. 26, n. 1, p. 46-52, 2014.

DOSI, T. *et al.* AS Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. **J Int Soc Prev Community Dent.**, v. 6, n. 2, p. 143-7, 2016.

FALCK, G.C.; CATALAN, J.; NORPPA, H. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 111–117, 2002.

FARIA, L.E.M.; BRAGA, J.R.M. Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de potencial genotóxico em epitélio oral. **Rev. Eletrôn. Atualiza Saúde**. v. 1, n. 1, p. 35-41, 2015.

FENECH M, *et al.* HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1, p. 65–75, 2003.

FERNANDEZ, E.; FIGUEROA, D. Tabaquismo y su relación con las enfermedades cardiovasculares. **Rev Haban Cienc Méd**, v. 17, n. 2, p. 225-235, 2018.

FERRAZ, G.; COSTA, A.; MARCÍLIO, E.; CARDOSO, JR. Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 19, n. 4, p. 627-634, 2016.

FIGUEIREDO, V. C. *et al.* Determinantes dos níveis de cotinina salivar: um estudo de base populacional no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 6, p. 954-962, 2007.

FISCHER, A.H.; ZHAO, C.; LI, Q.K. The cytologic criteria of malignancy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 1, p. 975–811, 2010.

FLORES, M. Tabaquismo pasivo: ¿qué podemos hacer? **Prev Tab**. v. 3, n. 4, p.205-206, 2001.

FRANCO, Eduardo L. *et al.* Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **International journal of cancer**, v. 43, n. 6, p. 992-1000, 1989.

FREITAS, A.; RODRIGUES, A.; MATOS, OLIVEIRA, G. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal: uma revisão de literatura. **Rev. Bras. An. Clín.** v. 48, n. 1, p. 13-18, 2016

FORD, J.H.; SCHULTZ, C.J.; CORRELL, A.T. Chromosome elimination in micronuclei: A common cause of hypoploidy. **American Journal of Human Genetics**, v. 43, n. 5, p. 733–740, 1988.

GARBELOTTO, A. C. **CITOLOGIA ESFOLIATIVA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO NA ODONTOLOGIA**. 2017. 89 f. TCC (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/181311/TCC%20Anna%20Garbelotto%20CORRE%c3%87AO%20FINAL%20071117.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18 out. 2019.



GBD 2015 Risk factors collaborators *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.

GBD 2017 Mortality Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 GBD Mortality Collaborators. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1684-1735, 2018.

GEUS, J.D.; WAMBIER, L.; LOGUERCIO, A.; REIS, A. The smokeless tobacco habit and DNA damage: A systematic review and meta-analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 24, n. 2, p.145-155, 2019.

GONSEBATT, M. *et al.* Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 386, n. 3, p. 219-228, 1997.

HEDDLE, J. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HIRVONEN, A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 37, n. 1, p. 37-43, 1995.

HWANG, S. *et al.* Health effects from exposure to dental diagnostic X-ray. **Environmental health and toxicology**, v.33, n. 4, p. 1-6, 2018.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/convencao-quadro>. Acesso em: 11 outubro 2018.

JIANG, X.; WU, J.; WANG, J.; HUANG, R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. **Tob. Induc. Dis.**, v.17, n. 29, p. 1-9, 2019.

JOHNSON, N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. **Journal of dental education**, v. 65, n. 4, p. 328-339, 2001.

KALKHORAN, S.; BENOWITZ, N.L.; NANCYA, N.A. Prevention and Treatment of Tobacco Use: JACC Health Promotion Series. **J Am Coll Cardiol.**, v.72, n. 9, p.1030-1045, 2018.

KAUGARS, G. *et al.* 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. *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay-working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.

LA VECCHIA, C. *et al.* Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral oncology**, v. 33, n.5, p. 302-312, 1997.

LAZALDE-RAMOS, BP. *et al.* Micronuclei and nuclear anomalies in Mexico's indigenous population. **Salud Pública de México.**, v. 59, n. 5, p. 532-539, 2017.

LINDE, P. Los países que más fuman, los que menos y cómo la industria intenta entrar en ellos. 2019. **EL País**. Disponível em: [https://elpais.com/elpais/2019/05/29/planeta\\_futuro/1559113868\\_200841.html](https://elpais.com/elpais/2019/05/29/planeta_futuro/1559113868_200841.html). Acessado em: 22 de outubro de 2019

LISKO, J.; STANFILL, S.; WATSON, CH. Quantitation of ten flavor compounds in unburned tobacco products. **Anal Methods**, v. 6, n. 13, p. 4698-4704, 2014

MACLUSKEY M; OGDEN G. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: Markers of value in tumour diagnosis. **Dental Update**, v. 21, n. 3, p. 148-152, 2000.

MALHOTRA, J.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C.; BOFFETTA, P. Risk factors for lung cancer worldwide. **Eur Respir J.**, v.48, n. 3, p.889-902, 2016.

MARANDAS, P.; MARANDAS, N. Tumours of the buccal cavity and the upper respiratory-digestive tracts. **La Revue du praticien**, v. 55, n. 4, p. 415, 2005.

MARTINS, M *et al*, Interferência da saliva na qualidade das lâminas de lesões bucais obtidas pela citologia esfoliativa em meio líquido. **Revista Brasileira de Patologia Oral**. v. 4, n. 3, p.136-142, 2005.

MARTINEZ, A. E. T., SILVÉRIO, K. G., ROSSA JÚNIOR, C. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos: estudo in vitro. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.1, n.1, p. 234-238, 2002.

MASHBERG, A. *et al.* Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among US veterans. **Câncer**, v. 72, n. 4, p. 1369-1375, 1993.

MATOS, I.; ARAÚJO, L. Práticas acadêmicas, cirurgias dentistas, população e câncer bucal. **Rev. ABENO**, v.3, n. 1, p.76-81, 2003.

MERLIN, T.; RAMESH, M.; SEKA, B. Study of exfoliated cells in the buccal mucosa of smokers and non-smokers - a cytological comparative study. **International Journal of Current Advanced Research**, v. 6, n. 8, p. 5010-5014, 2017.

MORALES, R.; REINA, YM.; VIAMONTES, J. Estudio clínico-epidemiológico de pacientes con cáncer en suelo de boca. **Medisur**, v.17, n. 5, p. 698-705, 2019.

MOHANTA, A.; MOHANTY, P.; PARIDA, G. Keratinized tadpole cells in human oral neoplasm: a cytodiagnostic approach. **IOSR-JDMS**, v. 3, n. 9, p. 110-119, 2014.

MÜLLER, W. U.; STREFFER, C.Y. Micronucleus assays. **Advances in Mutagenesis Research**, v.5, n. 1, p. 1-108, 1994.

NANCI, A. **Ten Cate Histologia Oral**. 8. ed. Montreal: Elsevier, 2013. 410 p. Disponível em: [https://issuu.com/elsevier\\_saude/docs/nancitencate](https://issuu.com/elsevier_saude/docs/nancitencate). Acesso em: 9 nov. 2019.

NIH, NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. Carcinógeno. *In*: BELL, D. **Talking Glossary of Genetic Terms**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Carcinogeno>. Acesso em: 15 out. 2019.

NAVYA, BN.; NAJEM, H.; ALVA, S. Comparison of cytogenetic abnormality of exfoliative buccal cells among smokers and non-smokers. **Archives of cytology and histopathology research**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2017.

NEFI, H. *et al.* The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. **Journal of Health Sciences**, v. 3, n. 3, p. 196-204, 2014.

NOGUEIRA, A.; ALBERTO, M.; CARDOSO, G.A.; BARRETO, M.A.; Risco de queda nos idosos: educação em saúde para melhoria da qualidade de vida. **Rev. Práxis**, v.4, n.8, p.77-82, 2012.

OHS, OFFICE ON SMOKING AND HEALTH. **Smoking & Tobacco Use: Health Effects of Cigarette Smoking**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018. Disponível em: [https://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/fact\\_sheets/health\\_effects/effects\\_cig\\_smoking/index.htm](https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm). Acesso em: 13 jan. 2020.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 69, n. 4, p. 553-9, 2003.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018 **Datos y cifras**. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 7 out. 2019.

OTENBERG JÚNIOR. **Tabagismo**. Disponível em: <https://www.sbmfc.org.br/tabagismo/>. Acesso em: 20 out. 2019.

PICKERING, M.; KOWALIK, T. Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. **Oncogene**, v. 25, n. 1, p. 746–755, 2006.

RABELLO-GAY, M. **Teste do micronúcleo em medula óssea**. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. São Paulo; La Regina; 1991.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, v.1 n. 3 p. 246-260, 2002.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 356 p., 2003.

RIGOTTI, N. *et al.* ACC expert consensus decision pathway on tobacco cessation treatment. **J Am Coll Cardiol**, v. 72, n. 25, p. 3332-365, 2018.

ROCHA, P.; MARCHETE, R. Principais atividades da planta *Alternanthera brasiliana*. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 10, p. 1049-1059, 2018.

ROSEMBREG, J. **Nicotina: Droga Universal**. São Paulo: SES/CVE, 2003. Disponível em: <https://sbpt.org.br/portal/wp-content/uploads/2019/01/LIVRO-NICOTINA-PROF-ROSEMBERG-2003.pdf>. Acesso em: 20 out. 2019.

RUIZ, G.; VEGA, M. **Biomarcadores para uso clínico**: Informe de vigilancia tecnologico. Madrid: GENOMA ESPAÑA/FUAM, 2010. Disponível em: [https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2010-biomarcadores\\_para\\_uso\\_clinico-pub\\_98\\_d.pdf](https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2010-biomarcadores_para_uso_clinico-pub_98_d.pdf). Acesso em: 10 jan. 2020.

SADAV, A.; SAINI, M. Increased frequency of nuclear anomalies in exfoliated buccal mucosa of cigarette smokers. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 3, n. 2, p. 07-10, 2015.

SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and Its Applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2010.

SANTOS, N. C. **Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos**. 2015. 94 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2015

SARTO, F. *et al.* The Micronucleus Assay in Exfoliated Cells of the Human Buccal Mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.

SANTOS, H. *et al.* A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 486, 2016.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, X. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n.1, p. 303-308, 2000.

SCHEIFELE, C. *et al.* The sensitivity and specificity of the Oral technique: evaluation of 103 Cases. **Oral Oncol.**, v. 8, n. 40, p. 824-828, 2004.

SESMA, E. Métodos diagnósticos de las ITS: Técnicas básicas para el diagnóstico. **El frotis en fresco**. 2015. Disponível em: <https://www.svcontracepcion.es/wp-content/uploads/2015/10/Frotis-en-fresco-ITS-2015%20.pdf> . Acesso em: 15 out. 2019.

SECRETAN, B.; STRAIF, K.; BAAN, R.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V. *et al.* A review of human carcinogens - Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. **Lancet Oncol**; v. 10, n. 11, p. 1033-1034, 2009.

SHAM, AS.; CHEUNG, LK.; JIN, LJ.; CORBET, EF. The effects of tobacco use on oral health. **Hong Kong Medical J**, v. 9, n.4, p. 271 – 277, 2003.

SHAFI, F. The effects of smoking on micronucleus frequencies in buccal cells of healthy iraqi individuals. **WJPR**, v. 44, n. 9, p. 406-415, 2015.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 1, p.1307-1320, 1998.

- SILVA, B. *et al.* Perfil dos participantes do programa permanente de prevenção e diagnóstico precoce das doenças bucais, com ênfase no câncer de boca, no município de Cuiabá-MT. **Arch Health Investigation**, v. 6, n. 3, p.141-144, 2017.
- SOUSA, F. *et al.* Oral cancer from a health promotion perspective: experience of a diagnosis network in Ceará. **Brazilian oral research**, v. 28, n. spe, p. 1-8, 2014.
- SOUTO, R.; BORGES, F.; CUNHA, D.; VILANOVA-COSTA, C.; CRUZ, A. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos**, v.35, n.1, p.171-178, 2008.
- SZYMAŃSKA, K. *et al.* Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. **Cancer Causes & Control**, v. 22, n. 7, p. 1037-1046, 2011.
- TOLBERT, P.; SHY, C.; ALLEN, J. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subject**, v. 271, n. 1, p. 69-77, 1992.
- TRAVIESAS, E. *et al.* Necesidad del abandono del tabaquismo para la prevención de enfermedad periodontal y otras afecciones. **Rev Cubana Estomatol.** v. 48, n. 3, p. 257-267, 2011.
- WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral oncology**, v. 41, n. 3, p. 244-260, 2005.
- WEST, R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. **Psychol Health**, v.32, n. 8, p.1018-1036, 2017
- WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, IARC. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines**. 1. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2004. 240 p. v. 85. ISBN 978-92-832-1585-1. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/corrigenda.php>. Acesso em: 11 out. 2019.
- WUNSCH FILHO, V. *et al.* Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.**, v. 13, n. 2, p. 175-187, 2010.
- ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales Sis San Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2005.
- ZYGOGIANNI, A. *et al.* Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head & Neck Oncology**, v.3, n. 2, p. 1-12, 2011.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Você está sendo convidado (a) pelo pesquisador Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva como participante voluntário (a) da pesquisa intitulada “**TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOMORFOMÉTRICA DO DANO GENOTÓXICO EM PACIENTES COM FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER BUCAL**”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

### Dados sobre a pesquisa:

**Objetivos:** Coletar amostra biológica da mucosa oral de pacientes expostos ou não a fatores de risco para o câncer de boca (álcool e tabaco). **Justificativa de estudo:** O raspado de tecido mole da boca (mucosa oral) será estudado em laboratório para verificar possíveis alterações no microscópio, não visíveis ao exame clínico convencional. **Riscos e benefícios:** Contribuir para estudos científicos em Odontologia relativos ao diagnóstico inicial de lesões bucais, ainda escassos na população da Região Nordeste do Brasil. Pelo fato de se tratar de coleta simples e não cirúrgica de material biológico, esta pesquisa não oferece risco ou desconforto adicional a seu(sua) participante.

### Considerações éticas:

É compromisso do pesquisador utilizar os dados e/ou material coletado somente para esta pesquisa. Não será realizado nenhum pagamento por participação nesta pesquisa. A qualquer momento, o(a) participante poderá se recusar a continuar participando da pesquisa e, também poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Todas as informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. O(A) participante da pesquisa manifesta por sua expressa vontade a transferência para o pesquisador dos direitos sobre a ficha clínica de paciente e o material biológico doado (raspado de mucosa oral), em caso de óbito ou condição incapacitante. Por fim, o(a) participante autoriza o descarte do material biológico residual após finalizados os experimentos por meio apropriado segundo a legislação sanitária (descarte das lâminas de vidro citológicas em caixa armazenadora de resíduos perfuro-cortantes para posterior incineração).

### Responsável pela pesquisa:

Nome: Prof. Igor Iuco Castro da Silva

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Conselheiro José Júlio, s/n - Clínica de Odontologia da UFC-Sobral, Centro, Sobral/CE

Telefone para contato: (0xx88) 3695-4626

Email: igor.iuco@sobral.ufc.br

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC, na Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: (0xx85) 3366-8344, Responsável: Fernando Frota Bezerra.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante (ou responsável legal pelo mesmo) na pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo. Sobral, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Nome do participante (ou responsável legal) \_\_\_\_\_ Data  
Assinatura

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador \_\_\_\_\_ Data  
Assinatura

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Nome do profissional (que aplicou o TCLE) \_\_\_\_\_ Data  
Assinatura

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha (se o participante não souber ler) \_\_\_\_\_ Data  
Assinatura

- - - 1ª. via: Participante / 2ª. via: Pesquisador - - -

## APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE, EXAME CLÍNICO E CITOLÓGICO

### **ANAMNESE**

**Paciente** (código 01-16): \_\_\_\_\_ **Sexo:**  Masculino  Feminino **Idade:** \_\_\_\_\_ anos

#### **Exposição a fatores de risco - Etilismo (critério de exclusão):**

*Categoria de uso*

Não usuário de bebida alcoólica  Ex-usuário de bebida alcoólica  Usuário de bebida alcoólica

*Tipos de bebida*

Fermentados (ex: cerveja)  Destilados (ex: vodka)

*Quantidade consumida*

< 1 copo ou dose por dia ou doses por dia  1-2 copos ou doses por dia  > 2 copos

*Idade de início do hábito*

Começou a beber com \_\_\_\_\_ anos

#### **Exposição a fatores de risco - Tabagismo (critério de inclusão):**

*Categoria de uso*

Não fumante  Ex-fumante  Fumante passivo  
 Fumante atual

*Tipos de fumo*

Cigarro  Outros (charuto, cachimbo, fumo de rolo, rapé, baseado, narguilé etc)

*Quantidade consumida*

< 20 unidades por dia  ≥ 20 unidades por dia

*Início do hábito*

Começou a fumar com \_\_\_\_\_ anos

### **EXAME CLÍNICO E CITOLÓGICO**

**MUCOSA JUGAL** – Lado do Exame:  Esquerdo  Direito

Clinicamente:

Normal  Com lesão (descrição clínica) \_\_\_\_\_

Microscopicamente:

Normal  Presença de Micronúcleos (Qde: \_\_)  Outras alterações citopáticas: \_\_\_\_\_

---

**BORDA LATERAL DE LÍNGUA** – Lado do Exame:  Esquerdo  Direito

Clinicamente:

Normal  Com lesão (descrição clínica) \_\_\_\_\_

Microscopicamente:

Normal  Presença de Micronúcleos (Qde: \_\_)  Outras alterações citopáticas: \_\_\_\_\_

**ASSOALHO DE BOCA**

Clinicamente:

Normal  Com lesão (descrição clínica) \_\_\_\_\_

Microscopicamente:

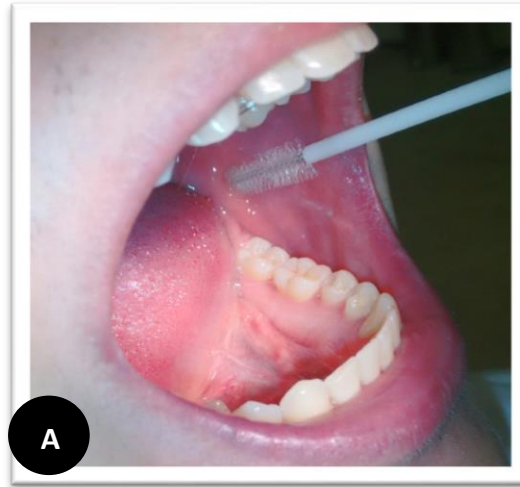
Normal  Presença de Micronúcleos (Qde: \_\_)  Outras alterações citopáticas: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C – DADOS DEMOGRÁFICOS GERAIS DA AMOSTRA (n=16)**

<b>Grupo</b>	<b>Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>
Controle	G1-001	Feminino	45 anos
Controle	G1-002	Feminino	54 anos
Controle	G1-003	Masculino	56 anos
Controle	G1-004	Feminino	55 anos
Controle	G1-006	Masculino	41 anos
Controle	G1-018	Masculino	47 anos
Controle	G1-019	Masculino	55 anos
Controle	G1-020	Feminino	48 anos
Tabagista	G2-021	Feminino	54 anos
Tabagista	G2-022	Masculino	58 anos
Tabagista	G2-023	Feminino	59 anos
Tabagista	G2-025	Feminino	54 anos
Tabagista	G2-033	Masculino	42 anos
Tabagista	G2-034	Feminino	55 anos
Tabagista	G2-035	Masculino	44 anos
Tabagista	G2-036	Masculino	42 anos

**Fonte:** elaborado pela autora.



**APÊNDICE D – CITOLOGIA EXFOLIATIVA EM MUCOSA ORAL**

**Fonte:** elaborado pela autora.

**Legenda:** Coleta de células esfoliadas da mucosa bucal em diferentes regiões anatômicas: mucosa jugal (A), borda lateral de língua (B) e assoalho de boca (C).

**APÊNDICE E – MÉDIA±DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS  
MICRONUCLEADAS, PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES**

**Grupos de fumantes e não fumantes**

<b>Fumantes</b>	<b>Paciente</b>	<b>CMN</b>
	P1	35
	P2	54
	P3	129
	P4	57
	P5	56
	P6	110
	P7	32
	P8	89
	TOTAL	562
	<b>Média ±DP</b>	<b>70,25±35,32</b>
<b>Não fumantes</b>	<b>Paciente</b>	<b>CMN</b>
	P1	43
	P2	12
	P3	32
	P4	33
	P5	52
	P6	68
	P7	27
	P8	21
	TOTAL	288
	<b>Média ±DP</b>	<b>36,00±17,87</b>

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

**Legenda:** CMN – Célula micronucleada

**Grupos de fumantes e não fumantes X Regiões anatômicas intraorais**

Fumantes	Região	Mucosa Jugal	Borda Lateral de Língua	Assoalho de boca
	Paciente	CMN	CMN	CMN
	P1	15	11	9
	P2	19	24	11
	P3	65	23	41
	P4	11	28	18
	P5	11	13	32
	P6	34	44	32
	P7	7	17	8
	P8	16	35	38
	TOTAL	178	195	189
	<b>Média ±DP</b>	<b>22,25±19,10</b>	<b>24,38±11,19</b>	<b>23,63±13,62</b>
Não fumantes	Região	Mucosa Jugal	Borda Lateral de Língua	Assoalho de boca
	Paciente	CMN	CMN	CMN
	P1	17	19	7
	P2	2	6	4
	P3	7	17	8
	P4	7	21	5
	P5	4	37	11
	P6	31	30	7
	P7	8	17	2
	P8	5	8	8
	TOTAL	81	155	52
	<b>Média ±DP</b>	<b>10,13±9,54</b>	<b>19,38±10,32</b>	<b>6,50±2,78</b>

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

**Legenda:** CMN – Célula micronucleada.

### Grupos de fumantes e não fumantes X Sexo

Fumantes	Sexo	Masculino	Feminino
	Paciente	CMN	CMN
	P1	-	35
	P3	-	129
	P4	-	57
	P6	-	110
	P2	54	-
	P5	56	-
	P7	32	-
	P8	89	-
	TOTAL	231	331
	<b>Média ±DP</b>	<b>57,75±23,50</b>	<b>82,75±44,06</b>
	Não fumantes	Sexo	Masculino
Paciente		CMN	CMN
P1		-	43
P2		-	12
P4		-	33
P8		-	21
P3		32	-
P5		52	-
P6		68	-
P7		27	-
TOTAL		179	109
<b>Média ±DP</b>		<b>44,75±28,89</b>	<b>27,25±13,57</b>

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

**Legenda:** CMN – Célula micronucleada.

### Grupos de fumantes e não fumantes X Faixa etária

	Idade	40-50 anos	50-60 anos	
	Paciente	CMN	CMN	
Fumantes	P1	-	35	
	P2	-	54	
	P3	-	129	
	P4	-	57	
	P6	-	110	
	P5	56	-	
	P7	32	-	
	P8	89	-	
	TOTAL	177	385	
	<b>Média ±DP</b>	<b>59,00±28,62</b>	<b>77,00±40,27</b>	
	Não fumantes	Idade	40-50 anos	50-60 anos
		Paciente	CMN	CMN
		P2	-	12
P3		-	32	
P4		-	33	
P7		-	27	
P1		43	-	
P6		68	-	
P5		52	-	
P8		21	-	
TOTAL		184	104	
<b>Média ±DP</b>		<b>46,00±19,61</b>	<b>26,00±9,70</b>	

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

**Legenda:** CMN – Célula micronucleada.

**APÊNDICE F – MÉDIA±DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DA QUANTIDADE  
DE MICRONÚCLEOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES**

**Grupos de fumantes e não fumantes**

<b>Fumantes</b>	<b>Paciente</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>≥ 4</b>
	P1	18	8	5	4
	P2	22	17	7	8
	P3	58	43	18	10
	P4	27	16	9	5
	P5	25	18	7	6
	P6	52	24	17	17
	P7	17	7	5	3
	P8	33	26	12	18
	TOTAL	252	159	80	71
<b>Média ±DP</b>	<b>31,50 ± 15,45</b>	<b>19,88 ± 11,48</b>	<b>10,00 ± 5,15</b>	<b>8,88 ± 5,77</b>	
<b>Não Fumantes</b>	<b>Paciente</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>≥ 4</b>
	P1	22	11	6	4
	P2	10	1	1	0
	P3	21	9	2	0
	P4	23	9	1	0
	P5	23	19	4	6
	P6	45	16	6	1
	P7	21	5	0	1
	P8	15	4	2	0
	TOTAL	180	74	22	12
<b>Média ±DP</b>	<b>22,50 ± 10,17</b>	<b>9,25 ± 6,07</b>	<b>2,75 ± 2,31</b>	<b>1,50 ± 2,27</b>	

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

**Grupos de fumantes e não fumantes segundo regiões anatómicas intraorais**

	Região	MJ				BLL				AB			
	Paciente	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
<b>Fumantes</b>	P1	10	4	0	1	7	2	1	1	1	2	4	2
	P2	6	8	1	4	9	7	6	2	7	2	0	2
	P3	33	20	9	3	10	9	2	2	15	14	7	5
	P4	7	2	2	0	11	8	4	5	9	6	3	0
	P5	6	5	0	0	4	6	3	0	15	7	4	6
	P6	20	6	2	6	19	12	5	8	13	6	10	3
	P7	2	3	1	1	9	4	2	2	6	0	2	0
	P8	6	5	3	2	15	9	2	9	12	12	7	7
	TOTAL	90	53	18	17	84	57	25	29	78	49	37	25
	Média±DP	11,25± 10,26	6,63± 5,71	2,25± 2,92	2,13± 2,10	10,50± 4,66	7,13± 3,14	3,13± 1,73	3,63± 3,34	9,75± 4,92	6,13± 4,91	4,63± 3,20	3,13± 2,64
	<b>Não fumantes</b>	Região	MJ				BLL				AB		
Paciente		1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
P1		6	5	4	2	12	5	1	1	4	1	1	1
P2		2	0	0	0	5	0	1	0	3	1	0	0
P3		4	2	1	0	11	5	1	0	6	2	0	0
P4		4	3	0	0	17	3	1	0	2	3	0	0
P5		2	1	1	0	15	15	2	5	6	3	1	1
P6		19	9	3	0	20	6	3	1	6	1	0	0
P7		6	2	0	0	15	2	0	0	0	1	0	1
P8		4	0	1	0	5	3	0	0	6	1	1	0
TOTAL		47	22	10	2	100	39	9	7	33	13	3	3
Média±DP	5,88± 5,51	2,75± 3,01	1,25± 1,49	0,25± 0,71	12,50± 5,40	4,88± 4,52	1,13± 0,99	0,88± 1,73	4,13± 2,30	1,63± 0,92	0,38± 0,52	0,38± 0,52	

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

### Grupos de fumantes e não fumantes segundo o sexo

Sexo	M				F			
	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
<b>Paciente</b>	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
P1	-	-	-	-	18	8	5	4
P3	-	-	-	-	58	43	18	10
P4	-	-	-	-	27	16	9	5
P6	-	-	-	-	52	24	17	17
P2	22	17	7	8	-	-	-	-
P5	25	18	7	6	-	-	-	-
P7	17	7	5	3	-	-	-	-
P8	33	26	12	18	-	-	-	-
TOTAL	97	68	31	35	155	91	49	36
<b>Média ±DP</b>	<b>24,25± 6,70</b>	<b>17,00± 7,79</b>	<b>7,75± 2,99</b>	<b>8,75± 6,50</b>	<b>38,75± 19,28</b>	<b>22,75± 15,00</b>	<b>12,25± 6,29</b>	<b>9,00± 5,94</b>
<b>Sexo</b>	<b>M</b>				<b>F</b>			
<b>Paciente</b>	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
P1	-	-	-	-	22	11	6	4
P2	-	-	-	-	10	1	1	0
P4	-	-	-	-	23	9	1	0
P8	-	-	-	-	15	4	2	0
P3	21	9	2	0	-	-	-	-
P5	23	19	4	6	-	-	-	-
P6	45	16	6	1	-	-	-	-
P7	21	5	0	1	-	-	-	-
TOTAL	110	49	12	8	70	25	10	4
<b>Média ±DP</b>	<b>27,50± 11,70</b>	<b>12,25± 6,40</b>	<b>3,00± 2,58</b>	<b>2,00± 2,71</b>	<b>17,50± 6,14</b>	<b>6,25± 4,57</b>	<b>2,50± 2,38</b>	<b>1,00± 2,00</b>

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.



### Grupos de fumantes e não fumantes X Faixa etária

	Idade	40-50 anos				50-60 anos			
	Paciente	1	2	3	≥ 4	1	2	3	≥ 4
<b>Fumantes</b>	P1	-	-	-	-	18	8	5	4
	P2	-	-	-	-	22	17	7	8
	P3	-	-	-	-	58	43	18	10
	P4	-	-	-	-	27	16	9	5
	P6	-	-	-	-	52	24	17	17
	P5	25	18	7	6	-	-	-	-
	P7	17	7	5	3	-	-	-	-
	P8	33	26	12	18	-	-	-	-
	TOTAL	75	51	24	27	177	108	56	44
	Média ±DP	25,00± 8,00	17,00± 9,54	8,00± 3,61	9,00± 7,94	35,40± 18,30	21,60± 13,24	11,20± 5,93	8,80± 5,17
	<b>Não fumantes</b>	P2	-	-	-	-	10	1	1
P3		-	-	-	-	21	9	2	0
P4		-	-	-	-	23	9	1	0
P7		-	-	-	-	21	5	0	1
P1		22	11	6	4	-	-	-	-
P6		45	16	6	1	-	-	-	-
P5		23	19	4	6	-	-	-	-
P8		15	4	2	0	-	-	-	-
TOTAL		105	50	18	11	75	24	4	1
Média ±DP		26,25± 13,00	12,50± 6,56	4,50± 1,91	2,75± 2,75	18,75± 5,91	6,00± 3,83	1,00± 0,82	0,25± 0,50

**Nota:** 4.800 células analisadas, sendo 2.400 do grupo de fumantes e 2.400 do grupo não fumantes.

## ANEXO A – DIRETRIZES PARA AUTORES

**ABCS Health Sciences****ESTRATO A3 (NOVO QUALIS)**

### Submissões

- [Submissões Online](#)
- [Diretrizes para Autores](#)
- [Declaração de Direito Autoral](#)
- [Política de Privacidade](#)

### Submissões Online

Já possui um login/senha de acesso à revista ABCS Health Sciences?

[ACESSO](#)

Não tem login/senha?

[ACESSE A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

### Diretrizes para Autores

#### TIPOS DE CONTRIBUIÇÕES

- **Artigos Originais:** Resultados de pesquisas clínicas, epidemiológicas, experimentais ou teóricas; ensaios teóricos (críticas e formulação de conhecimentos teóricos relevantes); artigos dedicados à apresentação e discussão de aspectos metodológicos e técnicas utilizadas na pesquisa em Saúde.
- **Artigos de Revisão:** Podem ser “revisão sistemática e meta-análise” ou “revisão narrativa/crítica”.  
Revisão sistemática e meta-análise: objetiva responder a pergunta específica e de relevância para a saúde por meio da síntese de resultados de estudos originais publicados, quantitativos ou qualitativos. Deve descrever com pormenores o processo de busca dos estudos originais, os critérios utilizados para seleção daqueles que foram incluídos na revisão e os procedimentos empregados na síntese dos resultados obtidos pelos estudos revisados (que poderão ou não ser procedimentos de meta-análise).  
Revisão narrativa/crítica: apresenta caráter descritivo-discursivo, dedicando-se à apresentação compreensiva e à discussão de temas de interesse científico no campo da Saúde. Deve apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Recomenda-se que esse tipo de revisão seja elaborado por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.
- **Relatos de Caso:** Apresentação e discussão de casos clínicos que apresentem interesse especial e contribuam para a literatura específica. Devem relatar a experiência médica, biológica ou de matérias afins em função da discussão do raciocínio, lógica, ética, abordagem, tática, estratégia, modo, alerta de problemas usuais ou não, que ressaltam sua importância na atuação prática e mostrem caminhos, conduta e comportamento para sua solução.
- **Cartas ao Editor:** Comentários sobre aspectos relevantes nas Ciências da Saúde, estimulando a discussão de novas tendências e controvérsias. Incluem também correspondências de leitores comentando, discutindo ou criticando artigos publicados na ABCS Health Sciences. Neste caso, sempre que possível, uma resposta dos autores ou editores será publicada junto com a carta.

#### FORMATO DO MANUSCRITO

Todos os textos enviados para publicação devem ser redigidos com espaçamento duplo, em fonte Times New Roman tamanho 12, com margens de 3,0 cm e em tamanho A4. Todas as páginas devem vir numeradas no canto superior direito. Cada uma das seguintes seções deve iniciar uma nova página:

- folha de rosto: título em português e inglês (máximo de 20 palavras); sugestão de título curto (máximo de 10 palavras); autores (nomes completos); instituições às quais os autores mantêm vínculo acadêmico; nome, endereço institucional completo, telefone e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência;
- resumo: deve ter até 250 palavras e ser acompanhado por até 6 palavras-chave escolhidas dentre os termos indexados junto aos Descritores em Ciências da Saúde ([decs.bvs.br](http://decs.bvs.br));
- abstract: versão fiel em inglês do resumo, deve ser acompanhado de keywords correspondentes;
- texto principal do artigo, apresentando no máximo 25.000 caracteres (espaços incluídos), dividido conforme o quadro abaixo;
- agradecimentos (podem ser mencionados nomes de pessoas que contribuíram com o trabalho mas não preenchem os requisitos para caracterizar co-autoria, assim como nome de instituições que proporcionaram apoio financeiro ou logístico);
- referências;
- figuras, tabelas e quadros (máximo 6 elementos no total).

O manuscrito deverá respeitar as particularidades de formatação de cada tipo de contribuição:

Tipo de contribuição	Resumo	Divisões do texto principal	Número máximo de referências
Artigo Original, Artigo de Revisão (revisão sistemática ou meta-análise)	Estruturado: Introdução, Objetivo, Métodos, Resultados, Conclusão	Introdução, Métodos, Resultados, Discussão	40
Artigo de Revisão (revisão narrativa/crítica)	Não estruturado	Pode ser dividido livremente	40
Relato de Caso	Estruturado: Introdução, Relato do caso, Conclusão	Introdução, Relato do caso, Discussão	15
Carta ao Editor	Não tem resumo	Sem divisões	05

### FORMATO DAS REFERÊNCIAS

As referências devem ser numeradas em algarismos arábicos de acordo com a ordem em que aparecem no texto, no qual devem ser identificadas com o mesmo número no formato sobrescrito. Os autores devem apresentar as referências seguindo as normas dos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)). Veja abaixo exemplos de formatação das referências:

- Artigo:

Marshall AC, Levine J, Morash D, Silva V, Lock JE, Benson CB, et al. Results of in utero atrial septoplasty in fetuses with hypoplastic left heart syndrome. *Prenat Diagn.* 2008;28(11):1023-8.

- Livro:

Melzack R. The puzzle of pain. New York: Basic Books Inc Publishers; 1973. p. 50-1.

- Capítulo de livro:

Peerless SJ, Hernesniemi JA, Drake CG. Surgical management of terminal basilar and posterior cerebral artery aneurysms. In: Schmideck HH, Sweet WH, editors. Operative neurosurgical techniques. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995. v. 1. cap. 84. p. 1071-86.

- Tese e dissertação:

Pimenta CA. Aspectos culturais, afetivos e terapêuticos relacionados à dor no câncer. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. p. 109-11.

- Documento em formato eletrônico:

International Committee of Medical Journal Editors [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Disponível em: <http://www.acponline.org/journals/annals/01jan97/unifreqr.htm>. Acesso em: 15 jun. 2003.

## FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figuras, tabelas e quadros devem ser apresentados separadamente ou ao final do texto, juntamente com as respectivas legendas e/ou títulos. Todas as imagens devem ser designadas como "Figuras" e numeradas em algarismos arábicos de acordo com a ordem em que aparecem no texto. As imagens devem ser fornecidas em seu formato original (jpg ou tif) de alta resolução (mínimo 300 dpi). Todas as figuras serão publicadas em preto e branco, exceto no caso dos autores se responsabilizarem pelos custos adicionais de impressão colorida. Imagens apresentando pacientes deverão ser submetidas juntamente com termos de aceitação de publicação assinados. Tabelas e quadros devem ser numerados em algarismos romanos de acordo com a ordem em que aparecem no texto.

A ABCS Health Sciences encontra-se no direito de solicitar aos autores correções de formação antes de enviar o manuscrito para avaliação pelos revisores.

## SUBMISSÃO

Pode ser realizada por este portal ([Clique Aqui](#)) ou pelo envio da documentação completa pertinente por correio eletrônico ([abcs@fmabc.br](mailto:abcs@fmabc.br)).

## AVALIAÇÃO

No presente momento todas as comunicações sobre a avaliação do manuscrito submetido estão sendo realizadas exclusivamente por meio do correio eletrônico [abcs@fmabc.br](mailto:abcs@fmabc.br).

## Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Todos os autores assinaram declaração que participaram da execução do trabalho, que o estudo descrito é inédito e que foi submetido exclusivamente à avaliação pela ABCS Health Sciences. Uma cópia digitalizada desta carta será incluída como documento suplementar no passo 4 da submissão.
2. O arquivo do manuscrito apresenta todas as seguintes seções na ordem apresentada: (1) folha de rosto, (2) resumo, (3) abstract, (4) texto principal, (5) referências. As figuras, tabelas e quadros, juntamente com suas respectivas legendas, estão inseridas no FINAL do texto, após as referências.
3. O arquivo do manuscrito submetido está em formato Microsoft Word ou compatível. O texto está em espaço duplo e usa fonte Times New Roman de 12 pontos.

4. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.
5. Os arquivos originais das figuras serão fornecidos como arquivos independentes PDF, PNG, JPG, TIF ou GIF de alta resolução juntamente com os demais documentos complementares no passo 4 da submissão.
6. No caso de trabalhos relatando estudos envolvendo seres humanos ou animais de experimentação será incluída cópia digitalizada do documento de autorização por Comitê de Ética em Pesquisa como documento suplementar no passo 4 da submissão.
7. Os autores estão cientes que no presente momento todas as comunicações sobre a avaliação do manuscrito estão sendo realizadas exclusivamente por e-mails enviados ao autor para correspondência. Assim, este autor deverá incluir *abcs@fmabc.br* na lista de endereços eletrônicos seguros em seu provedor de e-mail. No caso de alguma mensagem da revista não ser respondida pelo autor para correspondência em um prazo máximo de 3 semanas, o manuscrito poderá ser reprovado por inatividade.
8. Os autores estão cientes que o manuscrito será avaliado em processo de revisão por pares, recebendo pareceres de avaliadores externos anônimos independentes escolhidos pelo corpo editorial.

## Declaração de Direito Autoral

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

1. Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob uma licença Creative Commons CC BY que permite o compartilhamento e adaptação do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
2. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

## Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 2357-8114

## ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOMORFOMÉTRICA DO DANO GENOTÓXICO EM PACIENTES COM FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER BUCAL

**Pesquisador:** Igor Iuço Castro da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50957615.1.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CAMPUS DE SOBRAL

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.403.786

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Prof. Igor Iuço Castro da Silva sobre a validade do teste do micronúcleo no rastreamento de alterações citogenéticas iniciais e possíveis associações com o consumo de tabaco e etanol. Tem por objetivo pesquisar a relevância do teste do micronúcleo em células da mucosa bucal através da avaliação citomorfométrica do dano genotóxico em pacientes com os principais fatores de risco (álcool e/ou fumo) para o câncer bucal. A amostra será composta por 160 pacientes da Clínica Odontológica a UFC-Sobral, os quais, serão examinados e realizada coleta para citologia esfoliativa de mucosa bucal, língua e soalho de boca. A análise será feita através da coloração histoquímica de PAS e contra-coloração por fucsina-fast green para evidenciação de micronúcleos. As lâminas serão lidas por um único avaliador e a citomorfometria será realizada com o programa Image Pro-Plus 6.0, traçando-se uma média representativa da frequência de micronúcleos por lâmina citológica. Os dados paramétricos serão calculados por meio do programa GraphPad InStat 3.10 usando One-way Analysis of Variance (ANOVA) e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer. O nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) será aplicado para todos os testes estatísticos.

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**Fax:** (85)3223-2903

**E-mail:** comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.403.786

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo primário:

Determinar se o teste do micronúcleo em células da mucosa bucal pode ser um biomarcador útil na avaliação citomorfométrica do dano genotóxico em pacientes com fatores de risco para o câncer bucal.

Objetivo Secundário:

- 1- Traçar o perfil populacional dos pacientes atendidos na Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará, Sobral/CE, com relação às variáveis demográficas: sexo, cor da pele, idade e exposição a fator de risco para o câncer bucal (tabagismo e/ou etilismo);
- 2- Realizar a detecção da frequência de células descamadas de mucosa oral apresentando micronúcleos, usando como ferramentas diagnósticas o exame citopatológico e a análise citomorfométrica;
- 3- Discutir a potencial etiopatogênese isolada ou em sinergismo dos fatores de risco para o câncer bucal com a frequência aumentada de micronúcleos, de acordo com sua significância estatística;
- 4- Contribuir para estudos científicos de ordem citogenética em Odontologia relativos ao diagnóstico precoce ou subclínico de processos neoplásicos, ainda escassos na população da Região Nordeste do Brasil.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa é de baixo risco visto que a coleta de material será realizada através de swab, um método não invasivo.

Quanto aos benefícios, este estudo poderá contribuir para o diagnóstico precoce de alterações celulares em pacientes com fatores de risco para o desenvolvimento do câncer oral.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo prospectivo longitudinal que prevê a triagem de 160 pacientes a serem atendidos no período compreendido entre março e maio de 2016 na Clínica Odontológica-UFC-Sobral.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador apresentou ao comitê: projeto, carta de encaminhamento, folha de rosto devidamente preenchida e assinada, declarações de concordância dos participantes do projeto, cronograma, orçamento, autorizações do laboratório de Histologia e da Clínica Odontológica assinadas pelo diretor do Campus Sobral, currículo Lattes do pesquisador principal e TCLE.

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
**Bairro:** Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3366-8344 **Fax:** (85)3223-2903 **E-mail:** comepe@ufc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ**



Continuação do Parecer: 1.403.786

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu a todas as solicitações de ajuste. Não há pendência ética nem documental.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_616660.pdf	29/12/2015 00:40:22		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Respostapendenciascepufc.pdf	29/12/2015 00:39:20	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.pdf	29/12/2015 00:38:17	Igor luco Castro da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/12/2015 00:37:14	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	RespostaPendenciaCEP.pdf	11/11/2015 19:46:46	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaFilipe.pdf	28/10/2015 21:05:37	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhoderostoassinada.pdf	28/10/2015 21:05:02	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Outros	PedidodeavaliacaoCEPUFC.pdf	27/10/2015 13:33:59	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Outros	Declaracaodeusoespecifico.pdf	27/10/2015 13:33:01	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Outros	Declaracaodetornarpublico.pdf	27/10/2015 13:32:01	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaAnderson.pdf	27/10/2015 13:25:10	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaJann.pdf	27/10/2015 13:24:30	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaVictor.pdf	27/10/2015 13:24:12	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaJoseroberto.pdf	27/10/2015 13:23:28	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartalgor.pdf	27/10/2015 13:22:12	Igor luco Castro da Silva	Aceito
Declaração de	CartadeanuenciaHistologia.pdf	27/10/2015	Igor luco Castro da Silva	Aceito

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**Fax:** (85)3223-2903

**E-mail:** comepe@ufc.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.403.786

Instituição e Infraestrutura	CartadeanuenciaHistologia.pdf	13:20:08	Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartadeanuenciaClinicaOdontologica.pdf	27/10/2015 13:19:30	Igor Iuco Castro da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 04 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**Fax:** (85)3223-2903

**E-mail:** comepe@ufc.br

## ANEXO C – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

### COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU



#### Finalidade:

Conjunto para coloração de Papanicolaou em materiais citológicos ou histológicos.

#### Registro ANVISA:

10097010-104

#### Apresentação:

620503 - HEMATOXILINA HARRIS COR PAPAN FR500mL  
620505 - E A 36 CORANTE PAPANICOLAOU FR 500mL  
620507 - ORANGE G 6 CORANTE PAPANICOLAOU FR 500mL

LB 170106  
Rev. 09 – 06/2018

### 1. INTRODUÇÃO

A citopatologia é uma técnica de diagnóstico que examina células de vários locais do corpo para determinar a causa ou a natureza da doença. Os espécimes de células são processados em lâminas e examinados microscopicamente para o diagnóstico de câncer, condições pré-cancerosas, tumores benignos e algumas doenças infecciosas.

As células para análise citopatológica podem ser obtidas a partir de esfregaços, raspados, aspirações e centrifugação de líquidos para detecção de alterações celulares.

O primeiro teste de citopatologia desenvolvido foi o teste de Papanicolaou, conhecido também como colpocitologia oncótica ou citologia cervical. Essa técnica é a mais utilizada para rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo do útero.

A coloração de Papanicolaou ou segundo Papanicolaou é uma técnica de coloração multicromática desenvolvida por Geórgios Papanicolaou, o "pai" da citopatologia.

Esta técnica utiliza três soluções corantes: a Hematoxilina de Gill (substituída também pela Hematoxilina de Harris), OG-6 e EA-36 ou EA-65.

É um sistema de coloração utilizado para células colhidas por raspagem em cavidades como a vagina, a mucosa bucal, etc, e fluidos com células a partir de derrames de outras cavidades. Deve ser apenas usada *in vitro*.

O mecanismo pelos quais as células são coloridas ainda não é completamente entendido, mas são importantes duas hipóteses: a adsorção e as características de afinidades químicas na coloração. Em ambos os casos, a concentração dos corantes nas soluções e a forma iônica sob as quais se encontram são importantes. Considera-se que as estruturas celulares ácidas tendem a atrair cátions, tanto por adsorção como em reações químicas e as básicas com os radicais aniônicos dos corantes.

O citoplasma, sendo formado por estruturas ácidas e básicas, atrairia combinações de corantes, enquanto o núcleo celular, possuindo ácidos nucleicos, seria predominantemente ácido.

A hematoxilina no método reage com os ácidos nucleicos, resultando em uma coloração azulada nesta estrutura. O segundo corante empregado é o orange G, denominado na técnica de Papanicolaou como OG-6. Com este corante ácido com dois grupamentos sulfônicos os esfregaços, nos citoplasmas presentes, são coloridos em seus componentes básicos. A etapa final é efetuada com uma de três variações de soluções corantes desenvolvidas por Papanicolaou: EA-36, EA-50 e EA-65.

A solução EA-50 tem sido abandonada, passando a ser aplicada apenas as colorações com EA-36 ou o EA-65. Estas soluções corantes apresentam formulações similares, apenas variando a concentração do corante Light Green. A concentração deste corante na solução EA-36 é o maior do que na solução corante EA-65 em 50%.

Como o Light Green é um corante ácido, possuindo também dois radicais sulfônicos, se fixa predominantemente nos componentes básicos do citoplasma. O segundo corante presente nas soluções corantes EA-36 ou EA-65 é a Eosina amarelada, a qual é uma tetrabromo fluoresceína. Este corante tem como finalidade a coloração de grânulos oxifílicos do citoplasma, que têm alta afinidade por corantes ácidos.

O uso dos corantes escarlate de Biebrich e pardo Bismark fica restrito à área da citologia, pois coram pouco as estruturas básicas do citoplasma e o resultado final da coloração passa a ser o produto conjunto destes corantes. No caso do escarlate de Biebrich, este possui certa afinidade pelas estruturas do núcleo, entretanto, torna-

se pouco significativo quando usado conjuntamente com a hematoxilina.

A coloração de Papanicolaou é considerada como padrão internacional de coloração cérvico-vaginal, podendo ser usada igualmente em outros materiais. No esfregaço cérvico-vaginal permite uma boa avaliação dos padrões inflamatórios, hormonais e oncológicos.

### 2. COMPOSIÇÃO

Formulação da Hematoxilina de Harris*	Concentração/L
Álcool Etilico Anidro	50mL
Hematoxilina	7,0g
Oxido de Mercúrio Vermelho	2,5g
Sulfato de Alumínio e Potássio	100g
Água Deionizada	1000mL

Formulação do EA-36*	Concentração/L
Ácido Fosfotungstico	2g
Álcool Etilico Anidro	900mL
Eosina amarelada	2,25g
Light Green	2,25g
Marron Bismark Y	0,5g
Água Deionizada	100mL
Sol. Sat. Carbonato de Lítio	0,5mL

Formulação do Orange G-6*	Concentração/L
Ácido Fosfotungstico	0,15g
Álcool Etilico	800mL
Orange G	5g
Água Deionizada	200mL

\* A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

### 3. AMOSTRA

#### a- Tipos de amostras

- Amostras de material cérvico-vaginal em lâminas fixadas em álcool etílico 70-90%, isopropílico a 70-90% ou polietilenoglicol (este deve ser eliminado do esfregaço antes da coloração por meio de imersão em álcool etílico).

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

#### b- Critérios de rejeição

Recusar as amostras entregues sem estarem fixadas ou que não disponham de identificação da lâmina e/ou data de coleta.

### 4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

#### a- Princípio

O material fixado em lâmina é submetido a ação de uma série de diluições de etanol (absoluto até 70%), submetido a ação de um corante nuclear (Hematoxilina de Harris) posteriormente a ação de álcoois, e corantes citoplasmáticos (orange G e EA36) e finalmente a ação desidratante de álcool e xilol.

**b- Armazenamento e estabilidade**

Para fins de transporte e armazenamento, o produto pode permanecer em temperatura ambiente.

Recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

**c- Precauções e cuidados especiais**

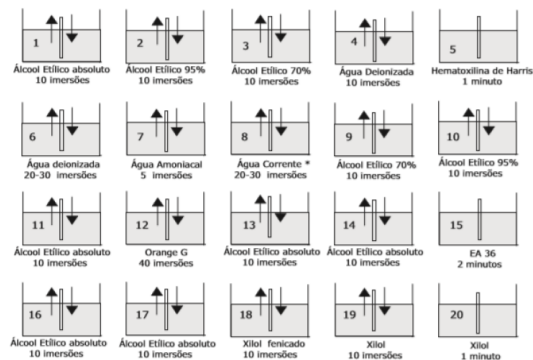
- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar produto com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

**4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)**

- Bico de Bunsen;
- Lâminas e laminulas;
- Cubas de Coplin ou similares;
- Etanol absoluto, 96 e 70%;
- Xilol ou similar;
- Água amoniacal (5 gotas de amoníaco para cada 500 mL de água deionizada);
- Água destilada ou deionizada com condutividade inferior a 0,5 mS/cm;
- Xilol fenicado (10 mL de fenol para cada litro de xilol) ou xilol-etanol absoluto a 1:1;
- Bálsamo do Canadá ou resina sintética similar;
- Microscópio.

**5. PROCEDIMENTO TÉCNICO**

a- Técnica sugerida



b- Montagem - Montar as lâminas com bálsamo do Canadá ou resina sintética para fixar a laminula, procurando evitar a formação de bolhas de ar entre lâmina e laminula.

**c- Precauções e cuidados especiais**

- Esfregaços muito delgados ou muito espessos dificultam o processo de coloração;
- Problemas frequentes decorrem da má fixação do material.

- Outro problema frequentemente encontrado é a alteração da coloração pela utilização de sprays de polietilenoglicol para fixação. Estes problemas podem ser resolvidos imergindo as lâminas por 15 minutos em álcool 96°C, mergulhando as lâminas a cada 5 minutos. Repetir esta operação em nova cuba com álcool 96°C.

- Não utilizar corantes que se apresentem contaminados ou com precipitados;
- Quaisquer sinais de hidratação do álcool etílico absoluto ou xilol implicam em substituição destes componentes;
- Conforme a rotina diária, estabelecer cronograma de troca dos corantes, normalmente ocorrendo quando as colorações começam a ficar mais fracas.

**6. RESULTADOS**

As células são inspecionadas usando microscopia de luz para identificar anormalidades, como alterações de características morfológicas ou nucleares.

**7. LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)

Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
- Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações.
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Não utilizar água tamponada adequada para a realização da coloração.
- Erro na conservação dos reagentes.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiras plásticas de micropipetador reaproveitadas.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como tubos para a reação.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Tempo excessivo ou insuficiente de coloração.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.
- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA etc.).

**8. CONTROLE DA QUALIDADE**

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection) ou derivadas.

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado
Células superficiais	Citoplasma rosa, núcleo piquinóticoescuro
Células intermediárias e profundas	Citoplasma azul, núcleo róseo
Células glandulares	Células arredondadas com citoplasma azul e núcleo róseo
Hemácias	Vermelhas
Polimorfonucleares	Azuis com núcleo visível
Flora normal	Bacilos e cocos azuis a roxos
Corantes não utilizados	Hematoxilina de Harris: cor púrpura intenso EA36: cor violeta Orange G6: cor Laranja

## **ANEXO D – INSTRUÇÕES PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO (REGIMENTO INTERNO DO PPGB)**

**Art. 42°.** A avaliação do exame de qualificação verificará os seguintes critérios:

I - Apresentação do tema, revisão ampla, atualizada e crítica da literatura e delimitação do problema; II - Argumentação quanto à justificativa denotando a relevância teórica e prática da proposta;

III - Redação clara e precisa dos objetivos e sua coerência com o problema da pesquisa;

IV - Coerência metodológica relativamente aos objetivos de pesquisa, e uso apropriado dos materiais e métodos, na organização e na análise de dados;

V - Uso da linguagem consoante a norma culta da língua e o estilo de redação científica;

VI - Habilidade de síntese, coerência e coesão lógica do texto (ligação entre capítulos/seções/frases/parágrafos);

VII - Viabilidade do cronograma do projeto tendo em vista o prazo de conclusão do curso de mestrado (24 meses).

**Art. 55°.** A Comissão Examinadora que julgará a dissertação será constituída de especialistas credenciados com título de doutor ou equivalente, aprovada pelo Colegiado do Programa e designada pelo Coordenador, sendo composta de no mínimo 3 (três) membros, sendo um externo ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

**Parágrafo único** - Poderão participar da Comissão Examinadora professores ativos e aposentados do Programa ou de outros Programas de Pós-Graduação afins, além de profissionais com titulação pertinente.

**Art. 56°.** O trabalho de dissertação deve seguir as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC, apresentando: introdução, objetivos, referencial teórico, metodologia, resultados e conclusão.

§ 1°. O trabalho de dissertação também poderá constar de um artigo em inglês, precedido de introdução, objetivos e referencial teórico em português e de acordo com as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC.

§ 2°. A apresentação oral da defesa de dissertação deverá ser realizada no idioma português e o aluno terá 45 minutos para apresentar seu trabalho em seção pública.

§ 3°. A avaliação da defesa de dissertação verificará os mesmos critérios constantes no **Art. 42°**, com exceção do item VII.

**Art. 57°.** A Comissão Examinadora indicará a aprovação ou não da dissertação baseando-se na avaliação do trabalho entregue e na sua apresentação pública, atribuindo ao candidato uma das seguintes menções: aprovado ou reprovado.

§ 1°. Foi considerado aprovado ou reprovado o aluno que receber esta menção pela maioria dos membros da comissão julgadora;

§ 2°. O aluno que recebeu a menção reprovado é cancelado de imediato do programa;

§ 3°. No caso de modificação sugerida na dissertação ou na tese, a ocorrência é registrada na ata de defesa e o aluno deve efetuar a modificação dentro do prazo máximo de 90 (noventa) dias para reapresentação do referido trabalho, através de parecer fundamentado.

§ 4°. Após a aprovação final o aluno entregará à Secretaria do Programa um exemplar da dissertação em meio digital (CD ROM), no formato word e pdf, que deverá estar de acordo com as normas vigentes para apresentação de dissertações