UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CRISTIANE ALVES PAZ DE CARVALHO

**Frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa
bucal de pacientes obesos**

BAURU
2012

CRISTIANE ALVES PAZ DE CARVALHO

**Frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa
bucal de pacientes obesos**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira

Versão Corrigida

BAURU
2012

C253f   Carvalho, Cristiane Alves Paz de
Frequência de micronúcleos em células
esfoliadas da mucosa bucal de pacientes
obesos/Cristiane Alves Paz de Carvalho. – Bauru,
2012.
96 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena de
Carvalho Sales Peres

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Tostes
Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no
Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de
Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 106/2011
Data: 31/08/2011

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Domingos e Neusa,

Por todos os valores ensinados, pelos esforços para a minha formação profissional, pelo exemplo de determinação, paciência e simplicidade, pelo apoio e incentivo nas dificuldades. Muito obrigada por sempre acreditarem em minha capacidade.

Agradeço pelo amor, carinho e preocupação.

Amo vocês!!!

Ao meu esposo,

Fábio,

Pelo amor, companheirismo, palavras de carinho e afeto, pela união. Pela parceria completa e verdadeira, pelo apoio nas horas difíceis, por fazer minha vida tão feliz...

Agradeço muito a Deus por tê-lo colocado em minha vida!

Amo você!!!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

Que está sempre presente em minha vida. Agradeço pela saúde, pelo amparo nos momentos de dificuldades e pelas graças concedidas.

Aos meus sogros,

Fernando e Aparecida,

Pelo grande carinho, pelos conselhos, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

Ao meu cunhado,

Ricardo,

Por sua amizade, consideração, afeto e pela preocupação comigo e com o Fábio. Agradeço a Deus por sua vida e agradeço a você por tudo que já fez por nós. Agradeço ainda os deliciosos momentos que passamos juntos. Muito obrigada!

Ao meu irmão e cunhada,

Rogério e Ana Paula

Pelo carinho e por momentos agradáveis que desfrutamos juntos.

Às cunhadas **Gláucia e Fernanda**, aos cunhados **Eduardo e Luís Fernando** e aos sobrinhos **Maria Fernanda, Ana Carolina, Valentina, Isabela, Bruna e Felipe** pelos bons momentos compartilhados.

À minha orientadora,

Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres,

Muito obrigada por tudo! Todo o estímulo, os ensinamentos, pelo exemplo de determinação e competência. Pela atenção e disponibilidade, pela amizade, por acreditar em minha capacidade, por todo o aprendizado durante este período e, principalmente por me permitir compartilhar de seus conhecimentos. Agradeço pela paciência e incentivo em momentos difíceis. Foi muito prazeroso, produtivo e gratificante tê-la como orientadora.

À minha coorientadora,

Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira,

Agradeço pelos ensinamentos durante o doutorado. Ensinamentos que levarei por toda vida e não apenas na carreira de docente. Muito obrigada por toda atenção e pelos momentos agradáveis compartilhados.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos

Pelo estímulo e pelas reflexões sobre o quão importante é estabelecer metas na vida, traçar objetivos e trilhar o caminho para alcançá-los.

Ao Prof. Dr. Arsenio Sales Peres,

Pela contribuição para meu crescimento desde o mestrado. Pelos momentos em que abriu as portas de sua sala “apenas” para escutar algumas dificuldades que passamos, mostrando-se sempre muito atencioso. Muito obrigada pelo carinho, e pelos momentos descontraídos.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira,

Muito obrigada por ser sempre atencioso e disponível. Um exemplo a ser seguido pela serenidade e tranquilidade. Agradeço seus ensinamentos e os momentos descontraídos.

À **Prof^a. Dr^a. Eliana Maria Minicucci,**

Agradeço muito toda sua atenção e ensinamentos que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho, além da disponibilidade. Agradeço muito por tê-la conhecido e pelos momentos agradáveis que pudemos compartilhar.

À **Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Favero Salvadori,**

Pela simpatia e por me permitir utilizar o Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, onde aprendi a realização da técnica utilizada neste trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara,**

Pela simpatia e pelos ensinamentos durante o doutorado.

Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro,**

Pelos ensinamentos e oportunidade de assistir suas aulas durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À **Prof^a. Dr^a. Magali de Lourdes Caldana,**

Pela gentileza e simpatia sempre.

Aos colegas pós-graduandos da Patologia, **Heliton, Diego, Karen, Kellen, Ana Regina, Natália, Mariana, Eloísa, Francisco** e da Saúde Coletiva, **Patrícia Grec, Juliane, Angela, Adriana, Haroldo, Paty Matos, Aline, Águeda e Joselene** pelas atividades compartilhadas e por todo apoio durante o doutorado e em especial ao **Fábio** pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Patologia da FOB/USP, **Cristina, Fatiminha e Marina** por toda atenção, simpatia e pelo ambiente agradável que sempre proporcionam. **Fatiminha** agradeço ainda toda sua disponibilidade e apoio no laboratório.

Às funcionárias do Departamento de Saúde Coletiva da FOB/USP, **Rosa, Sílvia, Marta e Helena**, pela atenção, preocupação e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Serviço de Biblioteca da FOB/USP, em especial à **Maristela**, por toda atenção e educação.

Aos voluntários participantes deste estudo, pela fundamental e efetiva colaboração.

À Universidade de São Paulo, por meio do reitor **Prof. Dr. João Grandino Rodas** e à Faculdade de Odontologia de Bauru, por meio de seu diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos nesta casa e por fazer parte da minha formação.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, por meio de seu presidente **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

À **Instituição de Fomento** CNPQ (processo nº. 142240/2009-5), pelo auxílio financeiro durante o curso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e deste doutorado.

Muito Obrigada!

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E, para se chegar, aonde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Anônimo

RESUMO

A crescente incidência da obesidade e suas comorbidades constituem-se em um grande desafio para a saúde no mundo. Além da doença cardiovascular e do diabetes, dados epidemiológicos demonstraram ligação entre a obesidade e diversos tipos de câncer. As alterações citogenéticas tem sido utilizadas como biomarcadores para identificação de danos celulares. Este estudo teve como objetivos: comparar a frequência dos tipos celulares (células basais e diferenciadas), anormalidades nucleares (células binucleadas, picnóticas, cariorréticas, cariолíticas e com cromatina condensada) e de danos celulares (micronúcleos e brotos nucleares) de células bucais esfoliadas em um grupo de obesos (teste) e em um grupo de indivíduos com peso normal (controle). A amostra foi composta por 30 indivíduos, sendo o grupo teste constituído por indivíduos obesos mórbidos ($n=15$) e o grupo controle por indivíduos com peso normal ($n=15$). A classificação do peso corporal foi feita de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC); um questionário forneceu informações sobre exposições ocupacionais e não ocupacionais; hábitos e dieta. As células da mucosa bucal foram coletadas da mucosa jugal, de ambos os lados, processadas e analisadas microscopicamente. Para cada indivíduo foram avaliadas 1000 células para a caracterização dos tipos celulares (basal e diferenciada) e alterações nucleares (células binucleadas, picnose, cariólise, cariorrexe, cromatina condensada) e 2000 células diferenciadas para verificar a presença de danos celulares (micronúcleos e brotos nucleares). Os dados foram processados e analisados estatisticamente, por meio do teste de Mann Whitney. Considerou-se o nível de significância de 5% ($p<0,05$). Observaram-se diferenças nas frequências de tipos celulares e anomalias nucleares para os dois grupos, porém estas diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Quanto ao tipo de dano celular, notou-se a mesma frequência de brotos nucleares para ambos os grupos, entretanto, a frequência de micronúcleos foi maior para o grupo obeso ($p<0,001$). Neste estudo, verificou-se maior frequência de micronúcleos nas células esfoliadas da mucosa bucal em indivíduos obesos mórbidos que em indivíduos com peso normal. Este achado sugere que a obesidade possa levar à maior ocorrência de alterações citogenéticas. Palavras-chave: Obesidade. Câncer. Teste para micronúcleos. Células bucais esfoliadas.

ABSTRACT

Micronuclei frequency in exfoliated buccal cells of obese patients

The increasing incidence of obesity and its co-morbid conditions poses a great challenge to global health. In addition to cardiovascular disease and diabetes, epidemiological data demonstrate a link between obesity and multiple types of cancer. The buccal micronucleus cytome assay has been used as a biomarker for identification of cell damage. This study aimed to compare the frequency of cell types (basal and differentiated), nuclear anomalies (binucleated, pyknotic, karyorrhectic, karyolytic and condensed chromatin cells), and cell damage (micronuclei and nuclear buds) in exfoliated buccal cells in a group of obese (test) and a group of normal weight (control). The sample consisted of 30 subjects, the test group comprised of individuals with morbid obesity ($n = 15$) and a control group of normal weight ($n = 15$). The classification of body weight was made according to Body Mass Index (BMI), a questionnaire provided information on occupational exposures and non-occupational, lifestyle and diet. The oral mucosa cells were collected from the buccal mucosa, on both sides, processed and analyzed microscopically. For each individual 1000 cells were evaluated for the characterization of cell types (basal and differentiated) and nuclear abnormalities (binucleated cells, pyknosis, karyolysis, karyorrhexis, condensed chromatin) and 2000 differentiated cells for the presence of cellular damage (micronuclei and nuclear buds). The data were processed and statistically analyzed using the Mann-Whitney test. We considered the significance level of 5% ($p < 0.05$). Differences were observed in the frequencies of cell types and nuclear abnormalities in both groups, but these differences were not significant ($p > 0.05$). Regarding the type of cell damage, we noticed the same frequency of nuclear buds for both groups, however, the frequency of micronuclei was higher in the obese group ($p < 0.001$). In this study, there was a higher frequency of micronuclei in exfoliated cells of buccal mucosa in morbidly obese individuals than in individuals with normal weight. This finding suggests that obesity may lead to higher rates of cytogenetic changes.

Key words: Obesity. Cancer. Micronucleus test. Exfoliated buccal cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal: células basais, células diferenciadas, células diferenciadas justapostas, células binucleadas, células com picnose, cariólise e cariorrexe..... 57
- Figura 2 - Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal: célula com cromatina condensada, brotos nucleares e micronúcleos..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de Massa Corporal (IMC), de acordo com a Organização Mundial da Saúde.....	42
Tabela 2 - Síntese da sequência realizada para a realização do método de Feulgen/Fast green, para a coloração das lâminas.....	44
Tabela 3 - Caracterização dos grupos, obeso e controle, quanto à idade e IMC.....	51
Tabela 4 - Caracterização dos grupos, obeso e controle, quanto à etnia, exposição a agentes químicos e físicos, uso de tabaco, medicamentos, ingestão de álcool e ocorrência de alterações genéticas na família.....	53
Tabela 5 - Distribuição de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular no grupo controle.....	54
Tabela 6 - Distribuição de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular no grupo de obesos.....	54
Tabela 7 - Comparação das frequências de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular nos grupos controle e obeso.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	OBESIDADE	23
2.2	OBESIDADE E CÂNCER	26
2.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CÉLULAS EPITELIAIS ESFOLIADAS E TESTE DE MICRONÚCLEOS	30
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	41
4.2	AMOSTRA	41
4.3	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	42
4.4	COLETA E PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL	43
4.5	ANÁLISE CITOGENÉTICA	44
4.6	QUESTIONÁRIO	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	51
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS (OBESO E CONTROLE)	51
5.2	ANÁLISE CITOGENÉTICA	53
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE	85
	ANEXOS	89

1 Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

O aumento na prevalência da obesidade tem sido observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, em crianças e adultos. A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que pode comprometer a saúde do indivíduo e acarretar problemas como alterações metabólicas, dificuldades respiratórias e do aparelho locomotor (WHO, 1998; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR, 2003), além de constituir fator de risco para doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II e câncer (WANG; GOALSTONE; DRAZNIN, 2004; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2009; WHO, 2011).

Evidências epidemiológicas do aumento da obesidade e patologias associadas tem despertado o interesse por pesquisas sobre o papel do tecido adiposo como um participante ativo no controle de processos fisiológicos e patológicos do organismo. O tecido adiposo comporta-se como um órgão endócrino, pois produz hormônios, fatores de crescimento e citocinas que podem perturbar os mecanismos de regulação do crescimento, morte e proliferação celular. Adicionalmente, é um órgão secretório ativo, que envia e responde aos sinais que modulam o apetite, o gasto energético, a sensibilidade à insulina, o sistema reprodutivo, metabolismo ósseo, inflamação e imunidade (MARTÍ; MARCOS; MARTÍNEZ, 2001; FANTUZZI, 2005; FONSECA-ALANIS et al., 2006; TRAYHURN, 2007; THE LANCET, 2012).

A obesidade é caracterizada como estado de inflamação crônica de baixo grau. Adicionalmente, evidências científicas suportam a hipótese de que a inflamação crônica é fundamental nos mecanismos relacionados às suas complicações (LYON; LAW; HSUEH, 2003; SBARBATI et al., 2006), além de promover a indução de carcinogênese via proliferação celular e reparação tecidual. Focos inflamatórios representam uma fonte contínua de oxigênio reativo e de nitrogênio, que por sua vez podem induzir a lesões do DNA (JACKSON; LOEB, 2001; SANDER et al., 2008).

Estudos epidemiológicos relataram a associação entre a obesidade e o risco e prognóstico de vários tipos de câncer. Embora os mecanismos pelos quais a obesidade induza ou promova a carcinogênese não estejam bem esclarecidos, sabe-se que variam de acordo com a localização do câncer. Dentre os mecanismos propostos para esclarecer esta associação, há a hipótese de que o processo

inflamatório possa ser um fator desencadeador da carcinogênese (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; CALLE; KAAKS, 2004; OSÓRIO-COSTA et al., 2009).

As neoplasias decorrem da perda ou da inativação (por mutação ou por herança de uma cópia defeituosa) de ambas as cópias dos genes supressores de tumores (mutação recessiva), frequentemente associados à ativação excessiva. Assim, desencadeiam retroalimentações ativas e inativas que levam à proliferação celular exacerbada e desordenada, o que confere ao fenótipo celular condições aberrantes, mostradas, por exemplo, por meio dos micronúcleos (GISSELSSON et al., 2001).

A presença de micronúcleos nas células em proliferação é um sensível marcador de dano cromossômico espontâneo ou induzido (MATEUCA et al., 2006). De fato, como um micronúcleo pode ser formado tanto de fragmentos de cromossomos acêntricos como pelo atraso de cromossomos inteiros durante a divisão celular, a análise de micronúcleos permite a avaliação de eventos clastogênicos (induzidos por quebra da cadeia dupla) e aneuploidogênicos (induzidos por má segregação cromossômica) ao mesmo tempo (SCARPATO et al., 2011).

O teste de micronúcleos em células bucais esfoliadas é um método minimamente invasivo para estudar dano ao DNA, instabilidade cromossômica, morte celular e o potencial regenerativo do tecido da mucosa bucal humana. As células com micronúcleos são células que se caracterizam pela presença de um núcleo principal e outras estruturas nucleares menores, denominadas micronúcleos (THOMAS et al., 2009).

Assim, amostras de células da mucosa bucal tem sido utilizadas para investigar o impacto da nutrição, estilo de vida, exposição tóxica, sobre o dano ao DNA e morte celular (SARTO et al., 1990; OZKUL et al., 1997; CASARTELLI et al., 2000; THOMAS et al., 2009).

É um método eficiente, de baixo investimento e um modo confiável para mensurar a instabilidade genética em grandes populações (CEPPI et al. 2010). A literatura científica a respeito de biomarcadores de dano ao DNA em estudos populacionais mostra um rápido aumento no uso deste biomarcador (BONASSI et al., 2005). Isto se justifica pelas evidências que relacionam a frequência de micronúcleo às exposições tóxicas ambientais e ocupacionais, estilo de vida, perfil

---

genético, câncer e a ocorrência de doenças (FENECH, 2007; RICKES et al., 2010; NERSESYAN; CHOBANYAN, 2010).

Há um esforço crescente em avaliar os impactos ambientais, genéticos e de mudança no estilo de vida sobre a estabilidade genômica na população humana. A importância do teste de micronúcleo vem de sua vantagem sobre os demais testes existentes, pois é relativamente fácil de realizar, fornecendo resultados com forte suporte estatístico (FENECH et al., 1999).

As duas principais técnicas desenvolvidas para o teste de micronúcleo são realizadas em linfócitos sanguíneos ou em células epiteliais esfoliadas. Paralelamente aos primeiros estudos da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos, alguns pesquisadores se interessaram pelo estudo da frequência de micronúcleos em outros tecidos.

Para a análise citogenética de células esfoliadas em cavidade bucal, podem-se coletar células da mucosa jugal ou da borda lateral da língua, pois estes tecidos epiteliais estão em constante processo de divisão celular, com renovação do tecido pela descamação das células superficiais. As células epiteliais esfoliadas não se dividem mais, mas refletem anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células na camada basal (THOMAS et al., 2009).

O teste de micronúcleo em células da mucosa bucal é um dos métodos menos invasivos para mensurar dano ao DNA em humanos. Este teste foi proposto em 1983 e continua a ganhar em popularidade como um biomarcador de dano genético, além de ser utilizado como um alerta precoce de risco potencial de desenvolver problemas de saúde em longo prazo (STICH; ROSIN, 1983; AU, 1991).

Bloching et al. (2000) sugeriram que a presença de micronúcleos na mucosa bucal pode ser um preditor do risco de câncer nas vias aerodigestivas superiores, incluindo as fases pré-malignas, como a leucoplasia oral (BLOCHING et al., 2000). Estudos encontraram maior frequência de células bucais com micronúcleos em pacientes com câncer de mama e de útero e seus parentes de primeiro grau, em relação aos grupos controles (RAJESWARI et al., 2000; NERSESYAN; ADAMYAN, 2004).

Ainda não está claro na literatura científica se uma elevada frequência de micronúcleos em certos tecidos, como o epitélio oral, pode ser um preditor para maior risco de câncer apenas na cavidade oral, limitado ao epitélio do trato digestivo

superior ou pode ser projetada para vários tipos de câncer em outras partes do corpo (HOLLAND et al., 2008).

Diante do exposto, verifica-se que a frequência de micronúcleos é um fator indicativo de que alterações genéticas podem estar ocorrendo no organismo humano, diretamente relacionado à probabilidade da ocorrência de alterações do DNA celular, sendo a alteração nuclear relacionada ao processo de carcinogênese.

De acordo com as informações supracitadas e considerando-se a relação entre o processo inflamatório, a obesidade e a carcinogênese, torna-se relevante conhecer a frequência de alterações citogenéticas em células bucais esfoliadas de indivíduos obesos, tendo em vista que não há estas informações na literatura científica.

2 Revisão de Literatura

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE

Mudanças no padrão alimentar e nutricional tem sido observadas, qualitativa e quantitativamente, em virtude do crescente desenvolvimento econômico e das mudanças no perfil demográfico e epidemiológico da população (POPKIN, 1994; PRAKASH, 2011). Adicionalmente, a urbanização e o estilo de vida parecem estar associados ao aumento significativo da mortalidade e morbidade atribuíveis às doenças relacionadas ao estado nutricional e ao estilo de vida, o que tem contribuído para a emergência da obesidade e doenças associadas (PRAKASH, 2011).

A obesidade pode ser definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal, geralmente acompanhado por profundas alterações nas funções fisiológicas, com possibilidade de prejuízo à saúde. Estas alterações, que dependem da distribuição regional do tecido adiposo, podem aumentar o risco de desenvolvimento de diversas doenças e o risco de morte prematura. Além da perspectiva de prejuízo à saúde, a obesidade pode estar associada à redução da qualidade de vida, estigmatização social e discriminação (NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, 1998; KOPELMAN, 2000; FRIEDMAN, 2000; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2001; CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION, 2010).

Sabe-se que a etiologia da obesidade é multifatorial, entretanto as causas geralmente estão relacionadas ao desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Observa-se, mundialmente, o aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura, sal e açúcares, mas pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes. Aliado a isto, nota-se a diminuição da atividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, mudanças nos modos de transporte e urbanização crescente (WHO, 2011).

A obesidade tem afetado crescente número de indivíduos e começou a substituir a desnutrição e as doenças infecciosas como contribuição mais significativa para os problemas de saúde (KOPELMAN, 2000). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo há mais

indivíduos com sobrepeso ou obesidade que indivíduos desnutridos ou com baixo peso (WHO, 2006).

Embora deva ser considerada uma doença, a obesidade tem importância maior como fator de risco para uma série de doenças não transmissíveis crônicas (WHO, 2000). Evidências epidemiológicas tem ligado a obesidade ao aumento da mortalidade e do risco para diversas doenças crônicas, como doença cardiovascular, diabetes tipo II, hipertensão, acidente vascular cerebral, distúrbios respiratórios, certos tipos de câncer, doença da vesícula biliar, osteoartrite e osteoporose (ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS, 1983; EUA NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR, 2003; WANG; GOALSTONE; DRAZNIN, 2004; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2009; WHO, 2011).

Em setembro de 2011, membros da Organização das Nações Unidas (ONU) reuniram-se em Nova Iorque para a primeira assembleia sobre doenças não transmissíveis, intitulada “High-Level Meeting of the UN General Assembly on non-communicable diseases” e relataram que o aumento global da obesidade será o maior desafio a ser enfrentado no século XXI. Ressaltou-se que há grande procura mundial por respostas sobre como reverter a crescente maré de obesidade em adultos e crianças. Destacou-se ainda que muitos países são exemplos excelentes no que se refere à redução das doenças infecciosas e de alguns fatores de risco para doenças não transmissíveis, tais como tabagismo, colesterol alto e hipertensão. No entanto, nenhum país pode servir como exemplo de saúde pública para a redução da obesidade e do diabetes tipo II. (SWINBURN et al., 2011).

A gordura corporal é comumente estimada por meio de um índice que relaciona o peso e a altura, denominado Índice de Massa Corporal (IMC) (KOPELMAN, 2000). É definido pelo peso da pessoa em quilos, dividido pelo quadrado da sua altura em metros (kg/m^2) e, desta forma, considerado de fácil obtenção tanto na prática clínica quanto em inquéritos à população, pois requer apenas a mensuração de peso e altura (WHO, 2000).

O IMC fornece uma medida útil do nível de excesso de peso e da obesidade na população, pois é o mesmo para ambos os sexos e para todas as idades de adultos. No entanto, deve ser considerado como um guia geral, porque não pode corresponder ao mesmo grau de gordura em diferentes indivíduos, não considera a morbidade e mortalidade associadas com graus mais baixos do excesso

de peso e nem o efeito prejudicial da gordura intra-abdominal (KOPELMAN, 2000; WHO, 2011).

Segundo a OMS, IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m² é indicativo de sobrepeso e IMC maior ou igual a 30,0 kg/m² é indicativo de obesidade. O IMC superior a 30,0 kg/m² é ainda categorizado em 3 graus de obesidade: obesidade grau I (entre 30,0 e 34,9 kg/m²); obesidade grau II (entre 35,0 e 39,9 kg/m²) e obesidade grau III (maior que 40,0 kg/m²). Estes pontos de corte são apropriados para identificar a extensão do excesso de peso ou os graus de obesidade em indivíduos ou grupos populacionais (WHO, 2006).

O aumento na prevalência do sobrepeso e da obesidade tem sido observado em todo mundo, sendo que a obesidade mundial mais que duplicou desde a década de 80. De acordo com a OMS, em 2008, 1,5 bilhões de adultos, de 20 anos ou mais, estavam acima do peso. Destes, mais de 200 milhões de homens e aproximadamente 300 milhões de mulheres eram obesos (WHO, 2011).

Nos Estados Unidos, em 2009, a prevalência de obesidade foi de 26,7%, em 27,4% dos homens e 26,0% das mulheres (CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION, 2010). Na Inglaterra, pouco mais de um quarto da população adulta, com idade igual ou superior a 16 anos (26,0%) foi classificada como obesa em 2010 (NHS INFORMATION CENTRE, LIFESTYLES STATISTICS, 2012).

Segundo levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no Brasil em 2011, o excesso de peso e a obesidade aumentaram nos últimos seis anos. De acordo com o estudo, a proporção de pessoas acima do peso no Brasil avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011 (52,6% homens e 44,7% mulheres). No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8% (15,6% homens e 16,0% mulheres) (VIGITEL, BRASIL, 2011).

A obesidade infantil e adulta tem aumentado nos países de alta, média e baixa renda. Diante da possibilidade de prevenção e tratamento, além de sua influência na qualidade de vida, a obesidade pode ser considerada uma grande preocupação para a saúde pública. Além de afetar a morbidade e mortalidade dos grupos populacionais, impõe fardos enormes para a saúde em todo o mundo, com consequências econômicas e sociais em curto e em longo prazo (GORTMARKER et al., 2011).

De acordo com a OMS, pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano em consequência do excesso de peso ou da obesidade. Além disso, 44%

da carga de diabetes, 23% da doença isquêmica do coração e entre 7% e 41% de câncer são atribuíveis ao excesso de peso e obesidade (WHO, 2011).

A epidemia mundial de obesidade resulta da combinação de diversos fatores genéticos, ambientais, psicossociais e suas interferências nos mecanismos fisiológicos de ingestão e gasto de energia. Embora a susceptibilidade genética tenha importância inquestionável, o aumento considerável da prevalência de obesidade tem sido relacionado às mudanças comportamentais e ambientais resultantes de avanços tecnológicos. A obesidade deve ser vista não apenas como um problema estético em nível individual, mas sim como uma ameaça à qualidade de vida (KOPELMAN, 2000).

2.2 OBESIDADE E CÂNCER

De acordo com o relatório de 2007 da Fundação Mundial para a Pesquisa com Câncer do Reino Unido, a evidência de que o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco para alguns tipos de câncer é “convvincente”. Dentre os tipos de câncer citados estão o de esôfago, pâncreas, rim, intestino e, provavelmente, da vesícula biliar. Nas mulheres, o IMC elevado está ligado ao câncer de mama no período pós-menopausa e ao câncer do útero (WORLD CANCER RESEARCH FUND UK, 2007).

Estudos epidemiológicos forneceram evidências de que a obesidade aumenta o risco para câncer de esôfago (adenocarcinoma), cólon, pâncreas, mama (pós-menopausa), endométrio e rim. A magnitude do aumento do risco varia conforme o local de desenvolvimento do câncer. Há ainda evidências de que a obesidade aumenta o risco de câncer de vesícula, ovário, tireóide, linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo e leucemia (CALLE; KAAKS, 2004; OSÓRIO-COSTA et al., 2009; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2010; KEY; SPENCER; REEVES, 2010).

Key, Spencer e Reeves (2010), realizaram estudo de revisão sobre os efeitos do excesso de peso e da obesidade sobre o risco de desenvolvimento de câncer em seis locais diferentes. De acordo com estes autores, a obesidade é uma importante causa do câncer e os maiores efeitos e maiores riscos são para adenocarcinoma de esôfago e câncer no endométrio. Ainda segundo estes autores, estimativas recentes sugerem que aproximadamente 5% dos cânceres do Reino Unido são causados pelo sobrepeso ou obesidade, sendo que este percentual é

semelhante para outros países ocidentais com prevalência semelhante de obesidade. Além disso, este percentual tende a aumentar, caso a prevalência da obesidade aumente. Dentre os possíveis benefícios a serem alcançados com a diminuição na prevalência da obesidade está a redução na incidência do câncer (KEY; SPENCER; REEVES, 2010).

A evidência de que o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco para diversos tipos de câncer implica na suposição de que a perda de peso deva de certa forma, inverter este efeito. Um exemplo que dá suporte epidemiológico para tal suposição é o “Nurses’ Health Study”, um estudo que demonstrou que mulheres que perderam peso após a menopausa correram menos risco para o desenvolvimento de câncer de mama que aquelas que mantiveram o peso (ELIASSEN, et al., 2006).

Segundo alguns estudos clínicos recentes, procedimentos cirúrgicos que causam substancial perda de peso em pacientes obesos mórbidos estão associados com a redução do risco de desenvolvimento de câncer (ADAMS et al., 2009; SJÖSTRÖM et al., 2009). Adams e Hunt (2009) realizaram estudo de revisão sobre os tipos de câncer que tem mostrado associação com o sobrepeso e a obesidade, além de analisarem alguns estudos que demonstraram redução da mortalidade geral e por câncer após a cirurgia bariátrica. No entanto, estes autores enfatizaram que a cirurgia bariátrica não deve ser considerada um tratamento para o câncer, mas que as orientações para manutenção do peso normal e perda do excesso de peso parecem apropriadas para a redução do risco de desenvolvimento de câncer (WCRF; AIRC, 2007; ADAMS; HUNT, 2009).

Dois importantes institutos para a prevenção do câncer no mundo são o “World Cancer Research Fund”, no Reino Unido, e o “American Institute for Cancer Research”. Recentemente, publicaram um relatório que verificou o impacto da composição dos alimentos, da alimentação, da atividade física e da composição corporal como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer. O câncer é uma doença genética, em que as células tumorais diferem das suas progenitoras normais devido a alterações genéticas que afetam a regulação dos genes (FUTREAL et al., 2004). Tem sido reconhecido que a transformação maligna ocorre por meio de mutações sucessivas em genes específicos, conduzindo à ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Portanto, é uma doença vulnerável a mutações, especialmente ao longo da vida. Há evidências que mostraram que alguns cânceres são hereditários e que fatores ambientais são mais importantes

(WCRF; AIRC, 2007). Além disso, o relatório sugere que se por um lado os fatores ambientais podem influenciar o risco de desenvolvimento de câncer, por outro, tornam a doença passível de prevenção, visto que podem ser controlados.

Desta forma, é cada vez mais aceito que o estilo de vida pode modificar os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer. Alguns estudos relataram a obesidade dentre as influências ambientais que demonstraram associação significativa com o risco para certos tipos de câncer (REEVES et al., 2007; RENEHAN et al., 2008). Khan, Afaq e Mukhtar (2010) verificaram as evidências fornecidas por estudos em humanos sobre os principais fatores de risco modificáveis para a incidência e mortalidade por câncer de mama, pulmão, próstata e cólon. Dentre os fatores de risco encontrados, a obesidade esteve associada ao câncer nos quatro sítios citados anteriormente (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2010).

No entanto, ainda há poucas evidências científicas que esclarecem os mecanismos celulares que ligam a obesidade ao câncer. Como revisto por Calle e Kaaks (2004), o suporte científico para os mecanismos biológicos que relacionam o aumento de risco de câncer com a obesidade baseia-se em alterações metabólicas e endócrinas (CALLE; KAAKS, 2004; WCRF; AIRC, 2007).

O tecido adiposo comporta-se como um órgão endócrino, pois produz hormônios, fatores de crescimento e citocinas que podem perturbar os mecanismos de regulação do crescimento, morte e proliferação celular. O conhecimento destes mecanismos poderia conduzir a abordagens terapêuticas mais precisas para o controle tanto do câncer quanto da obesidade (THE LANCET, 2012).

Evidências epidemiológicas do aumento da obesidade e patologias associadas tem despertado o interesse por pesquisas sobre o papel do tecido adiposo como um participante ativo no controle de processos fisiológicos e patológicos do organismo. É sabido que o tecido adiposo é um órgão secretório ativo, que envia e responde aos sinais que modulam o apetite, o gasto energético, a sensibilidade à insulina, os sistemas endócrino e reprodutivo, metabolismo ósseo, inflamação e imunidade (MARTÍ; MARCOS; MARTÍNEZ, 2001; FANTUZZI, 2005; FONSECA-ALANIS et al., 2006; TRAYHURN, 2007).

Há evidências de que o tecido adiposo pode induzir a inflamação crônica de baixo grau, por meio da produção e liberação de adipocinas e citocinas inflamatórias (BASTARD et al., 1999; YUDKIN, 2003). A inflamação crônica associada à liberação de citocinas inflamatórias pelos adipócitos mostrou-se elevada

em indivíduos obesos e isto tem sido relacionado ao desenvolvimento de câncer (WCRF; AIRC, 2007). Os níveis circulatórios de fator de necrose tumoral (TNF- α), proteína C-reativa (PCR) e do hormônio leptina, que se encontram elevados em um estado inflamatório, foram encontrados em níveis maiores na população obesa quando comparados a grupos com peso normal (COTTAM et al., 2004; CALLE; KAAKS, 2004; PANAGIOTAKOS et al., 2005; WCRF; AIRC, 2007).

A obesidade está associada à produção aumentada de hormônios juntamente a um estado de inflamação crônica de baixo grau, que está ligado a várias doenças como diabetes tipo II, doença cardiovascular e certos tipos de câncer (CALLE et al., 2003). Esta associação ao estado inflamatório ocorre porque o tecido adiposo em expansão é grande fonte de mediadores inflamatórios. Adicionalmente, o ambiente inflamatório em que se encontra o tecido adiposo recruta macrófagos, que produzem mediadores inflamatórios adicionais (CHARRIERE et al., 2003; HARVEY; LASHINGER; HURSTING, 2011).

Adicionalmente, evidências científicas suportam a hipótese de que a inflamação crônica é fundamental nos mecanismos relacionados às suas complicações (LYON; LAW; HSUEH, 2003; SBARBATI et al., 2006), além de promover a indução de carcinogênese via proliferação celular e reparação tecidual. Focos inflamatórios representam uma fonte contínua de oxigênio reativo e de nitrogênio, que por sua vez podem induzir a lesões do DNA (JACKSON; LOEB, 2001; SANDER et al., 2008).

Estudos epidemiológicos relataram a associação entre a obesidade e o risco e prognóstico de vários tipos de câncer. Embora os mecanismos pelos quais a obesidade induza ou promova a carcinogênese não estejam bem esclarecidos, sabe-se que variam de acordo com a localização do câncer. Dentre os mecanismos propostos para esclarecer esta associação, há a hipótese de que o processo inflamatório possa ser um fator desencadeador da carcinogênese (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; CALLE; KAAKS, 2004; OSÓRIO-COSTA et al., 2009).

A ligação entre inflamação crônica e desenvolvimento de câncer foi inicialmente relatada por Rudolph Virchow, há mais de 100 anos, quando observou grande quantidade de leucócitos em tecidos neoplásicos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Desde então, o papel da inflamação crônica como um precursor para o desenvolvimento do câncer tem sido observado em diversos tipos de câncer, como gastrite e câncer gástrico, doença inflamatória do intestino e câncer de cólon e

pancreatite e câncer pancreático (FOLTZ et al., 1998; COUSSENS; WERB, 2002). Em vários modelos animais de câncer de humanos, tem sido demonstrada a influência da inflamação na promoção e progressão tumoral (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; KARIN, 2005; KARIN, 2006).

2.3 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CÉLULAS EPITELIAIS ESFOLIADAS E TESTE DE MICRONÚCLEOS

A mucosa bucal é formada por um epitélio escamoso estratificado que consiste de quatro camadas celulares distintas. O estrato córneo ou camada queratinizada da cavidade bucal compreende células que são perdidas constantemente, como resultado de atividades simples diárias, como a mastigação. Abaixo desta camada estão o estrato granuloso (camada de células granulares) e o estrato espinhoso (camada de células espinhosas), ambos compostos por células diferenciadas e apoptóticas. Sob estas camadas está o estrato germinativo, que contém células basais que se dividem ativamente e diferenciam-se para manter o perfil, estrutura e integridade da mucosa bucal (THOMAS et al., 2009; DARZYNKIEWICZ et al., 2011). A capacidade regenerativa de tecidos e órgãos do corpo é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e envelhecimento saudável e depende da estabilidade genômica e do perfil de expressão gênica das células tronco basais (DARZYNKIEWICZ et al., 2011).

O epitélio oral mantém-se pela renovação celular contínua, sendo que novas células produzidas por mitose na camada basal migram para a superfície, para substituir aquelas que são perdidas. A camada basal contém as células tronco que podem expressar dano genético, como a presença de micronúcleos (MNs), representativos de perda ou quebra cromossômica durante a divisão nuclear. As células filhas, que podem ou não conter MNs, diferenciam-se, migram para a camada superficial e posteriormente são esfoliadas para dentro da cavidade bucal. Algumas destas células degeneram-se: células com cromatina condensada (relacionada às fases iniciais de apoptose e aos processos de diferenciação e maturação de células epiteliais), células cariorréticas com núcleos fragmentados (além de indicar fase final da apoptose, pode ser considerada potencial biomarcador de doenças sistêmicas e de exposição a agentes genotóxicos), núcleos picnóticos (mecanismo alternativo de desintegração nuclear), ou perdem completamente o

material nuclear (células cariолíticas ou “células fantasmas”). Às vezes, algumas células podem ser bloqueadas num estágio binucleado, indicativo de falha na mitose ou podem exibir brotos nucleares (também conhecidos como “broken eggs”) (STICH; SAN; ROSIN, 1983; TOLBERT et al., 1992; CHEN et al., 2006; THOMAS et al., 2007; HOLLAND et al., 2008)

Assim como o MN, o broto nuclear é considerado um marcador de instabilidade genômica (STICH; SAN; ROSIN, 1983), porém sua origem ainda não está completamente esclarecida. Acredita-se que represente amplificação gênica ou falha no sistema de reparo de DNA (SHIMIZU et al., 1998; FENECH et al., 2002), além de sugerir a capacidade nuclear de detectar excesso de DNA e desencadear processos de reparação (FENECH, 2005).

Há ainda a teoria de que a gênese do broto nuclear e do MN seria semelhante, sendo que qualquer DNA que possa ficar no citoplasma durante a divisão celular, seria encapsulado por uma película durante a reconstituição da membrana nuclear e síntese de DNA, formando um brotamento que, caso viesse a se desconectar do núcleo, levaria à formação de um MN (LINDEBERG et al., 2007).

Estes biomarcadores de dano genômico (MN, broto nuclear) e de morte celular (apoptose, cariólise) podem ser observados tanto em testes com linfócitos quanto com células bucais e possibilitam uma avaliação mais abrangente do dano genômico, que apenas de MN no contexto de citotoxicidade e efeitos citostáticos (STICH; SAN; ROSIN, 1983).

A avaliação da frequência de MN e outras anormalidades nucleares em células epiteliais tem sido utilizada para identificar danos genéticos em seres humanos (FENECH, 2011) em situações de exposição acidental ou ocupacional, para avaliar a influência do estilo de vida e para a detecção precoce de doenças relacionadas a desordens genéticas, além do envelhecimento acelerado, risco de câncer e de doenças neurodegenerativas (BONASSI et al., 2007; HOLLAND et al., 2008; THOMAS et al., 2009). Em humanos, os MN podem ser facilmente avaliados em eritrócitos, linfócitos e células epiteliais esfoliadas (epitélio oral, nasal, por exemplo) para mensurar o dano genético in vivo.

O teste de MN em células epiteliais tem sido bastante utilizado para o biomonitoramento de alterações que podem levar ao desenvolvimento de câncer e outras doenças (HOLLAND et al., 2008). Alguns estudos encontraram aumento na frequência de MN em pacientes com lesões cancerizáveis e em pacientes com

câncer de mama e de útero em comparação a indivíduos saudáveis (DESAI et al., 1996; BLOCHING et al., 2000; RAJESWARI et al., 2000; NERSESYAN; ADAMYAN, 2004; YILDIRIM; YESILADA; YOLOGLU, 2006). Análise prospectiva proveniente de um banco de dados de mais de 6700 indivíduos de 20 laboratórios representativos de 10 países confirmou que a frequência elevada de MN em linfócitos humanos é um fator preditivo do aumento do risco de câncer (BONASSI et al., 2007).

O teste de MN em células bucais foi inicialmente proposto em 1983 e continua a ganhar popularidade como um biomarcador de dano genético com inúmeras aplicações (STICH; SAN; ROSIN, 1983). Entretanto, ainda é um ponto obscuro na literatura científica se a frequência de MN em células bucais seria um preditivo da frequência de outros tipos de células, como os linfócitos, por exemplo, ou se seria preditiva para aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer apenas na cavidade oral, limitado ao epitélio do trato digestivo superior ou pode ser projetado para vários tipos de câncer em outras partes do corpo. Adicionalmente, além da exposição pelo contato direto com a boca, a possibilidade de indução de MN em células epiteliais resultante da exposição sistêmica deve ser considerada (HOLLAND et al., 2008).

Células esfoliadas da mucosa bucal foram utilizadas para avaliar efeitos genotóxicos de substâncias como o tabaco; estudar lesões cancerosas e pré-cancerosas e monitorar o efeito de agentes quimiopreventivos. Além disso, estudos utilizaram o teste de MN em células da mucosa bucal para investigar o efeito de diversos fatores, dentre eles, exposição ocupacional e ambiental, radioterapia, quimioprevenção, suplementação vitamínica, hábito e estilo de vida, câncer e outras doenças (SARTO et al., 1987; GIL et al., 2000; MALUF et al., 2000; BACIUCHKA-PALMARO et al., 2002; KOPJAR et al., 2002; MINICUCCI et al., 2005; THOMAS et al., 2007; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2007; MINICUCCI et al., 2008).

As células bucais micronucleadas caracterizam-se visualmente pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores (micronúcleos). Geralmente são redondos ou ovais e seu diâmetro pode variar entre 1/3 a 1/16 do núcleo principal. As células com MN geralmente contem um único micronúcleo, entretanto, é possível encontrar células com dois ou mais MN. Os núcleos nas células micronucleadas podem ter a morfologia de células normais ou de células em processo de morte celular (cromatina condensada). Os MN devem estar localizados dentro do citoplasma das células a serem contadas. A presença de MN é indicativa

---

de perda ou fragmentação cromossômica durante a divisão nuclear (FENECH et al., 1999; DARZYNKIEWICZ et al., 2011).

Em suma, a mucosa bucal é um tecido epitelial que permite o acesso fácil a amostras celulares de maneira minimamente invasiva. Por esta razão, possibilita estudar a capacidade de regeneração do tecido epitelial em humanos, além de ser utilizada com sucesso para estudar o dano ao DNA, por meio do teste de micronúcleos e outras alterações citogenéticas. Para Holland et al. (2008), a coleta de células bucais é, sem dúvida, o método menos invasivo disponível para mensurar danos ao DNA em seres humanos, especialmente em comparação com a obtenção de amostras de sangue para ensaios de linfócitos e eritrócitos, ou biópsias de tecidos (HOLLAND et al., 2008).

3 Proposição

---

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo verificar a frequência dos tipos celulares, anormalidades nucleares e danos celulares em células esfoliadas da mucosa bucal de dois grupos: obeso e controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência dos tipos celulares (células basais e diferenciadas) em células esfoliadas da mucosa bucal de dois grupos: obeso e controle.
- Verificar a frequência das anormalidades nucleares (células binucleadas, picnóticas, cariorréticas, cariolíticas e com cromatina condensada) em células esfoliadas da mucosa bucal de dois grupos: obeso e controle.
- Verificar a frequência dos danos celulares (micronúcleos e brotos nucleares) em células esfoliadas da mucosa bucal de dois grupos: obeso e controle.
- Comparar os achados microscópicos entre os dois grupos: obeso e controle.

4 Material e Métodos

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP (Parecer CEPFHAC – 071/11), pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (Processo nº 106/2011) e após autorizações concedidas pelos sujeitos de pesquisas envolvidos, mediante o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos A e B e Apêndice A, respectivamente).

Como este estudo foi desenvolvido em duas instituições, uma vez que os sujeitos que constituíram o grupo teste foram provenientes da Fundação Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP, considerou-se importante a apreciação pelos Comitês de Ética das unidades supracitadas.

O trabalho foi realizado no Departamento de Estomatologia, área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, sendo resguardados todos os princípios éticos envolvidos na pesquisa com seres humanos, de acordo com a resolução 196/96.

O relatório final deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (Anexo C).

4.2 AMOSTRA

A amostra foi composta por 30 indivíduos, distribuídos em dois grupos de estudo:

- Grupo teste: composto por 15 pacientes obesos.
- Grupo controle: composto por 15 indivíduos com peso normal.

A Fundação Amaral Carvalho de Jaú-SP dispõe de uma equipe multiprofissional para atendimento a pacientes com obesidade mórbida, com indicação à cirurgia bariátrica. Esta equipe é composta por médicos, nutricionistas, psicólogos e cirurgiões-dentistas.

O grupo de obesos (teste) foi formado por pacientes triados para a cirurgia bariátrica na Fundação Amaral Carvalho e o grupo controle foi composto por indivíduos com o peso normal.

4.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Os sujeitos da pesquisa foram classificados em obesos ou com peso normal de acordo com o índice de massa corporal (IMC), preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Foram considerados obesos indivíduos com $IMC > 30,0 \text{ kg/m}^2$ e com peso normal indivíduos com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 (Tabela 1).

As medidas antropométricas (peso, altura) foram obtidas dos prontuários dos pacientes obesos (grupo teste). Para os indivíduos do grupo controle, estas medidas foram obtidas utilizando-se uma balança mecânica de plataforma com antropômetro do departamento de Saúde Coletiva da FOB/USP. O IMC foi calculado dividindo-se o peso (em kg) pelo quadrado da altura (em metros).

Tabela 1 - Índice de Massa Corporal (IMC), de acordo com a Organização Mundial da Saúde

IMC (kg/m^2)	Classificação
< 18,5	Magreza
18,5 – 24,9	Normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso
30,0 – 34,9	Obesidade Grau I
35,0 – 39,9	Obesidade Grau II (severa)
$\geq 40,0$	Obesidade Grau III (mórbida)

4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

Alguns pacientes, que são triados para a cirurgia bariátrica no Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP, passam por atendimento odontológico prévio na clínica de pós-graduação da FOB/USP. Desta forma, a coleta das células da mucosa bucal foi realizada pela pesquisadora, nos dias que os pacientes estavam agendados para o atendimento odontológico. Para os indivíduos do grupo controle, a coleta foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia e da disciplina de Saúde Coletiva da FOB/USP.

As amostras celulares foram coletadas com espátula de madeira (abaixador de língua) umedecida em soro fisiológico e a raspagem da mucosa foi realizada de modo a obter células da camada intermediária. Foram obtidas amostras da mucosa jugal (bochecha), de ambos os lados, utilizando uma espátula para cada lado, para maximizar a amostra celular e eliminar vieses que poderiam ser causados pela amostra de apenas um dos lados da boca.

O material coletado foi transferido para tubos de centrífuga que continham 5 ml de soro fisiológico. Estes tubos foram identificados com um código para cada sujeito e armazenados em geladeira até o momento do processamento das células. Primeiramente, os tubos contendo a amostra celular em solução fisiológica foram centrifugados a 1000 rpm por cinco minutos e, em seguida, o sobrenadante foi parcialmente descartado, restando, aproximadamente, duas vezes o volume do sedimento de células. Posteriormente, foi acrescentada solução fixadora (metanol/ácido acético na proporção 3:1) até completar 5 ml; a suspensão foi agitada e novamente centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado e esta etapa repetida outras duas vezes. A suspensão resultante foi gotejada em lâminas limpas e deixada secar em temperatura ambiente por 24 horas.

A coloração das lâminas foi feita pelo método de Feulgen/Fast green, em que inicialmente se utilizou o reativo de Schiff (Merck) para a identificação do DNA do núcleo e do micronúcleo, seguido pelo reagente contrastante (contra-coloração) Fast-Green, que delinea o citoplasma celular. Após a coloração, as lâminas foram montadas em Permunt (Fisher) e lamínulas para análise. A tabela 2 sintetiza a sequência utilizada para a realização desta técnica.

Tabela 2 - Síntese da sequência realizada para a realização do método de Feulgen/Fast green, para a coloração das lâminas

Sequência	Ação	Procedimento
1	Hidratação	HCl 5N por 10 min
2	Lavagem	Água corrente, 3 vezes
3	Coloração nuclear	Reativo de Schiff (Merck) por 90 min, na ausência de luz
4	Lavagem	Água corrente por 5 min
5	Contra coloração com Fast green Coloração do citoplasma	Mergulho em solução de Fast green 0,5%
6	Desidratação	Lavagem em álcool absoluto
7	Clareamento	Mergulho no xilol
8	Montagem – ligação entre a lâmina e a lamínula Proteção do material e prevenção do desbotamento do corante	Permunt (Fisher) e lamínula

4.5 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Todas as lâminas foram codificadas e as análises citogenéticas realizadas em teste cego, em microscópio óptico de luz, sob aumento de 400X. Para cada sujeito da pesquisa foram avaliadas 1.000 células para a caracterização dos tipos celulares (basal ou diferenciada) e das anormalidades nucleares (células binucleadas, picnose, cariólise, cariorrexe e cromatina condensada) e 2.000 células diferenciadas para a verificação da presença de micronúcleos e brotos nucleares.

Foram consideradas apenas células que apresentavam pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes, com citoplasma e núcleo bem delimitados e intactos e com pouca ou nenhuma dobra citoplasmática.

Os critérios utilizados neste estudo para a classificação dos tipos celulares e anormalidades nucleares foram baseados naqueles descritos por Tolbert et al. (1992) e Thomas et al. (2009). Estes critérios foram projetados para categorizar as células bucais em categorias de células “normais” e “anormais”, com base em características citológicas e nucleares indicativas de danos ao DNA, falha na citocinese ou morte celular.

Desta forma, foram analisados os seguintes tipos e alterações celulares:

- Células basais normais: são pequenas, com um núcleo grande ovalado e uniformemente corado, citoplasma pouco angulado e com razão núcleo-citoplasma maior que o das células bucais diferenciadas.
- Células diferenciadas normais: núcleo pequeno, arredondado, uniformemente corado, citoplasma nitidamente angulado e razão núcleo-citoplasma menor comparativamente às células basais.
- Células binucleadas: com morfologia semelhante a das células normais diferenciadas, contem dois núcleos com o mesmo tamanho, forma e coloração. Os núcleos são geralmente muito próximos entre si, podendo ou não se tocar.
- Células picnóticas: apresentam núcleos pequenos com coloração intensa e aparentemente condensados em relação à célula normal diferenciada.
- Células com cariorrexe: aquelas com o núcleo fragmentado e com aparência pontilhada.
- Células cariолíticas: aquelas que não possuem núcleo, sendo também denominadas Feulgen negativa.
- Células com cromatina condensada: apresentam núcleo com padrão estriado, alternando regiões de cromatina bem corada e sem coloração.
- Células micronucleadas: aquelas que apresentam um núcleo principal e uma ou mais estruturas nucleares menores (micronúcleo - MN). Os MNs são redondos ou ovalados; com textura e coloração semelhante à do núcleo principal e com diâmetro que varia entre 1/3 e 1/16 do núcleo principal. A maioria das células com MNs contem apenas um MN, mas é possível encontrar células com dois ou mais MNs.

- Células com broto nuclear: aquelas em que o núcleo apresenta um brotamento que permanece unido por meio de uma fina constrição; o broto pode ser 1/2 a 1/4 do tamanho do núcleo principal.

4.6 QUESTIONÁRIO

Os sujeitos da pesquisa (grupo teste e grupo controle) responderam a um questionário, de acordo com protocolo publicado pela “International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens” (1988). Este questionário (Anexo D) permitiu obter informações sobre:

- História pessoal: idade, sexo, etnia e renda familiar.
- História ocupacional: local e tipo de trabalho atual ou dos últimos 10 anos.
- Exposição: se houve exposição a agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos) ou físicos (radiação), no trabalho ou fora dele, nos últimos 10 anos e nos últimos 12 meses; se usou algum tipo de proteção.
- História de fumo: se fumava atualmente (quantidade/dia) ou se já foi fumante (quando parou de fumar); quanto ao tipo (cigarro com filtro, charuto, cachimbo); hábito de mascar tabaco.
- Medicamentos e doenças: uso de medicamentos (comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, aspirina, antiácidos, anti-histamínicos, sedativos ou outros); uso de vitaminas; histórico de doenças, vacinações, radiografias diagnósticas e terapêuticas.
- Dietas: tipo de dieta (vegetariana ou não); ingestão de carne (tipo e frequência); consumo de café, chá, chimarrão; ingestão de bebida alcoólica (tipo e frequência).
- História genética: existência de algum defeito de nascimento ou doença hereditária nos pais, irmãos ou filhos; ocorrência de filho prematuro ou aborto; se tem irmão gêmeo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados em planilha Excel 2010 e a análise estatística foi realizada no programa Statistica versão 10.0 (StatSoft. Inc. 1984-2011, USA).

Para a caracterização da amostra foi realizada análise descritiva, baseada em proporções e frequências absolutas e relativas.

O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar a frequência dos tipos e alterações celulares entre os dois grupos (teste e controle).

Considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS (OBESO E CONTROLE)

Participaram deste estudo 15 indivíduos obesos, que constituíram o grupo teste e 15 indivíduos com o peso normal, integrantes do grupo controle.

A distribuição dos grupos quanto ao sexo foi a mesma, sendo treze (86,67%) mulheres e dois (13,33%) homens em cada grupo. A média da idade para o grupo de obesos foi 38,07 anos, sendo que variou entre 20-59 anos. Para o grupo controle, a média da idade foi 27,47 anos, com variação entre 21-41 anos (Tabela 3).

Todos os indivíduos do grupo teste apresentaram o IMC $\geq 40,0$ Kg/m², caracterizado como obesidade mórbida, sendo a média do IMC deste grupo de 53,16 Kg/m². O menor IMC encontrado no grupo de obesos foi de 41,67 Kg/m² e o maior IMC foi de 69,01 Kg/m². Para o grupo controle, o IMC foi considerado normal, com média de 20,93 Kg/m². Estes dados podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização dos grupos, obeso e controle, quanto à idade e IMC

	Obeso				Controle			
	n	Mínimo	Média (dp)	Máximo	n	Mínimo	Média (dp)	Máximo
Idade	15	20	38,07 (12,74)	59	15	21	27,47 (5,44)	41
IMC	15	41,67	53,16 (7,59)	69,01	15	18,61	20,93 (1,99)	24,86

A maioria dos indivíduos de ambos os grupos é de etnia branca, correspondendo a mais de 80,00% da amostra (Tabela 4). Quanto à história ocupacional, dez (66,67%) indivíduos obesos não trabalhavam; quatro (26,67%) trabalhavam no comércio e um (6,67%) trabalhava na área da saúde. Dentre os indivíduos do grupo controle, onze (73,33%) não trabalhavam e quatro (26,67%) trabalhavam na área da saúde.

Em relação à exposição a agentes químicos no trabalho, um (6,67%) indivíduo do grupo de obesos relatou exposição ao formol e quatro (26,67%) do grupo controle relataram exposição a gases tóxicos (Tabela 4). A exposição à radiação (agente físico) no trabalho foi relatada por um (6,67%) indivíduo do grupo

obeso e quatro (26,67%) do grupo controle (Tabela 4). A exposição a agentes químicos e/ou físicos fora do trabalho não foi relatada por nenhum participante deste estudo.

Quanto ao uso de tabaco, observou-se a maioria de não fumantes para os dois grupos, sendo que apenas um (6,67%) indivíduo obeso fuma atualmente (cigarro com filtro; uma carteira de cigarro por dia). Seis (40,00%) indivíduos obesos são ex-tabagistas, no entanto quatro (26,67%) pararam de fumar há pelo menos 1 ano e dois (13,33%) deles há 12 anos (Tabela 4). Nenhum indivíduo do grupo de obesos ou controle, fumante ou ex-fumante, relatou o uso de cachimbo, charuto ou o hábito de marcar tabaco.

O uso de medicamentos prescritos pelo médico foi relatado por oito (53,33%) dos obesos (Tabela 4). Dentre os medicamentos mais citados estão os antidepressivos e inibidores de apetite. A maior parte dos indivíduos do grupo controle (66,67%) utilizava algum tipo de medicamento prescrito pelo médico, sendo os mais citados os anticoncepcionais, antidepressivos e antiácidos (Tabela 4).

No que se refere ao histórico de doenças, dois (13,33%) obesos e três (20,00%) do grupo controle já tiveram herpes; dois (13,33%) obesos são diabéticos e um (6,67%) obeso tem doença renal crônica.

A maioria dos indivíduos do grupo controle relatou a ingestão de álcool de forma esporádica, não caracterizando dependência. Para o grupo de obesos, a maioria relatou que não ingere bebida alcóolica, mesmo que esporadicamente (Tabela 4).

Quanto à história genética, dois (13,33%) indivíduos obesos relataram a ocorrência de Síndrome de Down, enquanto um (6,67%) indivíduo do grupo controle relatou a ocorrência de agenesia de órgãos na família (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização dos grupos, obeso e controle, quanto à etnia, exposição a agentes químicos e físicos, uso de tabaco, medicamentos, ingestão de álcool e ocorrência de alterações genéticas na família

		Obeso		Controle	
		n	%	n	%
Etnia	Não branco	2	13,33	3	20,00
	Branco	13	86,67	12	80,00
Exposição a Agente Químico	Não	14	93,33	11	73,33
	Sim	1	6,67	4	26,67
Exposição a Agente Físico	Não	14	93,33	9	73,33
	Sim	1	6,67	4	26,67
Uso de Tabaco	Não	8	53,33	14	93,33
	Ex-fumante	6	40,00	1	6,67
	Sim	1	6,67	0	0,00
Uso de Medicamentos	Não	7	46,67	5	33,33
	Sim	8	53,33	10	66,67
Ingestão de Álcool	Não	10	66,67	4	26,67
	Sim	5	33,33	11	73,33
Alteração Genética*	Não	13	86,67	14	93,33
	Sim	2	13,33	1	6,67
Total		15	100,00	15	100,00

* Pais, filhos ou irmãos com agenesia de órgão ou síndrome de Down.

5.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Nas tabelas 5 e 6 estão apresentados os resultados dos tipos celulares (células basais e diferenciadas), anormalidades nucleares (células binucleadas, picnose, cariólise, cariorrexe e cromatina condensada) e dano celular (brotos nucleares e micronúcleos) para o grupo controle e de obesos. Em relação ao tipo celular, observou-se maior média de células diferenciadas nos dois grupos. Quanto às alterações nucleares, a cariorrexe teve a maior média no grupo controle (18,60), enquanto no grupo obeso foi a picnose (15,93). Quanto ao dano celular, a média de brotos nucleares foi a mesma para os dois grupos (6,47); no entanto a média de micronúcleos foi maior para o grupo de obesos (3,13) em relação ao controle (0,20).

Tabela 5 - Distribuição de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular no grupo controle

	Frequência de tipos celulares e anormalidades nucleares em 1000 células							Dano celular em 2000 células diferenciadas	
	Bas	Difer	BIN	PIC	CRL	CRX	CRC	Broto	MN
Mínimo	14,00	870,00	0,00	3,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
1º Quartil	25,00	889,00	0,00	10,00	2,00	4,00	4,00	2,00	0,00
Mediana	39,00	917,00	2,00	16,00	3,00	15,00	6,00	4,00	0,00
3º Quartil	55,00	928,00	5,00	20,00	6,00	19,00	10,00	5,00	0,00
Máximo	61,00	957,00	8,00	50,00	18,00	75,00	24,00	29,00	1,00
Média	38,60	910,73	2,53	17,87	4,40	18,60	7,27	6,47	0,20
dp	15,95	27,07	2,59	13,16	4,70	20,37	5,68	7,63	0,41
Epadrão	4,12	6,99	0,67	3,40	1,21	5,26	1,47	1,97	0,11
IC 95% (LI)	29,76	895,74	1,10	10,58	1,80	7,32	4,12	2,24	0,03
IC 95% (LS)	47,44	925,73	3,97	25,16	7,00	29,88	10,41	10,69	0,43

Bas (basal), Difer (diferenciada), BIN (binucleada), PIC (picnose), CRL (cariólise), CRX (cariorrexe), CRC (cromatina condensada), Broto (broto nuclear), MN (micronúcleo).

dp (desvio padrão), Epadrão (erro padrão), IC (intervalo de confiança), LI (limite inferior), LS (limite superior).

Tabela 6 - Distribuição de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular no grupo de obesos

	Frequência de tipos celulares e anormalidades nucleares em 1000 células							Dano celular em 2000 células diferenciadas	
	Bas	Difer	BIN	PIC	CRL	CRX	CRC	Broto	MN
Mínimo	10,00	852,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1º Quartil	24,00	896,00	1,00	8,00	1,00	2,00	2,00	3,00	1,00
Mediana	33,00	911,00	3,00	16,00	7,00	7,00	4,00	6,00	1,00
3º Quartil	39,00	942,00	8,00	22,00	21,00	20,00	9,00	8,00	5,00
Máximo	94,00	951,00	25,00	42,00	48,00	28,00	27,00	21,00	14,00
Média	37,27	913,27	5,33	15,93	12,47	10,60	6,73	6,47	3,13
dp	21,23	28,77	6,20	10,03	15,36	9,69	6,78	5,11	3,58
Epadrão	5,48	7,43	1,60	2,59	3,97	2,50	1,75	1,32	0,93
IC 95% (LI)	25,51	897,34	1,90	10,38	3,96	5,23	2,98	3,64	1,15
IC 95% (LS)	49,02	929,20	8,76	21,49	20,97	15,97	10,49	9,30	5,12

Bas (basal), Difer (diferenciada), BIN (binucleada), PIC (picnose), CRL (cariólise), CRX (cariorrexe), CRC (cromatina condensada), Broto (broto nuclear), MN (micronúcleo).

dp (desvio padrão), Epadrão (erro padrão), IC (intervalo de confiança), LI (limite inferior), LS (limite superior).

Observaram-se diferenças nas frequências de tipos celulares e anormalidades nucleares para os dois grupos. O grupo de obesos apresentou maiores frequências de células diferenciadas, binucleadas e com cariólise; enquanto o grupo controle mostrou maiores frequências de células basais, com picnose, com cariorrexe e com cromatina condensada. Porém, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). (Tabela 7).

Quanto ao tipo de dano celular, notou-se a mesma frequência de brotos nucleares para ambos os grupos, entretanto, a frequência de micronúcleos foi maior para o grupo obeso ($p<0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação das frequências de tipos celulares, anormalidades nucleares e dano celular nos grupos controle e obeso

		Obeso	Controle	p
Indivíduos	n	15	15	
Células	nº	15000	15000	
Bas	‰	37,30	38,60	0,806
Difer	‰	913,30	910,70	0,461
BIN	‰	5,30	2,50	0,116
PIC	‰	15,90	17,90	0,935
CRL	‰	12,50	4,40	0,116
CRX	‰	10,60	18,60	0,217
CRC	‰	6,70	7,30	0,539
MTC	‰	45,70	48,10	0,744
Células	nº	30000	30000	
Broto	‰	3,20	3,20	0,305
MN	‰	1,60	0,10	0,000

Bas (Basal), Difer (diferenciada), BIN (binucleada), PIC (picnose), CRL (cariólise), CRX (cariorrexe), CRC (cromatina condensada), MTC (morte celular), Broto (broto nuclear), MN (micronúcleo).

Teste de Mann Whitney.

As fotomicrografias dos tipos celulares, das anormalidades nucleares e dos danos celulares podem ser visualizadas nas figuras 1 e 2.

Figura 1 - Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal: A, B – células basais; C, D – células diferenciadas; E, F – células diferenciadas justapostas; G, H – células binucleadas; I – célula com picnose; J – célula com cariólise; K, L – células com cariorrexe. Aumento de 400X.

Figura 2 – Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal: A – célula com cromatina condensada; B, C, D – broto nuclear; E, F, G, H, I – micronúcleo; A, B, C, E, F, G, H, I – aumento de 400X; D – aumento de 1000X

6 Discussão

---

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a obesidade passou de um mero problema estético em nível individual a um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo, que tem avançado de forma rápida e progressiva em diversas populações, sem diferenciar raça, sexo, idade ou nível social (KOPELMAN, 2000; REPETTO; RIZZOLLI; BONATTO, 2003).

A obesidade tem despertado o interesse da comunidade científica por se mostrar uma doença grave, multifacetada, de genética complexa e que tem resultado em elevada morbidade e mortalidade, principalmente devido ao aparecimento ou agravamento de outras doenças associadas (REPETTO; RIZZOLLI; BONATTO, 2003).

De acordo com a OMS, em 2008, mais de 200 milhões de homens e aproximadamente 300 milhões de mulheres eram obesos. Acredita-se que no cenário atual este número já tenha evoluído para 600 milhões, com estimativas de que, em 2015, existirão 700 milhões de obesos no mundo (WHO, 2011).

Todos os indivíduos obesos deste estudo apresentaram IMC $\geq 40,0$ Kg/m², caracterizado como obesidade mórbida ou grau III. No Brasil, pesquisa realizada pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica em 2007, verificou que em 20 anos a prevalência de obesidade mórbida subiu de 0,6% para 3,0% (SBCBM, 2007). Este dado é alarmante, pois este grau de obesidade apresenta risco considerado muito grave para o desenvolvimento de comorbidades.

Neste estudo, a maioria dos indivíduos obesos mórbidos era do sexo feminino (83,67%). Levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no Brasil em 2011 apontou prevalência muito próxima de obesidade entre homens (15,6%) e mulheres (16,0%) (VIGITEL, BRASIL, 2011). O grupo de obesos deste estudo foi composto por indivíduos triados para a cirurgia bariátrica na Fundação Amaral Carvalho de Jaú-SP e isto pode justificar a maioria feminina. Alguns estudos relataram que a cirurgia bariátrica é realizada com maior frequência em mulheres (OVREBO et al., 1998; VALEZI et al., 2004; MERROUCHE et al., 2007).

Sabe-se da importância da obesidade como fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças (ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS, 1983; EUA NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR, 2003; WANG; GOALSTONE; DRAZNIN, 2004; WHO, 2011) e há evidências

científicas convincentes de que a obesidade aumenta o risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (CALLE; KAAKS, 2004; OSÓRIO-COSTA et al., 2009; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2010; KEY; SPENCER; REEVES, 2010; WHO, 2011).

O câncer é uma doença complexa, em que células com expressão gênica alterada crescem de modo anormal, podendo invadir outros tecidos e perturbar sua função normal (FENECH, 2002). A influência de fatores ambientais no risco de desenvolvimento de câncer é cada vez mais aceita. No decorrer da vida um indivíduo é exposto a substâncias químicas, agentes físicos e biológicos que associados a fatores genéticos ou não, podem agir sobre células normais e aumentar a frequência do aparecimento de mutações celulares e, conseqüentemente, o risco para o desenvolvimento de câncer (BORAKS, 1999; WCRF; AIRC, 2007).

Assim, se por um lado estes fatores ambientais diversos podem influenciar o risco para o câncer, por outro, permitem a prevenção da doença, pois podem ser controlados. Esta prevenção depende principalmente da identificação dos fatores associados ao seu desenvolvimento.

Dentre os testes utilizados para o biomonitoramento em grupos populacionais de risco está o teste de micronúcleos. É um teste relativamente simples, de baixo custo, realizado por meio da avaliação da frequência de micronúcleos em células epiteliais, que permite identificar danos genéticos em seres humanos (FENECH, 2011).

Muitos estudos realizaram o teste de micronúcleos para verificar o dano celular diante da exposição a agentes químicos ou físicos (acidental ou ocupacional), dos hábitos e estilo de vida, doenças crônicas (BONASSI et al., 2007; HOLLAND et al., 2008; THOMAS et al., 2009). Para Thomas et al. (2009), ao utilizar o teste de micronúcleos em células da mucosa bucal em estudos epidemiológicos, é importante investigar a influência de variáveis demográficas e variáveis de exposição.

Verificar os tipos e alterações celulares em indivíduos obesos e compará-las ao grupo de indivíduos com peso normal foi o objetivo deste estudo. Utilizou-se um questionário, de acordo com protocolo publicado pela “International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens” (1988), bastante utilizado em estudos com teste de micronúcleos. Por meio deste questionário, foi

possível identificar variáveis que poderiam influenciar na frequência de micronúcleos. No entanto, a amostra reduzida e a heterogeneidade de algumas variáveis dificultaram melhores análises entre os grupos. Por exemplo, no que se refere à idade, sabe-se que a frequência de micronúcleos tende a aumentar com o envelhecimento (THOMAS et al., 2007). Esta associação não foi investigada neste estudo, pois os indivíduos com maior idade foram os obesos, que apresentaram maiores frequências de micronúcleos. Isto dificultou a comparação da frequência de micronúcleos em relação à idade.

Investigações quanto ao uso do tabaco e a ingestão de álcool também não foram possíveis, pois apenas um indivíduo afirmou fumar durante o período do estudo e a ingestão de álcool foi relatada por pouco indivíduos e de forma esporádica. A indução de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal em consequência do uso do tabaco tem gerado controvérsias na literatura científica. Estudos sugeriram que esta associação depende da quantidade de cigarro consumida/dia, sendo observada apenas em indivíduos que consumiam mais de 10 cigarros/dia (WU et al., 2004; BLOCHING et al. 2008; DORÉA et al., 2012). Além disso, pode ocorrer (CASTELLSAGUE et al., 2004) ou não (DORÉA et al., 2012) sinergismo entre o uso do tabaco e o consumo do álcool.

A influência de medicamentos, que pode interferir na frequência de micronúcleos, conforme relatado por Lima (2007), também não foi verificada. Vários tipos de medicamentos foram utilizados por indivíduos de ambos os grupos (antidepressivos, inibidores de apetite, antiácidos, anticoncepcionais), o que dificultou esta investigação.

Verificou-se, neste estudo, maior frequência de micronúcleos no grupo obeso em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Estudo realizado na Itália encontrou maior frequência de micronúcleos em linfócitos de crianças com sobrepeso e obesidade, comparada a crianças com peso normal (SCARPATO et al., 2010). No entanto, a frequência dos tipos e alterações celulares em adultos obesos ainda não foi relatada na literatura científica, impossibilitando a comparação destes resultados com outros estudos. Sugere-se a realização do teste de micronúcleos em indivíduos obesos utilizando-se células sanguíneas e células esfoliadas da mucosa bucal, para verificar a equivalência entre ambas.

A frequência morte celular (picnose, cariólise, cariorrexe e cromatina condensada) foi semelhante entre os grupos obeso e controle (45,7 % e 48,1 %,

respectivamente). A morte celular ocorre em circunstâncias diversas como organogênese normal e patológica, hematopoiese normal e patológica, seleção do sistema imune, resposta inflamatória, eliminação celular decorrente de injúrias por agentes genotóxicos e na manutenção numérica celular (NICHOLSON 2000; RANGANATH; NAGASHEERE, 2001).

Este estudo procurou seguir o projeto “Human Micronucleus” (HOLLAND et al., 2008; BONASSI et al., 2011) e o protocolo publicado por Thomas et al. (2009), a fim de padronizar as principais questões técnicas, por exemplo quanto à coloração; contabilização e caracterização dos tipos e alterações celulares. Isto permite a melhor comparação dos dados obtidos entre diferentes populações e realizados em diferentes laboratórios.

Não há dados disponíveis na literatura científica sobre a frequência dos tipos celulares, anormalidades nucleares e danos celulares em indivíduos obesos e esta foi a maior contribuição do presente estudo. A maior frequência de micronúcleos nos indivíduos obesos deste estudo indica que há maior ocorrência de dano celular neste grupo.

Entretanto, apesar de ter sido observada maior frequência de danos celulares nos indivíduos obesos, muitas lacunas ainda necessitam ser preenchidas. Estudos adicionais são necessários, não somente para buscar melhor compreensão para esta associação entre a frequência de micronúcleos e a obesidade, mas também para avaliar as vantagens de incluir estes biomarcadores de risco de câncer na vigilância das populações com maior risco de desenvolver esta doença.

7 Conclusões

---

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste estudo permitiu concluir:

- A frequência de células basais e diferenciadas foi semelhante entre o grupo obeso e controle.
- O grupo obeso apresentou maior frequência de células binucleadas e de células com cariólise em relação ao grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.
- O grupo controle apresentou maior frequência de células com picnose, cariorrexe e com cromatina condensada, entretanto, não houve diferença estatística significativa.
- A frequência de brotos nucleares foi igual para o grupo obeso e para o grupo controle.
- Verificou-se maior frequência de micronúcleos no grupo obeso, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Referências

REFERÊNCIAS

Adams TD, Hunt SC. Cancer and obesity: effect of bariatric surgery. *World J Surg.* 2009;33:2028–33.

Adams TD, Stroup AM, Gress RE et al. Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery. *Obesity.* 2009;17:796–802.

Au WW. Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. *Environ Mutagen Carcinog Teratogen.* 1991;23:236-45.

Baciuchka-Palmaro M, Orsiere T, Duffaud F, Sari-Minodier I, Pompili J, Bellon L, et al. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res.* 2002;520:189-98.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357:539-45.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7:211–7.

Bastard JP, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation.* 1999;99: 2221-2.

Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol.* 2000;36:550–5.

Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncology.* 2008;44(3): 220-6.

Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3):88-97.

Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005;45(2-3):258-70.

Bonassi M, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland NT, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):625–31.

Boraks S. Diagnóstico Bucal. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

- Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Canc.* 2004;4:579-91.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348:1625–38.
- Carrano AV, Natarajan AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication No. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res.* 1988;204: 379-406.
- Casartelli G et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22:486–92.
- Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2004;108(5):741-9.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Vital Signs: State-Specific Obesity Prevalence Among Adults — United States, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2010;59:1-5.
- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research.* 2010;705:11-9.
- Charriere, G., B.Cousin, E.Arnaud, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J.Biol Chem.* 2003;278: 9850–5.
- Chen C et al. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis.* 2006;21:131–7.
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.* 2004;14:589-600.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420: 860–7.
- Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Holden E, Luther E, Henriksen M, François M, Leifert W, Fenech M. Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay. *Mutagenesis.* 2011;26(1):153–61.
- Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, Bhide SV. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett.* 1996;109: 9–14.

Doréa LTM, Meireles JRC, Lessa JPR, Oliveira MC, Bragança Pereira PA, Campos AP, et al. Chromosomal damage and apoptosis in exfoliated buccal cells from individuals with oral cancer. *Int J Dent*. 2012; 2012:457054. Epub 2012 Jan 19.

Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B et al. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA*. 2006;296:193–201.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:911-9.

Fenech M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*. 2005;20(4):255-69. Epub 2005 Jun 14.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2007;2:1084-104.

Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res*. 2002;504:131–6.

Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*. 1999;428:271–83.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125–32.

Foltz CJ, Fox JG, Cahill R, et al. *Helicobacter*. 1998;3:69–78.

Fonseca -Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):216-29.

Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective (2007) World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, AICR, Washington, DC.

Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature*. 2000; 404(6): 632-4.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:177–83.

Gill OM, Oliveira NG, Rodrigues AS, et al. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis*. 2000;15:60-75.

- Gisselsson D, Björk J, Höglund M, Mertens F, Cin PD, Mans A et al. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol.* 2001;158:199-206.
- Gortmaker SL, Swinburn BA, Levy D, Carter R, Mabry PL, Finegood DT, et al. Changing the future of obesity: science, policy, and action. *Lancet.* 2011;378: 838–47.
- Harvey AE, Lashinger LM, Hursting SD. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. *Ann NY Acad Sci.* 2011;1229(2011):45–52.
- Holland N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659: 93–108.
- International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. *Mutat Res.* 1988;312:293-304.
- Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res.* 2001;477:7–21.
- Karin M. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nature Med.* 2005;11:20–1.
- Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441:431-6.
- Key TJ, Spencer EA, Reeves GK. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions. Obesity and cancer risk. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(1):86-90.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: evidence from human studies. *Cancer Lett.* 2010;293(2):133–43.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6):635-43.
- Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Acute cytogenetic effects of antineoplastic drugs on peripheral blood lymphocytes in cancer patients chromosome aberrations and micronuclei. *Tumori.* 2002;88:300-12.
- Lima CF. Avaliação quantitativa de micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2007.
- Lindeberg H, Wang X, Järventaus H, Falck G, Norppa H, Fenech M, Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* 2007;617:33–45.
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology.* 2003;144:2195–200.

- Maluf, SW, Erdtmann, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 2000;471: 21-7.
- Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune functions relationships. *Obes Rev.* 2001;2:131-40.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006;88:1515–31.
- Merrouche M, Sabate JM, Jouet P, Harnois F, Scaringi S, Coffin B, et al. Gastroesophageal reflux and esophageal motility disorders in morbidly obese patients before and after bariatric surgery. *Obes Surg.* 2007;17(7):894-900.
- Minicucci EM, Camargo B, Costa MC, Ribeiro DA, Ribeiro LR, Salvadori DMF. DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumor undergoing chemotherapy. *Clin Exp Med.* 2008;8(2):79-85. Epub 2008 Jul 11.
- Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MAC, Pereira A, Ribeiro LR, de Camargo JLV, Salvadori DMF. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Radiat Res.* 2005;46(2):135-42.
- National Heart, Lung, and Blood Institute. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute; 1998. [accessed 2010 jul 20, Available at http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob_gdlns.htm.
- National Research Council of USA Diet and Health: implications for reducing chronic disease risk. National Academy Press: Washington, DC, 1989.
- Nersesyan A, Chobanyan N. Micronuclei and other nuclear anomalies levels in exfoliated buccal cells and DNA damage in leukocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *J BUON.* 2010;15(2):337-9.
- Nersesyan AK, Adamyan RT. Micronuclei level in exfoliated buccal mucosa cells of patients with benign and malignant tumors of female reproductive organs and breast. *Tsitol Genet.* 2004;38:72–5.
- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutics agents. *Nature.* 2000;407:810-6.
- Obesity and cancer outcome [editorial]. *The Lancet.* 2012; 379(9824):1366.
- Osório-Costa F, Rocha GZ, Dias MM, Carnevali JBC. Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(2):213-26.

Ovrebo KK, Hatlebakk JG, Viste A, Bassoe HH, Svanes K. Gastroesophageal reflux in morbidly obese patients treated with gastric banding or vertical banded gastroplasty. *Ann Surg.* 1998;228(1): 51-8.

Ozkul Y, Donmez H, Erenmemisoglu A, Demirtas H, Imamoglu N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis.* 1997;12,:285–7.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysoshoou C, Christodoulos S. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis.* 2005;183:308-15.

Pereira LO, Francischi RP, Lancha-Junior HA. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2003;47(2):111-27.

Popkin B M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. *Nutrition Reviews.* 1994;52:285-98.

Prakash S, Schmidhuber J. Nutrition, lifestyle, obesity and chronic disease. Population division. Expert paper nº 2011/3. United Nations, New York, 2011.

Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna, Rao KV et al. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis.* 2000;21: 557–61.

Ranganath RM, Nagasheere NR. Role of programmed cell death in development. *International Review Cytology.* 2001;202:159-242.

Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D, Million Women Study Collaboration Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Woman Study: cohort study. *BMJ.* 2007;335(7630):1134.

Renahan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371:569-78.

Reppeto G, Rizzoli J, Bonatto C. Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: here, there, and everywhere. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(6): 633-5.

Rickes LN, Alvarengo MC, Souza TM, Garcia GL, Martino-Roth MG. Increased micronucleus frequency in exfoliated cells of the buccal mucosa in hairdressers. *Genetics and Molecular Research.* 2010;9(3):1921-8.

Roberts DL, Dive C, Renahan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med.* 2010;61:301-16.

Royal College of Physicians Obesity Report Journal of the Royal College of Physicians of London. 1983;17:3-58.

Sander M, Trump BF, Harris CC, Tennant RW. The 20th Aspen Cancer Conference: mechanisms of toxicity, carcinogenesis, cancer prevention, and cancer therapy 2005. *Mol Carcinog*. 2008;47:707–32.

Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal. *Mutagenesis*. 1987;2:11-7.

Sarto F, Tomanin R, Giacomelli L, Iannini G, Cupiraggi AR. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutat. Res*. 1990;244:345–51.

Sbarbati A, Osculati F, Silvagni D, Benati D, Galie` M, Camoglio FS et al. Obesity and inflammation: evidence for an elementary lesion. *Pediatrics*. 2006;117:220–3.

Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi B, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ -H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J*. 2010;25:1-9.

Shimizu N, Itoh N, Utiyama H Wahl, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol*. 140, 1307–1320 (1998).

Sjöström L, Gummesson A, Sjöström CD et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol*. 2009;10: 653–62.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM). Pesquisa: Mapeamento - Obesidade, 2007 (acesso em 2012 mar 10). Disponível em: <http://www.sbcbr.org.br/obesidade>

Statistics on obesity, physical activity and diet: England, 2012. The NHS Information Centre is England's central, authoritative source of health and social care information. The NHS Information Centre, Lifestyles Statistics. February 2012.

Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer*. 1983;31:305-8.

Stich HF, San RH, Rosin MP. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells, *Ann NY. Acad Sci* 1983;407:93–105.

Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378:804–14.

Thomas P, Hecker J. Faunt, J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007;22: 371-9.

- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009;4(6):825-37.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77.
- Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev*. 2007;8(S1):41-4.
- US Department of Health and Human Services. The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity 2001. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, US Public Health Service, Office of the Surgeon General (acesso em 2012 mar 10). Available at <http://www.surgeongeneral.gov/topics/obesity/>
- Valezi AC, Júnior JM, Brito EM, Marson AC. Gastroplastia vertical com bandagem em Y-de-Roux: análise de resultados. *Rev do Colégio Brasileiro de Cirurgias*. 2004;31(1):49-56.
- Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico - VIGITEL. Secretaria de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, Brasil (acesso em 2011 abr 11). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4821/785/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>
- Wang CC, Goaltone ML, Draznin B. Molecular mechanism of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004;53:2735-40.
- WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of World Health Organization Consultation on Obesity. Geneva. 2000.
- World Cancer Research Fund Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Second Expert Report. Washington, USA: American Institute for Cancer Research, 2007.
- World Health Organization 2006. Obesity and Overweight (acesso em 2010 nov 1) Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- World Health Organization 2011. Fact Sheet No. 311. Obesity and Overweight Geneva: WHO; (acesso em 2012 mar 10) Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on obesity. Geneva: WHO; 1998.
- Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, Liou SH. Clastogenic effect of cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mut Res*. 2004;562:27-38.

Yildirim IH, Yesilada E, Yologlu S. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Genetika*. 2006;42:705–10.

Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes*. 2003;27(suppl):25-8.

Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res*. 2007;634:126-34.

Apêndice

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezados voluntários,

Convidamos vocês a participarem deste estudo que quer verificar se a obesidade e outros fatores (fumo, álcool, medicamentos) aumentam a frequência de alterações nas células. Será necessário coletar células da boca, além do preenchimento de um questionário com informações sobre alimentação, medicamentos, saúde, etc. Esses questionários são simples e levam em torno de dez minutos para serem respondidos.

A coleta de células da boca será realizada pela pesquisadora, usando uma escova pequena descartável, com uma raspagem suave dos dois lados da bochecha (dentro da boca), sem dor e sem risco nenhum ao participante. A análise destas células será feita no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru. Esta análise será de responsabilidade da pesquisadora e não terá custo ao participante.

Este estudo poderá trazer benefícios, pois a análise de células da boca servirá para verificar se há danos no material genético (DNA) ou alterações nas células e a sua possível associação com a obesidade e outros fatores (fumo, álcool, medicamentos). Como benefício, também serão realizadas palestras educativas sobre as relações entre saúde geral e saúde bucal, bem como cuidados com a saúde bucal.

Os pesquisadores envolvidos neste projeto garantem a você o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimento sobre os procedimentos realizados em qualquer etapa da pesquisa. Sua participação será voluntária, mas você poderá desistir de participar a qualquer momento. Você não será exposto, nem seu nome divulgado e as informações dadas serão mantidas em sigilo, sendo manipuladas somente pelo responsável pela pesquisa, assegurando proteção de sua imagem e respeitando valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados obtidos serão analisados e posteriormente divulgados para todos os interessados, a população em geral e em eventos científicos, mas sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer informações que permitam sua identificação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP). Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas pela cirurgiã-dentista Cristiane Alves Paz de Carvalho (14-8135-1231) ou reclamações com a Maristela no Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (14-3235-8356).

Pedimos a sua autorização e contamos com a sua participação.

Eu, _____, portador da identidade _____, fui informado dos objetivos e justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento em que estarei envolvido, que não haverá desconforto e os benefícios esperados. Entendi que não terei que pagar e nem serei pago por participar do estudo. Minhas dúvidas foram respondidas e sei que posso pedir esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que minha identidade e as informações prestadas terão caráter confidencial, serão guardadas sob sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica) e terei liberdade de retirar meu consentimento para participação, em qualquer fase da pesquisa. Diante disso, declaro que estou de acordo em ser voluntário e autorizo minha participação neste estudo. Declaro ainda que recebi uma cópia do presente termo de consentimento e uma cópia assinada por mim será mantida com a pesquisadora.

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru - SP, _____ de _____ de 2011.

_____
Assinatura do Voluntário

_____
Assinatura da Pesquisadora

Anexos

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da
Fundação Hospital Amaral Carvalho de Jaú - SP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fundação Hospital Amaral Carvalho
Rua Dr. Miranda Junior, 15, Jardim Alvorada – CEP 17.210-300 – Jaú / SP – ☎ (014) 3602-1194 – Email - 1052

F U N D A Ç Ã O
AMARAL CARVALHO

Parecer CEPFHAC – 071/11 - Recurso.
Projeto de Pesquisa:
Frequência de Micronúcleos em Células Esfoliadas da Mucosa Bucal de Pacientes Obesos
Documentos Analisados:
✓ Declaração sobre os Resultados da Pesquisa, datada de 22 de junho de 2011;
✓ Termo de Confidencialidade de Cristiane Alves Paz de Carvalho, datado de 22 de junho de 2011;
✓ Termo de Confidencialidade de Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres, datado de 22 de junho de 2011;
✓ Termo de Confidencialidade de Denise Tostes Oliveira, datado de 22 de junho de 2011

Responsável pelo Estudo:
Cristiane Alves Paz de Carvalho, graduada em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1999), com Especialização em saúde coletiva pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – Bauru (2006), Mestre em Saúde Coletiva pela Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru (2009) e Doutoranda em Patologia Bucal na Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP)

Trata-se de Recurso ao Parecer CEPFHAC nº. 71/11, datado de 17 de junho de 2011, onde os documentos analisados foram considerados aprovados com recomendação, sendo que a pesquisadora principal do estudo deveria encaminhar declaração sobre os resultados da pesquisa e garantir a confidencialidade através de declarações individuais.

Conforme se verifica acima, a pesquisadora anexou ao recurso declaração se comprometendo a tornar público os resultados da pesquisa, sejam eles favoráveis ou não, bem como os respectivos Termos de Confidencialidade dos participantes da pesquisa.

Não resta qualquer entrave ético que possa impedir o início da pesquisa.

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jaú, 01 de julho de 2011.

Dr. Ederson Roberto de Mattos
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 106 /2011

Bauru, 5 de setembro de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes obesos."**, de autoria de Cristiane Alves Paz de Carvalho, que será desenvolvido sob sua orientação e co-orientação da Profª Drª Denise Tostes Oliveira, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria

Coordenador

Profª Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres

Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO C – Aprovação do relatório final da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comitê de Ética em Pesquisa

Proc. CEP nº 106/2011

Bauru, 28 de junho de 2012.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que após análise por um Relator deste Comitê de Ética em Pesquisa, o **Relatório Final** do trabalho de pesquisa **Frequência de micronúcleos em células esfoliadas de mucosa bucal de pacientes obesos**, de autoria de Cristiane Alves Paz de Carvalho, sob sua orientação, foi **aprovado** por este Colegiado em reunião realizada no dia **27 de junho de 2012**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres
Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

---

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

ANEXO D - Questionário

Questionário de Saúde Pessoal**História Pessoal**

1. Nome: _____ Data: _____
2. Idade: _____ anos.
3. Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino
4. Grupo étnico: ☐ Caucasiano ☐ Negro ☐ Chinês ☐ Japonês ☐ Outro. Qual?
5. Estado civil: ☐ Casado ☐ Solteiro ☐ Separado ☐ Divorciado ☐ Viúvo
6. De quantos filhos você é pai/mãe natural (não inclua filhos adotados e de criação)?
7. Renda mensal da família:

História Ocupacional

8. Qual o seu local de trabalho?
9. Há quanto tempo você trabalha neste local?
10. Se há menos de 10 anos, onde você trabalhou antes e por quanto tempo?
11. a) Que tipo de trabalho você faz?
11. b) Qual é carga horária semanal de trabalho?

Exposição

12. a) Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, etc) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho.

Nos últimos 10 anos, quantas vezes por mês:

Nos últimos 12 meses, quantas vezes por mês:

12. b) Você usa algum tipo de proteção? ☐ Sim ☐ Não

Se sim, diga qual:

13. Liste os agentes químicos (agrotóxicos e outros que julgar necessário) ou físicos a que você se expôs nos últimos 10 anos fora de seu trabalho.

Nos últimos 10 anos, quantas vezes por mês:

Nos últimos 12 meses, quantas vezes por mês:

História de fumo

14. Alguma vez você fumou? ( ) Sim ( ) Não

Se não, passe para a questão 15. Se sim, continue:

a) Quanto tempo você fumou? (em anos)

b) Você fuma atualmente? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, passe para a 14.c)

Se não: Quando você parou de fumar? (mês e ano)

c) Você fuma cigarros? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantas carteiras por dia?

( ) Menos de ½ carteira ( ) 1/2 a 1 carteira ( ) Mais de 1 carteira. Quantas?

Você fuma cigarros com filtro? ( ) Sim ( ) Não

Qual a sua marca usual:

d) Você fuma charutos? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantos charutos por dia: ( ) 1 ( ) 2 a 3 ( ) 4 ou mais. Quantos?

e) Você fuma cachimbo? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quantas vezes por dia? ( ) 1 ( ) 2 a 3 ( ) 4 ou mais. Quantas?

f) O que você fumava no passado?

( ) Cigarros ( ) Charutos ( ) Cachimbo

g) Você mastiga tabaco? ( ) Sim ( ) Não

Medicamentos e doenças

15. Você tem tomado algum medicamento transcrito pelo médico, no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, ou outros)? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor indique:

Tipo de medicamento Dose Quantos por dia Início (mês) Término (mês)

16. Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, antiácidos, anti-histamínicos, sedativos ou outros)? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor indique:

Tipo de medicamento Dose Quantos por dia Início (mês) Término (mês)

17. Você tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor indique:

Tipo de vitamina   Dose   Quantas vezes por semana

18. Você teve ou tem alguma destas doenças?

Câncer   (   ) Sim   (   ) Não   Tipo:

Hepatite   (   ) Sim   (   ) Não   Tipo:

Mononucleose   (   ) Sim   (   ) Não

Herpes   (   ) Sim   (   ) Não

AIDS   (   ) Sim   (   ) Não

Meningite   (   ) Sim   (   ) Não

Infecção bacteriana ou viral   (   ) Sim   (   ) Não

Doença cardiovascular   (   ) Sim   (   ) Não

Diabete   (   ) Sim   (   ) Não

Doença renal crônica   (   ) Sim   (   ) Não

b) Indique:

Tipo de tratamento: Duração: Quantas vezes por semana:

Tempo (anos):   Tipo de dialisador: Esterilizante:

Nível de creatinina: Tratamentos anteriores: Doenças de base:

Outras doenças importantes   (   ) Sim   (   ) Não

c) Se sim, indique abaixo:

Doença: Período da doença: Tratamento:

d) Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses

Vacina: Data:

e) Liste os raios X diagnósticos e terapêuticos, recebidos nos últimos 12 meses.

Razão para o raio X: Data (ano):

f) Você fez alguma cirurgia durante o ano?

Data: Razão:

g) Dê as datas de quando você teve febre nos últimos meses.

Data (mês):   Doença associada: Medicamento tomado:

Dietas

(deve refletir apenas os hábitos frequentes)

19. Você come apenas vegetais? ( ) Sim ( ) Não

20. Você come carne? ( ) Sim ( ) Não

a) Se sim, com que frequência você come o seguinte:

Dias por semana

	1 a 2	3 a 4	5 a 6	todos os dias
Carne bovina				
Peixe				
Galinha				
Porco				
Outras				

b) Como você prefere sua carne?

( ) Mal passada ( ) No ponto ( ) Bem passada

21. Você usa adoçantes? ( ) Sim. Quantos por dia? ( ) Não

22. Você bebe refrigerantes? ( ) Sim. Quantos por dia? ( ) Não

23. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc)

24. Você bebe café? ( ) Sim ( ) Não

Quantas xícaras pequenas por dia?

25. Você bebe chá? ( ) Sim ( ) Não

Quantas xícaras por dia?

26. Você toma chimarrão? ( ) Sim ( ) Não

Com que frequência?

27. Você bebe cerveja? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

( ) Menos de uma garrafa por semana

( ) 1-6 garrafas por semana

( ) 7-12 garrafas por semana

( ) 13-24 garrafas por semana

( ) Mais de 24 garrafas por semana. Quantas?

28. Você bebe vinho? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

( ) 1-4 copos por semana ou menos

( ) 5-8 copos por semana

( ) 9-16 copos por semana

( ) Mais de 16 copos por semana. Quantos?

29. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

( ) Sim ( ) Não Se sim, qual ou quais?

Por favor, indique sua média de consumo semanal:

( ) 1-4 copos por semana ou menos

( ) 5-8 copos por semana

( ) 9-16 copos por semana

( ) Mais de 16 copos por semana. Quantos?

História Genética

30. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor, especifique:

31. Você ou sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar?

( ) Sim ( ) Não Se sim, por favor, especifique:

32. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado? ( ) Sim ( ) Não

33. Você tem um gêmeo idêntico vivo? ( ) Sim ( ) Não