Análise de Células Metanucleadas de Alcoólicos Portadores de Carcinomas Orais

ANDRÉA RAMIREZ

SÃO PAULO

2000

*Ao Sr. Andrés
cujos genes me
deram origem.*

*Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Saldanha dedico,
Descobri, durante todos esses anos, que o caminho
percorrido foi mais belo e enriquecedor que o objetivo final.*

“Não se deve afogar na maré montante humana, mesmo para tornar-se um Mestre. A gente deve bater seu próprio ritmo - a qualquer preço.”

Henry Miller
Trópico de Capricórnio

“Devo acrescentar que nunca me foi possível contar um história, ou seguir uma linha de raciocínio, sem enveredar por inúmeras viagens ou excursões secundárias ao longo do caminho e sempre vendo minha jornada mais rica em razão disso.”

Oliver Sacks
Vendo Vozes: Uma viagem ao mundo dos surdos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Saldanha, titular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, pela orientação de todas as etapas desta investigação e da minha formação científica com seriedade e carinho admiráveis.

À Prof^a. Dr^a. Gilka Jorge Fígaro Gattás do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP pela co-orientação nas atividades laboratoriais desta pesquisa.

Aos Drs. Marcos Brasilino de Carvalho e Abrão Rapoport do Hospital Heliópolis por selecionarem os pacientes e estimularem a realização dessa pesquisa.

Aos pacientes do Hospital Heliópolis e aos integrantes da Igreja Assembléia de Deus de Vinhedo pela boa vontade em participar do presente trabalho.

Aos Professores do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, especialmente aos Profs. Drs. Anita Wajntal, Célia P. Koiffman e Paulo Otto pelas oportunas contribuições à minha formação.

Aos Professores do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP, especialmente à Prof^a. Dr^a. Marcília de Araújo Medrado-Faria pelo companheirismo e incentivo à minha carreira acadêmica e profissional.

Ao Dr. José Arnaldo Soares-Vieira, à Bióloga Rita de Cassia R. Estanqueiro e Joilson de Oliveira Martins pelo coleguismo e prontidão nas atividades laboratoriais.

Ao Dr. Francisco Drumond Marcondes Moura Neto pela indicação e apresentação dos indivíduos controles.

Ao Claudio pela cuidadosa editoração gráfica e “Lili, Lú & Cia” pelo “suporte técnico”.

A todos os amigos, colegas e estagiários dos Institutos Oscar Freire e de Biociências, especialmente à Cristiane Angélica, Laila, Percília, Elen, Luciana, Renato e Luceleni, Paulo, Leide, Sérgio, Patricia, Marcelo, Cláudia, “Éricas”, Ana Beatriz, Silvia e Silvio.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Definições	1
1.2 - Aberrações cromossômicas e figuras interfásicas anômalas	2
1.3 - Frequência de micronúcleos em investigações de monitoramento mutagênico e carcinogênico	10
1.4 - Efeito mutagênico do álcool	22
1.4.1- Efeito mutagênico do álcool sobre os cromossomos humanos	24
1.4.2 - Efeito mutagênico do álcool sobre a frequência de micronúcleos	26
1.5 - Associação entre ingestão abusiva do álcool, neoplasias e frequência de micronúcleos	28
1.5.1 - Associação entre álcool e neoplasias	28
1.5.2 - Associação entre neoplasias, frequência de micronúcleos e agentes genotóxicos	32
1.6 - Carcinomas orais: patogenia, incidência e prevenção	39
1.6.1 - Patogenia	40
1.6.2 - Incidência	42
1.6.3 - Prevenção	44
2 - OBJETIVOS	49
3 - MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 - Casuística	50
3.1.1 - Caracterização da amostra dos sujeitos	51
3.1.2 - Caracterização da amostra dos controles	53
3.1.3 – Diferenças entre sujeitos e controles	55
3.2 - Análise citogenética das figuras interfásicas	57
3.3 - Análise estatística	62

3.4 - Abreviações e notações	66
3.4.1 – Abreviações	66
3.4.2 - Notações estatísticas	67
4 - RESULTADOS	69
4.1 - Distribuição das variáveis citogenéticas	69
4.1.1 - Distribuição da frequência de MN e de CMN nos sujeitos e controles	69
4.1.2- Distribuição da frequência das anomalias metanucleares nos sujeitos e controles	74
4.1.3 - Estatística descritiva das variáveis citogenéticas	76
4.1.4 - Ajuste à fórmula de Poisson	80
4.2 - Comparações intra-individuais	82
4.2.1 - Variáveis dependentes: CMN e TMN	82
4.2.2 - Variáveis dependentes: BI, CR, CL, BE	86
4.3 - Comparações inter-individuais (Pacientes vs. controles)	87
4.4. Efeitos da idade	90
5 - DISCUSSÃO	93
5.1 - Diferenças entre pacientes e controles	94
5.1.1 - Diferenças significantes das frequências médias de MN entre pacientes e controles ..	94
5.1.2 - Comparação com outras investigações de alcoólicos e/ou de indivíduos com neoplasias	96
5.1.3 - Diferenças das frequências das anomalias metanucleares entre pacientes e controles	98
5.1.4 - Relação entre as frequências de MN e das anomalias metanucleares	102
5.2 - Fatores intervenientes sinérgicos	107
5.2.1 – Variáveis não paramétricas	109

5.2.2 – Variáveis paramétricas	111
5.3 - Crítica metodológica	116
5.3.1 - Viéses decorrentes da análise citogenética	117
5.3.2 - Viéses decorrentes da análise estatística	122
5.4 - Perspectivas de investigações futuras	126
5.4.1 - Análise citogenética	126
5.4.2 - Indicadores de alterações no DNA (enzimas polimórficas)	127
5.4.3 - Estudo de irmãos	128
6 - CONCLUSÕES	129
7 - RESUMO	131
8 - ABSTRACT	136
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
10 - APÊNDICES	154
11 - BIOGRAFIA	147

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Definições

O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas (Rieger e col., 1968) ou, ainda, de falhas no fuso celular, sendo portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase. Pode estar presente em número de um ou mais por célula, com dimensão até 1/3 do tamanho do núcleo (Ribeiro, 1991).

Para os zoologistas, no entanto, os micronúcleos são conhecidos como os pequenos núcleos presentes nos ciliados. Nestes, são definidos como corpos pequenos e arredondados que variam em número de um até mesmo 20, dependendo da espécie. São diplóides, responsáveis pela recombinação genética, reorganização nuclear e pela origem do macronúcleo (Barnes & Rupert, 1994).

Estudando raízes de *Vicia faba*, Thoday (1951) referiu-se ao micronúcleo como sendo um “núcleo fragmentado” uma vez que este já havia sido descrito em *Paramoecia*. A palavra micronúcleo também foi usada no começo do século para descrever o pequeno núcleo “acessório” observado como consequência de divisões mitóticas irregulares em plantas inferiores e animais superiores. A irregularidade se referia a uma falha tanto em uma cromátide como em um cromossomo, ou ainda em um fragmento acêntrico de cromossomo, que deveria ser incluído em um dos dois núcleos filhos resultantes de divisões mitóticas ou meióticas (Evans, 1997).

Ainda no início do século, os hematologistas observaram que os reticulócitos de indivíduos esplenectomizados ou afetados por anemia hemolítica possuíam corpúsculos nucleares *Feulgen*¹ positivos. Essas estruturas, formadas por cromossomos que separavam-se do fuso mitótico, foram denominadas corpúsculos *Howell-Jolly* (Evans, 1997).

¹ Corante específico de DNA.

1.2 - Aberrações cromossômicas e figuras interfásicas anômalas

A mitose normal caracteriza-se pela duplicação cromossômica e pela segregação dos cromossomos filhos; entretanto, esses dois processos não estão necessariamente vinculados, podendo originar constituições cromossômicas anormais nas células (Therman & Susman, 1996).

Além disso, embora os mecanismos de reparo celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos durante a mitose e a meiose. A atuação desses agentes, dentre outras formas, é responsável pela origem das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas. O estudo dessas aberrações é de especial interesse quando envolve as células germinativas, gerando as síndromes e/ou anomalias congênitas no futuro concepto. Entretanto, quando tais aberrações ocorrem em células somáticas, podem levar à formação de um tecido neoplásico.

As anomalias cromossômicas estruturais responsáveis pela origem das figuras interfásicas anômalas observadas nas células da mucosa oral podem ser genericamente classificadas em quebras e rearranjos. Considera-se quebra, uma descontinuidade cromossômica com deslocamento da parte distal da cromátide maior que a largura da mesma. Quando a quebra é verificada pela ausência de coloração, raramente em ambas regiões das cromátides irmãs e sem correspondente descontinuidade das mesmas, denomina-se *gap*². As quebras podem ser classificadas em cromatídicas ou cromossômicas, se afetam uma ou ambas as cromátides, na mesma região, respectivamente. Além disso são consideradas quebras cromatídicas os fragmentos simples não emparelhados, e quebras cromossômicas os fragmentos acêntricos e as deficiências cromossômicas.

Os rearranjos são figuras oriundas da participação de dois ou mais cromossomos que realizam trocas entre as cromátides. Esses rearranjos são considerados cromatídicos se forem provenientes de alterações em uma só cromátide, e cromossômicos, se envolverem as duas cromátides. Dessa forma, as figuras multirradiais são classificadas como rearranjos cromatídicos,

² Significa brecha, fenda, lacuna

e os cromossomos em anel, dicêntricos, translocações recíprocas e inversões, como rearranjos cromossômicos .

Das anomalias cromossômicas numéricas, a única responsável pela origem dos micronúcleos, tanto em células da mucosa oral como em outras células, é a monossomia. Esta é caracterizada pela ausência de um representante de um par no conjunto cromossômico do indivíduo, como consequência de alterações no fuso mitótico que levam à perda cromossômica.

Os micronúcleos podem ser formados a partir de aberrações cromossômicas em células de diferentes tecidos que sofrem divisão celular constantemente *in vivo* ou em células que são submetidas à divisões celulares *in vitro*. A perda de fragmentos cromossômicos e a formação de micronúcleos provavelmente variam entre as células, dependendo das propriedades dos tecidos às quais pertencem. O tamanho e a forma tanto das células quanto dos cromossomos, podem influenciar a probabilidade de exclusão desse último do núcleo filho, tornando-se, então, um micronúcleo no citoplasma (Heddle e col., 1991).

Os mecanismos que levam à formação de micronúcleos e de outras figuras interfásicas são: a perda de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros, a inativação do cinetócoro, a formação de uma ponte cromossômica forte, como consequência de um entrelaçamento de cromossomos, ou ainda a apoptose³ com subsequente fagocitose (Heddle e col., 1991). Esses processos aparecem esquematizados na figura 1.

³ Morte celular programada que ocorre sob circunstâncias fisiológicas. É caracterizada por progressivas contrações do volume celular, condensação difusa da cromatina e preservação da integridade das organelas. As células sob esse processo são rapidamente fagocitadas pelas células adjacentes (Wyllie, 1981).

Uma alteração mitótica extremamente rara em células normais, porém descrita em células cancerosas de mamíferos, refletindo provavelmente anoxia e degeneração tecidual, é a mitose C, assim denominada devido à ação da droga colchicina. Os cromossomos comportam-se normalmente durante toda a prófase até a metáfase, porém, ou o fuso celular mostra-se defeituoso ou está ausente, de modo que os cromossomos não se reúnem na placa metafásica. Consequentemente, os cromossomos se dispersam na célula, se dividem e posteriormente se reúnem em um núcleo de constituição tetraplóide, ou formam micronúcleos de tamanhos variados. Via de regra esses micronúcleos são incapazes de se dividir posteriormente (Therman & Susman, 1996).

O micronúcleo também pode ter origem durante a meiose, como consequência de aberrações cromossômicas. Além disso, deve ser considerado o efeito do quiasma durante o qual ocorre uma inversão paracêntrica que pode gerar um fragmento acêntrico que, por sua vez, poderá formar um micronúcleo (Heddle e col., 1991).

A ação de qualquer agente químico que induza aberrações cromossômicas pode resultar, em teoria, em um aumento na incidência de micronúcleos. Entretanto nem sempre observou-se uma correspondência entre a frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos, de modo que muitos pesquisadores preocuparam-se em estabelecer padronizações. A relação quantitativa entre a frequência de aberrações cromossômicas e fragmentos acêntricos não era bem conhecida, com exceção de que nem todos os fragmentos acêntricos transformam-se em micronúcleo na primeira divisão celular, podendo sobreviver, replicar e se transformar em micronúcleo em divisões subsequentes (Heddle e col., 1991).

Durante a análise de micronúcleos, alguns pesquisadores mais minuciosos observaram a existência de outras anomalias nucleares, sugerindo que estas fossem contadas concomitantemente à análise convencional de micronúcleos em linfócitos (Schoroeder, 1970), em células do trato digestivo de ratos (Wargovic e col., 1983) e em células de escamação da mucosa oral (Tolbert e col., 1991; 1992). A frequência dessas anomalias nucleares pode evidenciar principalmente um efeito citotóxico, contribuindo para aumentar a especificidade do teste.

Essas anomalias nucleares, presentes em células de escamação da mucosa oral assim como os micronúcleos, estão relacionadas à injúria, morte celular ou ainda aos erros que ocorrem durante a divisão celular. Devido a própria natureza do epitélio escamativo ocorrem constantemente na mucosa oral. Atualmente discute-se bastante a respeito dos mecanismos que levam uma célula à apoptose e sua possível associação com essas anomalias e os estágios da carcinogênese (Nakano & Oka, 1990; Tolbert e col., 1991 e 1992).

Essas figuras nucleares anômalas compreendem as células binucleadas, cariorréxes, cariólises, *broken-eggs*, picnoses e cromatinas condensadas (Tolbert e col., 1992). Essas duas últimas não foram objetos de estudo do presente trabalho, entretanto todas essas anomalias, inclusive o micronúcleo, estão representados na figura 2.

Na histogênese do epitélio bucal, observa-se um tecido pavimentoso estratificado constituído por células intimamente aderidas umas às outras e dispostas em camadas ou estratos distintos. Sua integridade estrutural mantem-se através de um sistema de renovação celular constante, no qual as células produzidas por divisão mitótica nas camadas mais profundas migram para a superfície, substituindo aquelas que esfoliaram (Tem Cate, 1988).

Para os histologistas e patologistas, a melhor indicação de morte celular é a aparência dos núcleos das células, caracterizada por três estruturas mais típicas. A cariorréxis⁴, na qual os núcleos desintegram-se totalmente e formam por fim, fragmentos de material nuclear tão pequenos que são, por vezes, designados "poeira nuclear". A cariólise⁵ refere-se à dissolução nuclear,

⁴ Do grego *karyon* (noz, núcleo) + *rhexis* (decompor).

⁵ Do grego *karyon* + *lysis* (dissolução).

e a picnose⁶; figura mais comum, é representada por condensação do material nuclear, resultando em uma massa homogênea de coloração escura, citologicamente denominada hipercromática (Cormack, 1991).

A célula binucleada⁷ possui dois núcleos de tamanhos normais e iguais. Já a cariorréxis é representada pela presença de mais de três micronúcleos em uma mesma célula contendo ou não, dependendo do número de micronúcleos, um núcleo em decomposição. Cariólise é a dissolução do núcleo celular visualizada pela ausência de sua coloração e o *broken egg* é uma formação nuclear onde o núcleo aparece unido a um fragmento arredondado, eventualmente maior que um micronúcleo, por um “fio” também *Feulgen-positivo* (Tolbert e col., 1991; 1992).

Através da microscopia eletrônica é possível visualizar muitas alterações citoplasmáticas representativas de lesão celular. Entretanto, essas alterações podem ser comumente estudadas através do microscópio óptico que permite a observação do aumento do volume celular, da granulação citoplasmática, e do núcleo. Esse último pode apresentar coloração normal, algum hipercromatismo (picnose) ou completa dissolução (cariólise) (Wyllie, 1981). Ainda com o auxílio do microscópio óptico, é possível observar a transição do núcleo que se torna menor e mais denso (picnose), mais tarde se rompe (cariorréxis) e, finalmente, desaparece (cariólise), durante o processo degenerativo (Snell, 1985), mostrando que todas essas figuras fazem parte de um processo comum de degeneração celular aqui denominados de anomalias metanucleares)⁸.

A formação das células binucleadas ocorre antes do processo de diferenciação celular do epitélio estratificado escamoso, sendo, portanto, representativas de alterações citológicas. Na binucleação, apesar da interferência de eventos tardios à divisão celular, provavelmente não ocorrem interações com o DNA. As conseqüências dessa alteração ainda são desconhecidas (Tolbert, 1992).

⁶ Também de origem grega, significa condensação.

⁷ A célula binucleada é normalmente encontrada em fungos

⁸ Do grego *metá* (além ou depois) exprime posteridade, sucessão, mudança ou transformação.

A cariorréxe se evidencia tanto em células que sofrem necrose⁹, como nos estágios iniciais da apoptose. Esta última, por ser estimulada por radiação ionizante e por moléculas presentes em agentes químicos que se ligam ao DNA, pode ser responsável pela eliminação de células com lesões genéticas. Dessa forma, um aumento no processo apoptótico, indicado por essa anomalia nuclear, pode estar relacionado à insulto genotóxico (Tolbert e col., 1991; 1992).

A cariólise acompanha o processo que precede a queratinização, representando uma resposta adaptativa às injúrias celulares em epitélios normalmente não-queratinizados (Pindborg e col., 1980; Shklar, 1965) e é tão evidente como a cariorréxe em células que sofrem necrose (Wyllie, 1981; Tolbert e col., 1991, 1992).

O *broken-egg* foi primeiramente comunicado por Sarto (1988) e descrito por Tolbert (1992), mas sua origem e significado ainda são desconhecidos. Mais estudos precisam ser realizados para a definição dessa alteração como uma reação, degeneração neoplásica ou fenômeno não específico (Roberts, 1997).

Enquanto alguns autores excluíram as anomalias metanucleares (*stricto sensu*)¹⁰ da análise de células de escamação da mucosa oral (Özkul e col., 1997) provavelmente devido às dificuldades quanto a distinção entre estas e os próprios micronúcleos, Bhattathiri e col. (1998) sugeriram a contagem de células com “brotos nucleares”¹¹.

Entretanto, o estudo das anomalias metanucleares é muito escasso na literatura e, quando presente, apenas acompanha a análise de micronúcleos. Em células de escamação da mucosa oral, verificou-se um aumento na frequência de picnose, cromatina condensada, cariorréxe e cariólise em usuários de tabaco de rapé (Tolbert e col., 1991) e uma frequência aleatória de *broken-egg* tanto em usuários de rapé como em controles (Roberts, 1997). Observou-se ainda, um aumento na frequência de cariorréxe em usuários de rapé (Livingston e col., 1990). Essa

⁹ Morte celular provocada por alterações mórbidas no ambiente celular. É caracterizada por intumescimento que culmina em ruptura do plasma e das membranas internas, e vazamento do conteúdo celular para o espaço extracelular (Wyllie, 1981).

¹⁰ Para distinguir dos MN (*lato sensu*).

¹¹ Estruturas semelhantes aos micronúcleos porém unidas ao núcleo principal. Acredita-se que sejam micronúcleos sobrepostos ou incompletamente expelidos e que portanto, permaneçam contíguos ao núcleo principal (Bhattathiri e col., 1998).

frequência, quando associada à cariólise, foi superior a 21% em mulheres sadias (Titenko-Holland e col., 1994).

Sucessivas doses de irradiação durante tratamento radioterápico revelou em células tumorais de escamação do cérvix uterino, a presença de cariólise, cariorréxe e picnose, além de citólise e células gigantes bizarras com doses iguais ou superiores a 1800 cGy¹² (Nakano & Oka, 1991). Ainda, uma alta frequência de células anucleadas, binucleadas, e multinucleadas, formas e tamanhos anormais do núcleo, entre outras anomalias, foram observadas em usuários do tabaco de mascar (Garewal e col., 1993).

Recentemente, Torrs-Bugarn e col. (1998) encontraram aumento na frequncia de anomalias metanucleares, mas no de microncleos na boca de indivduos que assopram *diesel* combustvel em tochas para fazer um efeito de “drago”. Ainda, a incidncia de “brotos nucleares” foi maior que a de microncleos, clulas binucleadas ou mesmo multinucleadas em pacientes com cncer de boca durante o tratamento radioterpico (Bhattathiri e col., 1998).

¹² Centsima parte da unidade *Gray* (*centiGray*). O *Gray* a unidade de medida de qualquer tipo de radiao ionizante usada em radioterapia para avaliar a quantidade de radiao absorvida pelos tecidos. Substitui a unidade rad desde 1975 de modo que 1Gy = 1J/Kg = 100 rad.

1.3 - Frequência de micronúcleos em investigações de monitoramento mutagênico e carcinogênico

O micronúcleo vem sendo reconhecido como indicador de danos genotóxicos desde a década de 30 com a publicação das investigações sobre radiação de Brenneke e Mather em 1937 (Heddle e col. 1983), seguida pelas de Carlson (1938), Sax (1941) e Koller (1943), que estudaram *in vitro*, respectivamente, neuroblastos de gafanhotos, meristemas da raiz de cebola e grãos de pólen de *Tradescantia*, após irradiação X (Evans, 1997).

Não obstante, a primeira tentativa válida de usar o micronúcleo para monitorar danos citogenéticos foi realizada pela equipe de Evans em 1959, usando sua frequência para medir os danos citogenéticos induzidos por radiações em coifas de *Vicia faba*. Esses autores observaram que todas as quebras cromatídicas, cromossômicas e isocromatídicas, assim como trocas assimétricas e simétricas incompletas originavam fragmentos acêntricos durante a mitose e, ainda, que esses fragmentos eram freqüentemente excluídos dos núcleos filhos mas observados como micronúcleos na intérfase seguinte (Heddle e col. 1983).

A frequência de micronúcleos em plantas continua, atualmente, a ser utilizada para monitorar o efeito genotóxico de íons de metais pesados. Em um estudo com *Vicia faba*, *Allium cepa* e *Tradescantia sp.*, Steinkellner e col. (1998) verificaram que esta última é a planta mais sensível para o biomonitoramento de solos contaminados por metais.

A Segunda Guerra Mundial (1939-1945) trouxe o conhecimento dos agentes mutagênicos químicos e, em particular, das radiações ionizantes, aumentando as preocupações com seus efeitos sobre a espécie humana. Consequentemente, justifica o enorme número de pesquisas *in vitro* e *in vivo* que foram iniciadas nessa época levando ao reconhecimento da genética toxicológica como uma nova disciplina em 1969. Desde então, a Genética Toxicológica já tinha como preocupação implementar os métodos de avaliação para definir o impacto dos agentes genotóxicos no ambiente cuja presença pode alterar a integridade do material genético humano e, além disso,

aplicar metodologias genéticas para a identificação e compreensão dos mecanismos de ação dos carcinógenos (Brusick, 1987).

Na década de 70, alguns pesquisadores verificaram que os eritrócitos expeliam, por razões desconhecidas, seu núcleo principal durante a diferenciação celular, preservando os micronúcleos. Desse modo, a frequência de micronúcleos em eritrócitos poderia indicar o dano citogenético *in vivo* causado por agentes mutagênicos. Os corpos *Howell-Jolly* foram então, considerados equivalentes aos micronúcleos em eritrócitos (Matter & Schmid, 1971; Hedlle, 1973; Schmid, 1975; Evans, 1997).

Os primeiros testes do micronúcleo foram realizados em eritrócitos de camundongos com o objetivo de confirmar a presença de material cromossômico no micronúcleo. Heddle & Carrano (1977) quantificaram o DNA tanto de núcleos diplóides, como de micronúcleos e verificaram que, nesses últimos, a quantidade de DNA correspondia à de fragmentos cromossômicos acêntricos. A análise metafásica de células hibridizadas com micronúcleos revelou a presença de cromossomos extras (Viaggi e col., 1987), confirmando a relação entre micronúcleo e cromossomo.

Anos depois, ainda em eritrócitos de camundongos, os pesquisadores aplicaram tanto o teste do micronúcleo como o da análise clássica de aberrações cromossômicas, com a finalidade de comparar a sensibilidade do teste do micronúcleo (Kliesch & Adler, 1980; Högstedt, 1984; Pincu e col. 1984). Trabalhos subsequentes tentaram postular a relação entre o tamanho do micronúcleo e o tipo de alteração cromossômica. Os micronúcleos menores seriam formados por fragmentos cromossômicos, enquanto os maiores por cromossomos inteiros. Tal associação contribuiu para a classificação de agentes mutagênicos em clastogênicos ou aneugênicos (Yamamoto & Kikuchi, 1980; Vanderkerken e col., 1989; Vanparys e col., 1990).

O teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos de medula óssea passou, então, a ser aplicado juntamente com os outros testes clássicos de mutagenicidade, como o de Ames¹³ e o da análise de aberrações cromossômicas para a avaliação de agentes potencialmente mutagênicos (Connor e col., 1979, Jensen & Ramel, 1980). Devido às suas vantagens, o teste do micronúcleo foi indicado como alternativo para a tradicional análise de aberrações cromossômicas nos estudos de genética toxicológica, de modo que ficou conhecido como o teste do micronúcleo *in vivo* (Heddle, 1973; Jenssen & Ramel, 1980; Evans, 1997).

As principais vantagens do teste do micronúcleo em relação ao da análise de aberrações cromossômicas são simplicidade e rapidez com a mesma sensibilidade (Heddle, 1973; Heddle e col. 1983; Kliesch & Adler, 1980). Além disso, o micronúcleo pode ser visualizado durante a intérfase quando um número ilimitado de células podem ser contadas. Os micronúcleos formados durante uma divisão celular persistem pelo menos, até a intérfase seguinte, de modo que a fase de coleta do material é menos crítica e a frequência espontânea de micronúcleos é baixa e quase uniforme nas diferentes espécies; também, não é necessário um cariótipo favorável para a análise. O micronúcleo é facilmente reconhecido, até mesmo por pessoas com pouco treinamento em análise citogenética e permite avaliar efeitos clastogênicos e aneugênicos (Heddle e col. 1983), tornando-se prioritário em análise epidemiológica de mutagenicidade.

A contagem de MN em células de escamação da mucosa oral também é tecnicamente, mais simples do que a análise de SCE (Adhvaryu e col., 1991) e revela a mesma sensibilidade (Stich & Rosin, 1984).

A padronização do teste do micronúcleo em diversos tecidos, principalmente em eritrócitos policromáticos, foi proposta por Heddle e col. (1983), com o objetivo de verificar a possibilidade da substituição do teste de análise cromossômica nos estudos de mutagenicidade. Durante esse trabalho, estabeleceu-se adequadamente os agentes químicos designados pela *Environmental Protection Agency (EPA)* como carcinógenos, diminuindo o número de resultados falso-negativos, uma vez que muitos desses agentes são espécie-específicos ou até mes-

¹³ Teste em bactéria *Salmonella typhimurium*, onde o efeito do agente mutagênico é verificado diante de uma mutação representada pelo crescimento de colônias em meios de cultura pobre em histidina (Ames e col., 1975).

mo tecido-específicos. Essa metodologia ainda vem sendo estabelecida e a substituição do teste de aberrações cromossômicas pelo de micronúcleos ainda é discutida (Heddle e col., 1991; Kirsch-Volders, 1997). Atualmente, apesar da avaliação de agentes mutagênicos ser realizada através de vários testes de mutagenicidade em muitos tecidos na tentativa de elucidar a questão (Nakano, 1992; Moura, 1996), sabe-se que o teste do MN não pode substituir a análise de aberrações cromossômicas diante da necessidade descobrir mais do que quebras ou perdas cromossômicas (Fenech, 1997).

Em 1983, Krepinsky e Heddle demonstraram que o teste do micronúcleo poderia ser efetivamente usado para detectar danos em linfócitos de seres humanos expostos à radiação ionizante (Evans, 1997). Entretanto, em virtude da fragilidade dessas células durante a manipulação, e as respostas variadas dos linfócitos aos estímulos mitogênicos, novas alterações foram realizadas nos protocolos desse teste. A mais importante foi o uso da Citocalasina B para marcar a divisão celular uma vez que essa droga é inibidora da cariocinese, ficando as células com o número de núcleos correspondentes ao número de divisões celulares à que foram submetidas (Fenech & Morley, 1985).

Desde a descoberta da Citocalasina B, o teste do micronúcleo em linfócitos vem auxiliando os estudos da genética toxicológica no biomonitoramento de populações humanas expostas à agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos de atuação sistêmica (Al-Sabti e col., 1992; Anwar, 1994; Franchi e col., 1994; Fenech e col., 1997; Silva Augusto, 1997). Paralelamente aos primeiros estudos da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos, alguns pesquisadores se interessaram pelo estudo da frequência de micronúcleos em células de escamação de outros tecidos considerados alvos específicos da ação de agentes mutagênicos como brônquios, bexiga e ureter, cérvix uterino, mucosa nasal e mucosa oral. Muitos estudos, ainda, foram realizados associando as frequências de micronúcleos em linfócitos com de outros tecidos para a avaliação conjunta tanto do efeito sistêmico, como do efeito local das substâncias genotóxicas (Sarto e col. 1990a; Diaz, 1990; Anwar, 1994; Gonsebatt e col., 1997), ampliando a relevância do teste no monitoramento de populações expostas.

A Cidade do México possui um gradiente de poluição atmosférica devido à variação topográfica na ação eólica, que promove em suas regiões norte e sul, concentrações de diferentes tipos de agentes mutagênicos. Considerando esta situação, Valverde e col. (1997) investigaram danos no material genético de moradores das duas regiões através do teste do micronúcleo tanto em mucosa oral quanto em nasal, além de aplicarem o teste do cometa¹⁴ em linfócitos. Esses pesquisadores encontraram diferenças significativas entre os dois grupos nos linfócitos e na mucosa nasal, mas não na mucosa bucal; acreditam que esses resultados ocorram porque as pessoas respiram predominantemente pelo nariz e também porque os níveis de peroxidases presentes na saliva inibem a ação de poluentes mutagênicos.

Ainda no México, analisou-se o efeito genotóxico do arsênico diluído na água que abastece duas populações rurais. As concentrações de arsênico foram dosadas nas urinas e a frequência de micronúcleos foi avaliada em células epiteliais da mucosa oral e bexiga. Os homens foram mais afetados do que as mulheres, e um número elevado de células micronucleadas foi encontrado em indivíduos com lesões cutâneas. Além disso, a análise de aberrações cromossômicas revelou um aumento significativo na frequência de deleções cromatídicas e isocromatídicas nos linfócitos dos indivíduos expostos. Esses tipos de danos citogenéticos forneceram evidências de que o arsênico é um agente carcinogênico clastogênico e aneugênico (Gonsenbatt e col., 1997).

Ilyinskikh e col. (1996) analisaram a frequência de micronúcleos em eritrócitos e linfócitos de habitantes de regiões próximas a uma usina atômica siberiana, a Tomsk-7, que sofreu acidente em 1993. Embora todas as pessoas tivessem um aumento no número de micronúcleos quando comparadas com o grupo controle, os autores observaram que as pessoas nascidas entre 1963-1970 tiveram um nível muito maior de células micronucleadas. Esse aumento também foi atribuído ao acidente de 1963, porém, o monitoramento dessas pessoas após dois anos revelou uma diminuição gradual no número de micronúcleos. Dessa forma, concluíram que a

¹⁴ *Single cell gel eletrophoresis (SCGE)* ou mais popularmente conhecido por *Comet assay* é um teste molecular capaz de detectar danos e reparos no DNA de células individuais. Nessa técnica de eletroforese em microgel (preparado em lâminas para microscopia óptica) as células são lisadas e submetidas à corrente elétrica sob condições alcalinas. Ao microscópio óptico as células podem apresentar-se intactas (sem quebras no DNA) ou na forma de "caudas de cometas" (representação de quebras no DNA). O comprimento da "cauda do cometa" indica a quantidade de quebras no DNA da célula (Hartmann & Speit, 1995).

absorção de radionuclídeos pelo organismo materno nos períodos pré e pós-natal podem levar à formação de clones de eritrócitos estáveis com micronúcleo e um aumento no número de eritrócitos com micronúcleo, que podem permanecer no sangue por longo período.

O teste do micronúcleo também vem sendo utilizado para avaliar a genotoxicidade ambiental através de seres vivos usados como biomarcadores da qualidade dos ecossistemas. Consequentemente, muitos estudos avaliaram a frequência de micronúcleos em organismos aquáticos, por exemplo mexilhões (Kuhnen e col., 1998) e principalmente peixes (Agostini e col., 1998; Iranço e col., 1998; Lemos e col., 1998). Populações naturais de roedores de minas de carvão também foram informativas (Heuser e col., 1998).

A avaliação dos riscos de exposição à agentes mutagênicos pode, ainda, ser realizada através de estudos experimentais. Analisando os micronúcleos de células ao longo do tubo digestivo de ratos tratados com formaldeído diluído em água, Migliore e col. (1989) observaram que a frequência de micronúcleos varia nos epitélios de acordo com o grau de irritação local da droga. Outro estudo experimental avaliou a genotoxicidade do extrato de tabaco de cigarros com baixos teores de nicotina e alcatrão através da indução *in vitro* de micronúcleos em culturas de células pulmonares de mamíferos. A frequência de micronúcleos, associada à formação de aductos de DNA¹⁵ marcados com fósforo radioativo, revelou que os carcinógenos aromáticos, como o benzo(a)pireno provenientes do extrato de tabaco, não foram responsáveis pela indução do dano citogenético (Jones e col., 1991).

Diversos pesquisadores estudaram o potencial genotóxico do tabaco diretamente em humanos. Em um estudo extenso, Au e col. (1991) investigaram a frequência de micronúcleos em linfócitos de fumantes e de não fumantes. A análise de regressão revelou que o consumo de

¹⁵ Produtos adicionais que se ligam ao DNA formados a partir de reações eletrofílicas, principalmente covalente, de alguns compostos químicos com o DNA. As posições nas bases do DNA nos quais os aductos são formados podem ser específicas para um determinado agente mutagênico. Os agentes alquilantes, por exemplo, podem formar aductos pela adição de grupos alquila às bases nitrogenadas promovendo um pareamento errôneo ou, através da formação de alterações secundárias no DNA como a perda de uma base com consequente inserção de uma base incorreta. Outros tipos de aductos são formados a partir da inserção de moléculas planas entre os pares de bases do DNA. Essa interação não covalente pode estimular a deleção de pares de base ou a inserção de bases extra quando o DNA é replicado (*frameshifts*). Ainda, a irradiação por luz ultravioleta pode levar à formação de dímeros de pirimidina no DNA, moléculas imensas que podem bloquear a replicação e causar morte celular (Klaassen, 1996).

cigarros promoveu um aumento na frequência de micronúcleos associado à idade nos fumantes. O uso de complexos vitamínicos, potenciais inibidores do processo mutagênico, não revelou efeito na frequência de micronúcleos tanto em fumantes como em não fumantes. Além disso, a irradiação nos linfócitos dos dois grupos e a análise de aberrações cromossômicas mostraram aumento na frequência de translocações nos fumantes quando comparados ao grupo controle. Esses dados sugerem que os linfócitos de fumantes exibem maior dificuldade no reparo do DNA de células lesadas.

Analizando a frequência de micronúcleos em células de escamação da mucosa oral de 50 indivíduos fumantes e não fumantes, Sarto e col. (1987) verificaram que, apesar da frequência de micronúcleos e de células com micronúcleos de origem clastogênica ter sido aproximadamente duas vezes maior nos fumantes em relação aos não fumantes, diferença esta estatisticamente significativa, a frequência de micronúcleos formados por distúrbios do fuso celular foi quase a mesma em ambos grupos. Mais recentemente, a avaliação da frequência de micronúcleos em células esfoliadas do colo uterino de 200 mulheres revelou um aumento estatisticamente significativo nas fumantes em relação às não fumantes (Cerqueira, 1996).

O teste do micronúcleo aplicado em células de escamação da mucosa oral de 38 usuárias de tabaco de rapé e de 15 não usuárias revelou que a micronucleação foi estatisticamente maior nas usuárias, embora o local de contato usual do tabaco fosse menos importante, quando comparado com outras regiões bucais (Tolbert e col., 1991). Entretanto, a análise da frequência de micronúcleos na mucosa oral de três grupos de indivíduos: fumantes, usuários de *Maras Powder*¹⁶ e não fumantes não usuários de *Maras Powder* como controle, revelou aumento estatisticamente significativo nos indivíduos abstêmios para esses dois hábitos. Além disso, não houve diferença entre as porcentagens médias dos usuários de *Maras Powder* e fumantes (Özkul e col., 1997).

Por outro lado, a frequência de SCE¹⁷ e de micronúcleos em linfócitos de 1.650 italianos saudáveis revelou que a ocorrência de SCE diminuiu linearmente conforme o tempo de absti-

¹⁶ Pó de tabaco de *Nicotiana rustica* quando colocado na região fundo de saco gengivo-labial inferior da boca. É um tipo de tabaco de rapé usado na região sudeste da Turquia.

¹⁷ *Sister chromatid exchange* (trocas entre cromátides irmãs). São manifestações citológicas de quebras que ocorrem no mesmo loco das duas cromátides de um cromossomo, seguidas de intercâmbio e reparo. Esse fenômeno foi descrito primeiramente por Taylor e col. (1958), que observaram alternância na marcação por auto-radiografia entre as cromátides de alguns cromossomos que haviam se duplicado na presença de timidina tritiada.

nência ao fumo, atingindo os valores médios das pessoas abstinentes há oito anos. Além disso, o sexo e a idade foram as variáveis mais importantes associadas ao aumento na frequência de micronúcleos, enquanto o hábito de fumar não revelou efeito algum (Barale e col., 1998).

O teste do micronúcleo também pode ser utilizado para monitorar indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes genotóxicos, apontando para a necessidade de implementação de medidas de segurança e remanejamento de tarefas. A frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico e da mucosa oral de trabalhadores da indústria de tintas, bem como a de um grupo controle formado por doadores de banco de sangue foi avaliada por Diaz e col. (1990). Observou-se um aumento na frequência de micronúcleos nos trabalhadores em ambos tecidos estudados.

Desde o final da década de 70, quando por ocasião da crise mundial do petróleo, o álcool passou a ser utilizado como combustível alternativo no Brasil. Através do teste do micronúcleo em mucosa oral monitorou-se frentistas de postos de combustíveis automotivos de São Paulo em três etapas. Em 1989 a frequência de células com micronúcleos bem como a frequência total de micronúcleos desses trabalhadores não diferiu da observada em indivíduos não expostos. Entretanto, a partir de 1990, devido à escassez do etanol, introduziu-se nos postos de reabastecimento um combustível conhecido por MEG¹⁸. Então uma nova avaliação citogenética foi realizada, na qual a frequência de micronúcleos dos mesmos frentistas revelaram diferenças altamente significantes quando comparadas com os indivíduos controles. Em 1996, houve uma queda drástica na produção de carros movidos a álcool no país, quando analisou-se novamente as células da mucosa oral dos frentistas, as quais ainda revelaram diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos expostos e não expostos. Entretanto, quando comparadas as frequências de micronúcleos dos indivíduos expostos durante as três etapas da análise, somente a segunda revelou aumento significativo de três vezes, provavelmente devido ao efeito sinérgico entre a gasolina e o metanol (Gattás, 1997).

O mercúrio é um metal pesado amplamente utilizado na indústria e responsável por uma série de danos nos seres vivos, inclusive cerebrais devido a sua impregnação nas células de

¹⁸ Mistura composta por 60% de etanol, 33% de metanol e 7% de gasolina.

Purkinge. Consequentemente, alguns autores avaliaram seu potencial genotóxico em células da mucosa oral de enfermeiras expostas, encontrando aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos quando comparadas a um grupo controle (Soares-Vieira e col., 1993).

Ainda utilizando células de escamação da mucosa oral, o biomonitoramento de enfermeiras expostas à drogas antineoplásicas revelou aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos quando comparadas com seus respectivos controles (Machado-Santelli e col., 1994). Já em trabalhadores da Construção Civil, apesar de não ter sido encontrada associação entre a frequência de micronúcleos e a exposição ocupacional, observaram-se aumento na frequência de micronúcleos em carpinteiros revelando que estes trabalhadores não podem ser utilizados como controles no monitoramento de populações exposta (Doppenshmitt e col., 1996).

Em mineiros expostos ao carvão mineral de Criciúma em Santa Catarina, observou-se aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos da mucosa oral quando comparadas com a de seus respectivos controles. Além disso, verificou-se nos linfócitos dos mineiros diminuição do índice mitótico e um excesso de fragmentos cromossômicos (Agostini e col., 1996).

Em linfócitos de trabalhadores de uma indústria química de São Paulo expostos a uma mistura de solventes organoclorados observou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos em relação ao grupo de indivíduos não expostos (Silva-Augusto e col., 1997). Observou-se resultado semelhante em populações expostas à pesticidas organofosforados (Titenko-Holland e col., 1997, Gómez-Arroyo e col., 1998).

Utilizou-se o teste do micronúcleo em células de escamação da mucosa oral e nasal para monitorar o risco genotóxico em dois grupos de trabalhadores: um exposto ao ácido crômico e outro ao óxido de etileno. A frequência de micronúcleos na mucosa nasal não foi alterada pelo ácido crômico e também não ocorreu aumento significativo no grupo exposto cronicamente ao óxido de etileno. Entretanto, os autores observaram um aumento estatisticamente significativo

em dois de três indivíduos envolvidos em um acidente industrial com vazamento de óxido de etileno (Sarto e col., 1990b).

O efeito genotóxico do formaldeído foi avaliado em células da mucosa oral, nasal e em linfócitos de estudantes expostos durante as aulas de anatomia. Observou-se um aumento na frequência de micronúcleos nas células de escamação de ambas mucosas, porém não houve um aumento estatisticamente significativo nos linfócitos (Ying e col., 1997). A ação mutagênica do formaldeído já havia sido avaliada em trabalhadores da indústria de madeira compensada, revelando aumento na frequência de micronúcleos na mucosa nasal em comparação com um grupo controle (Ballarin e col., 1992).

Avaliou-se a frequência de SCE e de micronúcleos em linfócitos, assim como de agentes genotóxicos no ar atmosférico e também da expiração de 50 indivíduos responsáveis pela operação de equipamentos e manutenção de aviões de uma instalação militar. Quando comparados com oito indivíduos não expostos, houve um aumento pequeno, mas estatisticamente significativo na frequência de SCE depois de 30 semanas de exposição nos indivíduos que trabalhavam com lâminas de metal e nos pintores. (Lemasters e col., 1997).

Atualmente é possível avaliar o efeito do agente mutagênico através de anticorpos anti-cinetócoros e por sondas de hibridização do DNA (Heddle e col., 1991). As sondas centroméricas fluorescentes são as mais utilizadas através da técnica de *FISH*¹⁹ (Titenko-Holland e col., 1994; 1996; Surrallés col., 1997), inclusive associada à antígenos *CREST*²⁰ (Schuler e col. 1997).

Surrallés e col. (1997) estudaram uma população ocupacionalmente exposta ao benzeno em indústria petroquímica comparada a controles pareados por idade. Considerando que o

¹⁹ *Fluorescence in situ hybridization* (hibridização fluorescente *in situ*). Técnica onde moléculas fluorescentes marcam no cromossomo, uma sequência específica de DNA afim de que esta seja visualizada através do microscópio óptico. Sob condições propícias, uma sequência pequena de DNA marcado (sonda) se liga especificamente ao seu complemento durante a hibridização, enquanto toda a morfologia do cromossomo alvo é preservada. Com essa técnica, pode-se determinar visualmente se uma sequência específica de DNA está presente na célula, em qual cromossomo, e como ela está posicionada em relação à outras sequências marcadas no mesmo cromossomo ou em outros da mesma célula (García-Sagredo, 1996).

²⁰ *Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia*. Doença auto-imune onde os indivíduos afetados produzem anticorpos específicos de cinetócoros (Schuler e col. 1997).

benzeno tem uma ação leucemogênica e que o epitélio bucal também é adequado para monitorar exposição humana à agentes genotóxicos, os autores usaram sondas fluorescentes para avaliar o conteúdo dos micronúcleos tanto em linfócitos como em células da mucosa oral. Para a análise dos linfócitos, usaram sonda pan-centromérica e para a dos micronúcleos da mucosa oral usaram uma sonda do cromossomo nove, devido ao fato da trissomia desse cromossomo estar relacionada com neoplasias induzidas por exposição ao benzeno. Não observou-se aumento na frequência de micronúcleos, tanto formados por cromossomos inteiros, como por seus fragmentos, ou ainda, por anomalias numéricas do cromossomo nove. A ausência de resultados positivos ocorreu tanto nas células da mucosa oral como nos linfócitos, indicando que os níveis de exposição ao benzeno observados (1p.p.m.)²¹ não induziram efeitos clastogênicos ou aneugênicos detectáveis nos trabalhadores expostos.

O teste do micronúcleo pode ser utilizado ainda, como um “dosímetro endógeno” (Stich e col., 1985) dos indivíduos permitindo a avaliação do papel dos nutrientes na prevenção contra o dano genotóxico. Consequentemente, Fenech & Rinaldi (1994) mediram as taxas de vitaminas (C, E, B₁₂ e ácido fólico) e utilizaram o teste do micronúcleo em linfócitos tratados com a citocalasina B²² para estimar a frequência de micronúcleos de 152 mulheres e 113 homens não-fumantes. Análises de regressão estatística revelaram que a frequência de micronúcleos tem correlação positiva com a idade em ambos sexos e com os níveis plasmáticos da vitamina C somente no sexo masculino, enquanto nenhum efeito foi atribuído às vitaminas do complexo B. Concluindo, os autores sugerem a análise das taxas dessas vitaminas em novos estudos epidemiológicos de avaliação de danos genéticos.

O dano genético espontâneo, a variabilidade inter-individual e a influência da condição nutricional em seres humanos foram avaliados em 22 indivíduos esplenectomizados, através da frequência de micronúcleos em eritrócitos e linfócitos. Esses indivíduos foram selecionados de uma amostra de 122 por representarem os maiores e os menores valores da variabilidade para a frequência de micronúcleos em ambos tipos celulares. Avaliaram-se também a frequência de

²¹ Parte por milhão.

²² Droga extraída do fungo *Helminthosporium dematoides*. A citocalasina B atua especificamente bloqueando a citocinese porque impede a polimerização da actina necessária para a formação do anel de microfilamentos. Esse anel é o responsável pelo estrangulamento que divide o citoplasma das células na telófase.

SCE e os níveis de vitaminas antioxidantes, B₁₂ e folato, no plasma. A variabilidade na frequência de micronúcleos em eritrócitos dos indivíduos estudados foi em torno de 10 vezes. Quanto à frequência de micronúcleos em linfócitos, a variação foi de seis vezes, e duas vezes quanto à frequência de *SCE*. As taxas das vitaminas B₁₂ e α -tocoferol²³ plasmáticas e de folato, tanto das hemácias como do plasma, desviaram da normalidade atingindo valores maiores que dez vezes entre os indivíduos estudados. Entretanto, destacando-se os sete indivíduos com as maiores frequências de micronúcleos em eritrócitos observou-se, excepcionalmente, baixos valores de vitamina B₁₂ e folato tanto no plasma como nas hemácias, sugerindo que a ausência desses nutrientes seja responsável pela exacerbação dos tipos de danos que levam à formação espontânea de micronúcleos nos eritrócitos (MacGregor e col., 1997).

²³ Vitamina E (C₂₉H₅₀O₂)

1.4 - Efeito mutagênico do álcool

O efeito mutagênico do álcool, mais especificamente do etanol, vem sendo estudado em diversos organismos tais como bactérias (Nagao e col., 1981; De Flora e col., 1984; Hayes e col., 1984), fungos (Käfer, 1984), plantas - *Vicia faba* e *Allium cepa* (Schubert e col., 1979; Cortés e col., 1986) e invertebrados - gafanhotos e drosófilas (Vogel & Chandler, 1974; Muñoz, 1990; Rey e col., 1992).

Estudos realizados em roedores revelaram resultados contraditórios nos quais o etanol induziu aberrações cromossômicas em diversos tecidos (Washington e col., 1985; Kaufman, 1983; Daniel & Roane, 1986) e micronúcleos em eritrócitos (Baraona e col., 1981), porém não provocou efeitos mutagênicos (Obe & Anderson, 1987; Lin e col., 1989; Korte e col., 1981; Bariliak & Kozachuk, 1983).

Ainda em roedores, o etanol foi considerado responsável pela inibição do efeito mutagênico do uretano (Choy e col., 1995). No entanto, acredita-se que o etanol potencialize a ação de outros agentes mutagênicos. Avaliou-se o efeito clastogênico do etanol e do *Pan masala*²⁴ sobre as células de ovário de *hamster* chinês através da frequência de aberrações cromossômicas. O tratamento simultâneo dessas células com etanol e extratos aquosos de *Pan masala* elevaram as frequências de aberrações cromossômicas de forma dose-dependente, entretanto, esse efeito não foi observado quando as células foram tratadas por essas substâncias separadamente (Patel e col., 1994).

Em seres humanos, já está bem estabelecido que o álcool possui ação mutagênica, carcinogênica e teratogênica. As bebidas alcoólicas são misturas complexas de diferentes tipos de álcoois, aldeídos e ésteres, além de vários compostos orgânicos e inorgânicos. O efeito mutagênico do álcool é promovido pelo produto da metabolização dos álcoois, mais especificamente dos primeiros metabólitos; o acetaldeído no metabolismo do etanol, e o formaldeído no

²⁴ Tipo de fumo composto por uma mistura seca de noz de areca, óxido de cálcio, *cardamon* (sementes aromáticas e saborosas de *Elettaria cardamomum* - Zingiberaceae, típica da Ásia tropical), noz de betel (noz da palma *Areca catechu*) e aromatizantes não específicos, contendo ou não tabaco, muito consumido na Índia.

caso do metanol. Esse último é usualmente contaminante de muitas bebidas alcoólicas (Obe & Ristow, 1979). A ativação desses metabólitos, a interferência nos mecanismos de reparo do DNA, ou ainda, a exacerbação das deficiências nutricionais são mecanismos pelos quais o álcool pode aumentar a susceptibilidade dos tecidos aos carcinógenos químicos (Lieber e col., 1986; Hsu, 1992).

1.4.1- Efeito mutagênico do álcool sobre os cromossomos humanos

No homem o aumento na frequência de células com aberrações estruturais e numéricas parece estar associado ao consumo crônico do álcool. Vários estudos vêm demonstrando os efeitos mutagênicos do álcool sobre os cromossomos humanos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Bregman (1971) observou aumento na frequência de quebras cromossômicas em linfócitos humanos mantidos em meio de cultura com concentrações de 0,015 ml de etanol por mililitro. Concentrações de 0,01 ml de etanol por mililitro provocaram uma frequência cinco vezes maior de células com aberrações cromossômicas estruturais, quando comparadas com aquelas das culturas controle, além de provocar diminuição no índice mitótico (Gattás e col., 1989).

Uma comparação entre a frequência de células com rearranjos cromatídicos e cromossômicos e variáveis tais como sexo, idade, tempo de consumo de álcool e tabaco foi realizado por Obe e col. (1980). Os autores verificaram uma correlação positiva entre as anomalias cromossômicas e o tempo de dependência alcoólica e tabagismo, embora não tenha ocorrido correlação com a idade e o sexo dos sujeitos.

Matsushima (1987) comparou a frequência de aberrações cromossômicas de linfócitos em culturas de 72 horas de alcoólicos crônicos, ex-alcoólicos dependentes por mais de 20 anos e controles não alcoólicos. Observou maior frequência de aberrações nos consumidores crônicos, comparados com o grupo controle. A frequência de células anômalas encontradas nos ex-alcoólicos crônicos foi semelhante à verificada no grupo controle, não ocorrendo portanto, correlação entre tempo de abstinência e frequência de células com aberrações cromossômicas. O autor sugeriu a existência de um mecanismo de reparo eficiente que se estabelece em aproximadamente dois anos após a interrupção do consumo.

Por outro lado a frequência de células com aberrações cromossômicas de 55 ex-alcoólicos crônicos (7,1%) foi comparada com a de 52 controles normais (2,4%), examinados na rotina do mesmo laboratório. Enquanto a diferença na frequência de aberrações estruturais foi altamente

significante ($P < 0,0001$), a das aberrações numéricas não atingiu nível de significância ($P = 0,07$), provavelmente porque as distribuições etárias eram estatisticamente diferentes nos dois grupos, sendo o grupo de alcoólicos em média seis anos mais velhos que os controles (Gattás, 1994). Entretanto esse resultado é confirmado pela análise de regressão da frequência de aberrações numéricas em relação à idade estimada através do conjunto total de indivíduos alcoólicos e controles. Ainda, a frequência de aberrações estruturais aumentou em função do tempo de abstinência, sugerindo ação primária do álcool e/ou seus metabólitos ao nível das células leucopoiéticas primordiais, como consequência, provavelmente, da diminuição da capacidade de reparo celular. A sugestiva ação do álcool sobre as células matriciais parece ser semelhante àquela produzida pelas radiações ionizantes (Gattás & Saldanha, 1997).

O efeito clastogênico do álcool foi avaliado sob outros parâmetros citogenéticos. Véghelyi & Ostovics (1978) observaram diminuição no índice mitótico e aumento de *SCE* em linfócitos de alcoólicos tratados com dissulfiram, comparados com controles. Também, culturas de linfócitos de 72 horas de 23 homens consumidores excessivos de álcool comparadas com as de 50 não alcoólicos, permitiram a Badr & Hussain (1982) observarem diminuição no índice mitótico nas culturas dos alcoólicos, além de rearranjos cromossômicos, ocorrendo os cromossomos dicêntricos em maior número.

Alcoólicos episódicos também apresentam aumento na frequência de *SCE* em comparação com controles (Hedner e col., 1984; Kucheria e col., 1986). Esse efeito não aparece em ex-alcoólicos, nos quais a frequência de *SCE* é semelhante à observada no grupo controle, mas menor do que a encontrada em consumidores crônicos de bebidas alcoólicas (Butler e col., 1981).

1.4.2 - Efeito mutagênico do álcool sobre a frequência de micronúcleos

Considerando a capacidade do teste do micronúcleo em detectar danos genotóxicos antes mesmo de qualquer manifestação clínica ou histológica, foram realizados vários estudos para avaliar a associação entre a frequência de micronúcleos e o efeito citotóxico do álcool e do tabaco.

A avaliação da frequência de micronúcleos em células da mucosa oral de alcoólicos fumantes e não fumantes, e de não alcoólicos tanto fumantes como não fumantes, foi realizada por Stich & Rosin (1983a). Todos os grupos apresentavam frequências semelhantes de micronúcleos, com exceção dos alcoólicos fumantes que exibiram aumento significativo na frequência dessas aberrações. Quando esse grupo foi subdividido de acordo com o consumo de cigarros, a frequência de células com micronúcleos assim como o total de micronúcleos exibiram dependência da intensidade do tabagismo. No entanto, tanto o consumo diário de etanol quanto o de cigarros isoladamente não revelaram associação significativa com o aumento da frequência de micronúcleos, demonstrando a existência de um efeito sinérgico entre esses dois agentes. Entretanto, a metodologia e a análise estatística utilizadas pelos autores pareceram inadequadas na avaliação dos efeitos mutagênicos do etanol, e de outras substâncias presentes nas bebidas, concomitante ao consumo de tabaco.

Xue e col. (1992) compararam a frequência de micronúcleos de linfócitos de 220 fumantes com a de indivíduos controles não fumantes, usando apenas uma ou duas gotas do sangue periférico obtidos por punção digital. Verificaram que, enquanto o hábito de fumar e o álcool aumentavam significativamente a frequência de micronúcleos em fumantes, o chá a diminuía quando induzida pelo tabagismo. Entretanto, os efeitos anti-carcinogênicos do chá carecem de mais investigações.

A frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas em linfócitos de 11 indivíduos alcoólicos fumantes crônicos em péssimas condições nutricionais e de 9 ex-alcoólicos abstinentes por pelo menos um ano, comparadas à de 10 fumantes crônicos utilizados como controle revelou aumento estatisticamente significativo para ambos marcadores citogenéticos nos alcoólicos, enquanto os valores dos ex-alcoólicos abstinentes foram semelhantes aos dos controles (Castelli e col., 1999).

1.5 - Associação entre ingestão abusiva do álcool, neoplasias e frequência de micronúcleos

1.5.1 - Associação entre álcool e neoplasias

O consumo excessivo e crônico de bebidas alcoólicas está relacionado com o aumento na frequência de diversos tipos de neoplasias. O risco relativo estimado para o consumo de álcool e desenvolvimento de câncer da cavidade oral é estatisticamente significativo (Rao e col., 1994a). Além disso, vários estudos demonstraram que os alcoólicos têm risco dez vezes maior de desenvolver câncer de boca e laringe quando comparados com a população normal (Feinman & Lieber, 1988).

O fato dos alcoólicos também serem fumantes abusivos dificulta a identificação do álcool e do tabaco, isoladamente, como responsáveis pela origem dos tumores. Entretanto, o álcool e o fumo aumentam o risco para o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço de forma dose-dependente (Talamini e col., 1990; Maier e col., 1992). A bebida preferida, e portanto a mais ingerida, pode ser o principal agente etiológico do câncer (Barra e col., 1990). Estudos epidemiológicos associaram o consumo de bebidas alcoólicas ao câncer, mesmo com baixa ou moderada ingestão (Turner & Anderson, 1990; Blot, 1992).

O álcool está mais associado aos tumores de cavidade oral, faringe, laringe e esôfago, enquanto o tabaco também foi relacionado ao câncer de boca, faringe e laringe (Tuyns, 1983; Barra e col., 1990; Maier e col., 1992; Feinman & Lieber, 1988; Franceschi e col., 1990). Um estudo que relacionou o câncer do soalho de boca e língua ao consumo de bebidas alcoólicas, e as lesões do palato mole ao tabagismo, sustentou a hipótese de que o álcool e o tabaco possuem ação carcinogênica pelo contato direto (Boffetta e col., 1992). possivelmente, por ter um contato mais fácil e prolongado com essas substâncias é que a mucosa de revestimento bucal, disposta no andar inferior da boca (língua, soalho e gengiva inferior), seja com maior frequência, sede dessa doença (Carvalho & Fava, 1989).

O consumo de bebida alcoólica atua tanto de forma local, facilitando a penetração de substâncias carcinogênicas, quanto sistêmica, por conduzir à desnutrição e à depressão do sistema imunológico (Carvalho, 1997). Uma diminuição da resposta imune, inclusive na presença do HIV, parece estar associada ao consumo de álcool, favorecendo o surgimento de neoplasias e desenvolvimento de infecções (Bagasra e col.,1993). Esse efeito citotóxico é maior quando associado ao fumo, que parece ter uma ação sinérgica na supressão da resposta imune, com aumento da sensibilidade ao vírus da AIDS (Nair e col.,1990). O consumo de álcool pode, ainda, potencializar o risco para o desenvolvimento de câncer oral entre os usuários de *Pan masala*²⁵ (Patel e col.,1994).

Um estudo epidemiológico comparando sujeitos e controles com relação às mesmas variáveis para a avaliação dos fatores de risco no desenvolvimento do câncer oral nos estados de São Paulo, Curitiba e Goiânia foi realizado por Franco e col., (1989). Investigaram as exposições ambientais, história ocupacional e hábitos de vida como alimentação, etilismo e tabagismo, além das condições de saúde, principalmente bucal de 232 pacientes e 464 controles. Os indivíduos foram pareados de acordo com a idade, sexo, capital de origem e trimestre de admissão hospitalar. O tabaco e o consumo de álcool foram as variáveis mais fortemente relacionadas com o desenvolvimento de carcinomas orais independentemente da localização específica da lesão. O risco relativo na comparação entre fumantes e não fumantes foi maior para os usuários de cachimbo do que para os usuários de cigarros com filtro, além disso, houve uma correlação entre a quantidade de maços e o risco para desenvolver câncer oral. O risco estimado para os abstinentes por mais de dez anos comparou-se ao dos indivíduos que nunca fumaram. Quanto ao risco associado ao consumo abusivo de álcool observou-se forte relação entre o vinho e o câncer de língua, e entre a cachaça e as outras regiões orais.

Pesquisadores do norte da Itália comprovaram uma tendência no aumento do risco para o desenvolvimento de carcinomas da cavidade oral, faringe e esôfago em função do consumo de álcool. Dentre os usuários crônicos de álcool²⁶, sugeriu-se que o vinho por si só pode aumentar

²⁵ Em geral os usuários indianos do tabaco de mascar fazem uso do *Pan masala*, noz de betel, tabaco e cal com algumas especiarias e condimentos, mascando-os simultaneamente (Rao e col., 1994a).

²⁶ Nesse caso, indivíduos que consomem 84 doses ou mais por semana. Considerou-se uma dose: 150 ml de vinho, 330 ml de cerveja ou 30 ml de bebidas destiladas.

bastante o risco para o desenvolvimento de câncer do trato digestivo superior (Barra e col., 1990). Para os mesmos tipos de câncer, incluindo o de laringe, o risco aumentou conforme o número de cigarros e o tempo do tabagismo. Os fumantes de cachimbos e charutos mostraram um risco elevado para o câncer de cavidade oral e esôfago na comparação com fumantes de cigarros (Franceschi e col., 1990).

Uma investigação envolvendo 200 homens com câncer de cabeça e pescoço e 800 indivíduos controles revelou que, dos pacientes com tumor, 95,5% eram fumantes em contraste com 71,5% do grupo controle, e que o consumo de álcool e tabaco dos pacientes foi aproximadamente duas vezes maior em relação aos controles (Maier e col., 1992). Verificou-se um aumento no risco para o desenvolvimento de câncer oral quando o consumo diário de cigarros foi superior a 35 acompanhado pela ingestão de mais de 21 doses de bebidas alcoólicas diariamente. O tipo de bebida ingerida não influenciou no risco para o desenvolvimento do câncer oral. Ainda nessa mesma investigação, observou-se um efeito protetor causado pela abstinência do tabaco, apesar do pequeno número de fumantes (Mashberg e col., 1993).

A comparação de 1097 homens e 463 mulheres com câncer oral e 2075 homens e 873 mulheres saudáveis, indicou que os fumantes de cigarros com filtro que pararam de fumar têm um risco substancialmente reduzido para o câncer oral. Além disso, a investigação demonstrou que existe uma interação entre o tabagismo e o etilismo, sugerindo que o emagrecimento dos pacientes possa estar associado ao câncer oral (Kabat e col., 1994). Em Curitiba, verificou-se que, apesar do etilismo e do tabagismo serem os fatores mais importantes para o desenvolvimento do câncer do trato aerodigestivo superior nessa região, há também forte associação dessa neoplasia com outros hábitos como o consumo de café e mate²⁷ (Pintos e col., 1994).

Agrupando dados de estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos, Itália e China, Macfarlane e col. (1995) observaram que os riscos associados ao tabaco foram consistentes em todos os países, não verificando-se risco devido ao álcool apenas em Turim, na Itália. Os autores concluíram ainda, que o risco para o desenvolvimento de câncer oral entre os indivíduos

²⁷ Infusão da erva *Ilex paraguariensis*.

abstinentes do hábito de fumar por um período até nove anos, caiu para 30 %, redução essa que atingiu 50% nos indivíduos que abstiveram-se por períodos maiores.

Análises estatísticas confirmaram uma associação entre o hábito de mascar noz de areca e o câncer de bochecha na África do Sul. Os resultados revelaram que o hábito de mascar a noz de areca associada ou não ao tabaco deve ser importante no desenvolvimento de carcinomas orais. Nas mulheres, observou-se que a eliminação desse hábito pode reduzir esse risco substancialmente, mesmo se os outros fatores permanecerem inalterados (Van Wyk e col., 1993). Em 713 homens com câncer oral em Bombaim, Índia, verificou-se que o hábito de mascar tabaco e fumar *bidis*²⁸ também tem relação importante com o câncer oral (Rao e col., 1994a).

Indivíduos da raça negra tiveram riscos menores que os brancos para o desenvolvimento de câncer da cavidade oral e, entre os brancos, os de origem italiana foram menos susceptíveis que os originários de países do norte ou centro da Europa (Mashberg e col., 1993). Os analfabetos tiveram um risco duas vezes maior que os alfabetizados, enquanto os vegetarianos possuem um risco menor que os não vegetarianos (Rao e col., 1994a). O consumo elevado de frutas e verduras diminuiu o risco carcinogênico de qualquer pessoa (Macfarlane e col., 1995). Além disso, um efeito protetor foi observado pelo consumo de vegetais ricos em carotenos e frutas cítricas, mas não pelas verduras em geral. Outros fatores importantes de risco foram o hábito de beber chimarrão, o uso de fogão a lenha, e o consumo freqüente de churrasco e mandioca. A higiene oral também apresentou correlação com o risco para o desenvolvimento do câncer oral (Franco e col., 1989).

²⁸ Cigarro indiano com 0,2 a 0,3 gramas de tabaco enrolado em folha de *tendu*.

1.5.2 - Associação entre neoplasias, frequência de micronúcleos e agentes genotóxicos

As exposições ambientais podem ser ocasionais ou devido à um acúmulo seqüencial de diversos agentes que podem, por sua vez, promover efeitos interativos acentuando ou inibindo a mutagenicidade e a carcinogenicidade. Desse modo, a análise de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal, bexiga, ureter, cérvix uterino e esôfago permite identificar danos genotóxicos nos tecidos que são alvos específicos de certos carcinógenos, identificando estágios pré-clínicos no desenvolvimento de neoplasias.

Stich e col. (1982a) estudaram a frequência de micronúcleos em 27 indianos usuários de tabaco do tipo *Khaini*²⁹. Comparados a um grupo controle, verificaram que esse hábito pode estar relacionado a um aumento no número de aberrações cromossômicas responsável pelo desenvolvimento de um tipo de câncer oral conhecido como “câncer *Khaini*”. Os autores realizaram ainda, testes *in vitro* com extrato desse tabaco em fibroblastos humanos e em células de ovários de *hamster* chinês, não observando danos citogenéticos devido à adição de cal tanto na forma de óxido como de hidróxido de cálcio.

Lippman e col. (1990) estimaram a correlação entre contagem de micronúcleos da mucosa da carina traqueal e exposição ao fumo em 35 indivíduos; destes, nove eram fumantes ativos, 10 ex-fumantes e 16 não fumantes. A média e a mediana da contagem foram mais altas nos fumantes do que nos não fumantes; entretanto, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre os não fumantes e ex-fumantes. Os autores sugeriram que os micronúcleos pudessem ser utilizados como indicadores para detectar a carcinogênese traqueobronquial causada por tabaco.

²⁹ Mistura desse tipo de tabaco com cal, mascado entre a gengiva e o lábio inferior.

Do ponto de vista citológico, através da coloração de Papanicolau, Roberts (1997) estudando células de escamação da mucosa oral de 22 usuários de tabaco de rapé³⁰, verificou que para cada micronúcleo nos controles havia 4,75 micronúcleos nos usuários desse tipo de tabaco. Além disso, observou que o uso de rapé causa perda de coesão celular e hiperqueratose. Sugeriu ainda, que o micronúcleo seja a alteração celular mais freqüentemente associada com a carcinogênese.

Um estudo citogenético de células de escamação da mucosa oral foi realizado por Livingston e col. (1990) em 48 jovens usuários e não usuários de tabaco de rapé. O nível de exposição ao rapé foi averiguado através da taxa de cotinina³¹ salivar. A frequência de células com micronúcleos variou bastante entre os indivíduos expostos, sendo maior entre os indivíduos muito expostos (2,48%) quando comparada com os menos expostos (1,29%). Entretanto, a frequência de células micronucleadas foi estatisticamente elevada na mucosa labial dos indivíduos expostos quando comparada com a dos não expostos. O uso de aparelhos ortodônticos não foi responsável pelo aumento na frequência de micronúcleos. Além da análise morfológica ter revelado uma redução no número de células com núcleos normais entre os indivíduos expostos, a manifestação de figuras metanucleares e micronúcleos no epitélio oral revelou-se dependente do uso de tabaco de rapé.

³⁰ O cigarro sem fumaça (*smokeless tobacco*) compreende tanto o tabaco de mascar (*chewing tobacco*) como o de rapé (*snuff*). Esses produtos contêm folha de tabaco e uma variedade de adoçantes, aromatizantes e essências. No tabaco de mascar, as folhas podem estar em tiras, emblocadas em tijolos, ou secas e torcidas como fitas de corda. Uma porção pode ser mascarada ou colocada na boca; na bochecha ou entre o lábio inferior e a gengiva. As duas formas de rapé, seca ou úmida, são produzidas a partir do pó ou de cortes minúsculos de folhas de tabaco. Em alguns países, o rapé seco é inalado pelo nariz, mas nos EUA, tanto o rapé seco como o úmido são mantidos na região vestibular da cavidade oral (NIH Consensus Statement, 1986).

³¹ Metabólito da nicotina

Outra avaliação dos danos citogenéticos nas células da mucosa oral e dos linfócitos de sangue periférico de 100 pacientes portadores de leucoplasia³², fibrose submucosa³³, e líquen plano³⁴ confirmou que a leucoplasia está associada ao hábito de mascar ou fumar tabaco, enquanto a fibrose submucosa foi freqüentemente associada com o hábito de mascar noz de betel³⁵. Observou-se um aumento significativo no número de micronúcleos de células esfoliadas da mucosa oral desses pacientes em comparação com a freqüência de micronúcleos em indivíduos saudáveis sem hábito de mascar ou fumar tabaco. Além disso, observaram um aumento no número de SCE nos linfócitos desses pacientes. Esses resultados indicam que os agentes carcinogênicos produzem danos não só no tecido alvo, como também sistêmicos em outras células como os linfócitos (Desai e col., 1996).

Três grupos de indivíduos mascadores de noz de areca³⁶, saudáveis, afetados por fibrose submucosa e portadores de câncer oral foram comparados com indivíduos que não possuem o hábito de mascar a referida noz. A análise citogenética incluindo aberrações cromossômicas de linfócitos, SCE e micronúcleos da mucosa oral revelou aumento estatisticamente significativo destas alterações cromossômicas nos três grupos de mascadores em comparação com os indivíduos controles. Os dados indicaram uma possível aplicação desses parâmetros como marcadores para monitorar mascadores de noz de areca, uma vez que esses indivíduos possu-

³² É uma lesão branca que não é removida por simples raspagem e, clínica e histologicamente, não se assemelha a nenhuma outra lesão segundo Pindborg e col. (1977). A leucoplasia pode ter dimensões variadas, ocorrendo principalmente no sexo masculino e acima dos 40 anos, com localização na semimucosa labial, comissura labial interna, borda da língua, palato duro, assoalho bucal e rebordo alveolar, por ordem de ocorrência, segundo Grinspan (1982) e Bouquot & Gorlim (1986). Grande número de trabalhos sobre a ação do fumo na mucosa bucal tem sido publicado recentemente, principalmente sobre o tabaco de mascar, que aumenta bastante o risco de displasia, devido à ação de vários agentes cancerígenos do fumo, além da formação de um pH alcalino que varia de 8,2 a 9,3, que podem levar a lesões irreversíveis (Marcucci, 1997). A evolução da leucoplasia para carcinoma é muito rara (Carvalho, 1997).

³³ Lesão cancerizável muito incidente na Ásia e África, porém rara ou inexistente no Brasil.

³⁴ Doença dermatológica com repercussão bucal, podendo preceder as lesões cutâneas, aparecer concomitantemente ou sucedê-las segundo Andreasen (1968). De etiologia ainda indefinida, acredita-se que seja auto-imune. Associa-se em um grande número de pacientes à tensão emocional, e em alguns casos à reação a droga. Não há evidências para garantir origem viral pelo herpes vírus papiloma. É uma doença de grande ocorrência na população mundial; não é considerada como cancerizável por muitos autores e tem pequena porcentagem de transformação maligna (Marcucci, 1997).

³⁵ Noz indiana muito confundida com a noz de areca. Essa noz é proveniente da planta *Piper betle*.

³⁶ Noz popularmente, embora incorretamente, conhecida como noz de betel proveniente da palma *Areca catechu*. Os indivíduos podem mascar pedaços ou fatias da noz (assada, fervida ou crua), mascar a noz e o tabaco de betel alternativamente ou somente o mascar do tabaco de betel. O tabaco de betel é um maço da folha fresca de betel (parreira *Piper betle*) cuja superfície inferior é untada com cal que contém pedaços da noz e algumas vezes *catechu* (um extrato da árvore *Acacia catechu*) e tabaco ou rapé. Muito outros condimentos, adoçantes e aromatizantes podem ser adicionados dependendo do gosto e costume (Van Wyk e col., 1993).

em risco elevado para o desenvolvimento de câncer oral, o mais comum entre os indianos (Adhvaryu e col., 1991). O mesmo grupo de pesquisadores ressaltou que o hábito de mascar a noz de areca é erroneamente considerado “seguro” já que é responsável por danos genéticos até mesmo quando usado independentemente do tabaco. Concluíram que deve-se considerar o papel da noz de areca nos estudos de biomonitoramento humano (Dave e col., 1992). Além disso, verificou-se que a frequência de células micronucleadas da mucosa oral de indivíduos saudáveis de regiões diferentes da Índia, usuários de noz de areca, mava³⁷, tamol³⁸, tabaco com cal, rapé seco ou *masheri*, assim como a ocorrência em indivíduos portadores de fibrose submucosa com o hábito de mascar mava ou noz de areca, foi estatisticamente superior em relação aos indivíduos controles (Kayal e col., 1993).

Ainda na Índia, um estudo em células da mucosa oral de 50 indivíduos tribais em Koraput relacionou a frequência de micronúcleos com variáveis associadas ao desenvolvimento de câncer oral, como idade, sexo, hábitos alimentares, alcoolismo e tabagismo. Os resultados revelaram que a frequência de células micronucleadas foi maior nos homens do que nas mulheres. Os indivíduos de ambos sexos com faixa etária entre 50 a 65 anos apresentaram a maior frequência de micronúcleos. Fumantes de tabaco *Pika*³⁹ apresentaram frequência elevada de micronúcleos, quando comparados aos mascadores de tabaco *Dungia*⁴⁰. Esse aumento na frequência de micronúcleos nas células de escamação da mucosa oral indica que esses grupos têm risco elevado para o desenvolvimento de câncer oral (Ghose & Parida, 1995).

Alguns trabalhos averiguaram a possibilidade do uso do teste do micronúcleo para monitorar o efeito dos tratamentos radioterápicos uma vez que os indivíduos respondem diferentemente aos agentes mutagênicos. Linfócitos de pacientes portadores de carcinoma basocelular, assim como de controles foram avaliados quanto à frequência de micronúcleos induzidos por cobalto radioativo *in vitro*. Os resultados demonstraram que os pacientes com câncer tiveram, antes das irradiações, frequências de micronúcleos inferiores às dos indivíduos mais idosos do

³⁷ Mistura composta por tabaco não aromatizado seco ao sol, pedaços secos de noz de areca e cal comumente consumido em *Gujarat*, região oeste da Índia.

³⁸ Noz de areca crua fermentada, folha de betel e cal.

³⁹ Cigarro preparado com pó de folha de tabaco seca enrolada em folha, também seca, de *Shorea robusta*.

⁴⁰ Mistura de folha de tabaco verde em rama com cal mascada na região fundo de saco gengivo-labial inferior.

grupo controle. Entretanto, enquanto a proporção de células com um único micronúcleo caiu drasticamente, a proporção de células com mais de um micronúcleo foi maior nos pacientes do que nos controles com a mesma intensidade de irradiação (Ochi-Lohmann e col., 1996).

Sarto e col. (1987) acompanharam a frequência de micronúcleos em dois pacientes com câncer oral submetidos à radioterapia. Observaram que os raios gama induzem somente micronúcleos formados por quebras cromossômicas, cuja frequência aumentou linearmente com a aplicação das doses de radiação e regrediu a frequências iguais às iniciais entre sete e 12 dias, após a interrupção do tratamento. Anos depois, análise da frequência de micronúcleos em cinco pacientes com carcinomas orais submetidos à radioterapia revelou um aumento seis vezes maior na frequência de micronúcleos após o tratamento, em comparação com aquela observada antes do início do mesmo (Tolbert, 1992).

Realizou-se um estudo com sete pacientes submetidos à quimioterapia, através da análise de aberrações cromossômicas e do teste do micronúcleo em linfócitos, além do teste do micronúcleo em células da mucosa oral e do bulbo capilar. As frequências obtidas foram comparadas às dos próprios pacientes antes do início do tratamento e às de grupos controles para cada teste. Com exceção à dois pacientes, um tratado com interferon- α 2b e outro com interferon e cis-platinum, os outros quimioterápicos estudados induziram efeito genético em pelo menos dois dos testes realizados. A resposta tecidual ao tratamento quimioterápico foi caracterizada por um aumento na frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, atingindo um determinado limiar que, sofre declínio semanas após o tratamento. Dentre os testes citogenéticos realizados, as aberrações cromossômicas revelaram os melhores resultados. Quanto ao teste do micronúcleo, observou-se maior sensibilidade nos linfócitos do que nas células da mucosa oral. O teste do micronúcleo em células do bulbo capilar não foi adequado para monitorar exposição aguda (Sarto e col., 1990a).

Bhattathiri e col. (1996) utilizaram o teste do micronúcleo para investigar a radiosensibilidade de tumores cancerígenos avaliada pelo aumento na frequência de células micronucleadas após irradiação de 49 pacientes com carcinoma na cavidade oral. Pacientes

com recorrência de novos tumores foram classificados como resistentes à radioterapia em comparação com os sensíveis que não desenvolveram novos tumores. Em ambos grupos houve uma relação positiva na frequência de micronúcleos com a dose de radiação. Entretanto, o aumento na contagem de células com micronúcleos ocorreu mais precocemente no grupo resistente em comparação com o sensível (3,3 dias vs. 7,6), apresentando os primeiros uma estabilização nesta frequência, ausente no grupo sensível. A indução relativamente maior de células micronucleadas nos tumores dos indivíduos do grupo sensível sugeriu que o teste do micronúcleo possa ser utilizado como um teste de radiosensibilidade, ou como sugere os autores, de radiocurabilidade.

Outros marcadores biológicos como área citoplasmática, aberrações cromossômicas e *SCE*, também foram testados quanto à capacidade de identificar precocemente o dano citogenético e sua possível associação com o processo carcinogênico.

Uma análise citopatológica, através das colorações de Papanicolau e Feulgen, foi realizada em 55 pacientes com câncer oral e 76 pacientes controles com um analisador semi-automático de imagens. Observou-se uma redução significativa na área citoplasmática mas não na área nuclear das células dos pacientes com câncer oral. Como a análise detalhada dos hábitos de fumar e de consumir álcool não revelou esses fatores como os responsáveis pela redução da área citoplasmática, sugeriu-se que esta modificação morfológica pudesse estar relacionada aos estágios iniciais de desenvolvimento de um segundo tumor maligno (Ogden e col. 1991).

Uma tentativa de verificar a extensão do dano genético em linfócitos do sangue periférico como reflexo de eventos pré-clínicos do processo de carcinogênese foi realizada por Hagmar e col. (1998) através da frequência de aberrações cromossômicas, *SCE* e micronúcleos em linfócitos de indivíduos de países nórdicos com controles pareados quanto as mesmas variáveis. A análise estatística revelou que somente as aberrações cromossômicas teriam uma tendência linear significativa quanto ao risco subsequente do processo carcinogênico, sugerindo a avaliação das quebras cromossômicas como um biomarcador precoce para o risco do desenvolvimento de câncer.

Em linfócitos de 24 pacientes portadores de carcinoma oral sem tratamento prévio, verificou-se um aumento significativo de *SCE* na comparação com indivíduos pareados com relação ao sexo, idade, alcoolismo e tabagismo, sendo que os maiores valores de *SCE* foram encontrados nos indivíduos com maior intensidade de consumo de álcool (Popp e col., 1994).

1.6 - Carcinomas orais: patogenia, incidência e prevenção

Câncer da cavidade oral é uma denominação genérica utilizada para referência a qualquer lesão maligna primária dessa região anatômica. Os tumores malignos das regiões anatômicas que constituem a cavidade oral - lábios, língua, soalho de boca, mucosa bucal, gengivas inferior e superior, palato duro e mandíbula - perfazem cerca de 5% de todas as formas de câncer que ocorrem no corpo humano (Del Regato, 1985).

Embora as neoplasias malignas possam ter origem em todos os tecidos que compõem a boca, aquelas oriundas do tecido epitelial de revestimento são as mais comuns porque esse tecido é mais exposto à ação de agentes potencialmente carcinogênicos. De todos os tumores malignos da boca 90% a 95% são diagnosticados como carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou de células escamosas (INCA, 1999). Consequentemente, esse tipo de carcinoma constituiu a totalidade da amostra objeto dessa dissertação. Um sumário da patogenia desses tumores apresenta-se a seguir com base principalmente na revisão de Carvalho (1997).

1.6.1 - Patogenia

O carcinoma epidermóide origina-se no epitélio plano estratificado que reveste a cavidade oral e, quando se analisa as possíveis causas do desenvolvimento desses tumores, verifica-se que este tecido de revestimento é continuamente exposto à ação de agentes físicos e químicos tanto inalados como ingeridos pelos indivíduos. Além do álcool, tabaco e desnutrição, o trauma constante também tem sido incriminado como responsável pelo desenvolvimento de uma neoplasia na cavidade oral. Nesse sentido, os dentes com conservação precária, os cacos dentários ou próteses com ajustamento inadequado, conduzem ao traumatismo crônico em uma determinada região e poderiam ser responsabilizados pelo desencadeamento dessas neoplasias. Entretanto, fica difícil estabelecer uma relação causal entre a má higiene dentária e a presença de uma neoplasia em virtude do estado precário de conservação dos dentes da maioria da população brasileira e da disseminação do tabagismo e do etilismo.

Diante da atuação desses principais agentes etiológicos, o epitélio reage à agressão inicialmente com uma hiperplasia. A persistência da ação do agente resultará em uma displasia e, finalmente, em um carcinoma *in situ*. Geralmente essas alterações são observadas em diferentes pontos e fases de escamação do revestimento mucoso, dependendo da intensidade, duração, frequência e natureza do agente agressor. Clinicamente essas alterações microscópicas, em geral, se expressam sob a forma de uma lesão branca (leucoplasia) ou com características de uma eritroplasia⁴¹.

É conhecido o fato de que o tabaco dissolvido na boca desenvolve um campo mucoso cancerizável, caracterizado por alterações displásicas que favorecem o aparecimento de recidivas locais e segunda lesão primária (Wray & Mcguirt, 1993). Essa informação é relevante porque os carcinomas que se desenvolvem em áreas de exposição a agentes carcinogênicos, em geral, exibem menos agressividade que aqueles que se manifestam sem que nenhum fator carcinogênico conhecido esteja associado.

⁴¹ Outro tipo de lesão cancerizável. Em 90% dos casos apresentam alterações displásicas acentuadas, das quais 40% são consideradas displasias graves ou carcinomas *in situ* e 50% carcinomas. Os 10% restantes são displasias leves e moderadas (Regezi & Sciubba, 1991).

Uma vez instalada a neoplasia, as células se multiplicam e expandem dentro do epitélio exibindo figuras mitóticas em planos superficiais afastados da camada basal. A expressão clínica desse fenômeno é uma ulceração, pois com a desorganização do epitélio, as camadas de células planas e delgadas que recobrem o estrato de células poliédricas, normalmente situadas mais profundamente, desaparecem. Separando as células epiteliais da derme, a membrana basal pode retardar a evolução de um carcinoma *in situ* para um carcinoma invasivo.

Na epiderme não há vasos linfáticos e sanguíneos e a sua nutrição celular ocorre por meio de trocas intermediadas pela membrana basal. Enquanto a neoplasia estiver por ela contida não haverá possibilidade da ocorrência de metástases. Entretanto, quando as células ultrapassam essa barreira, entram em contato com os capilares linfáticos e sanguíneos além dos filetes nervosos, os quais permitem a sua disseminação regional e à distância.

Os vasos neoformados no interior da neoplasia são imperfeitos e apresentam uma membrana basal frágil e descontínua, facilitando o acesso dessas células neoplásicas. Uma vez atingida a luz desses vasos, os êmbolos tumorais, trafegando na circulação linfática ou sanguínea, podem levar ao aparecimento de metástases linfonodais ou em órgãos distantes.

O padrão de invasão, em geral ligado ao grau de diferenciação tumoral, reflete o comprometimento da capacidade de aderência da célula que tende a desgarrar-se do bloco tumoral, invadir vasos linfáticos e, por meio de êmbolos tumorais, atingir os linfonodos. A ocorrência de metástases à distância não é frequente, principalmente nas lesões orais iniciais. Entretanto na medida em que o tumor vai se tornando avançado, as metástases tornam-se mais frequentes. Quando presente, o aparecimento de metástases à distância ocorre principalmente nos pulmões.

1.6.2 - Incidência

As maiores taxas de incidência e mortalidade por câncer de boca ocorrem nos países cuja produção e consumo de vinho tem sido tradicionalmente alta. Nos países da Europa Ocidental, verificou-se um aumento que variou de quatro a 12 afetados por 100.000 indivíduos da faixa etária de 35 a 64 anos no período de 1955 a 1989 (Marshall & Boyle, 1996). Ainda, de uma amostra de 318 pacientes italianos com câncer da cavidade oral e orofaringe, incluindo 153 de soalho da boca, 50 de língua, 49 da região tonsilar, 44 do palato mole, 11 da região retromolar, cinco do sulco alveolar, quatro da mucosa bucal e dois do palato duro, 41 pacientes tiveram câncer em múltiplas regiões. (Boffetta e col., 1992).

Na África do Sul, o câncer da mucosa oral, sulco alveolar e gengiva são os mais incidentes, especialmente nas mulheres. Nesse país, a noz de areca é habitualmente mascarada por 93% das mulheres e 17% dos homens. Dentre as mulheres que mascaram noz de areca, 68% tiveram câncer de bochecha e 84% de língua. Nos homens houve a predominância do câncer de língua (Van Wyk e col., 1993).

Análises estatísticas do Serviço de Cabeça e Pescoço do Instituto Central da Associação Paulista de Combate ao Câncer abrangendo 2.631 casos mostrou que 36,8% dos casos de câncer de boca ocorrem nos lábios; 34,3% ocorrem na língua e/ou soalho da boca; 8% na abóbada palatina; 5,3% na gengiva inferior; 5,2% na área retromolar; 3,6% na região jugal; 3,4% na mandíbula e 3% na gengiva superior (Brasileiro Filho e col., 1994).

Durante a análise de 828 casos do Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis no período de 1980 a 1990, verificou-se que 56,3% de carcinomas de língua e soalho de boca; 17,5% na área retromolar; 11,1% na gengiva inferior; 3,3% na gengiva superior; 7,8% no palato duro e 4% na região jugal (Carvalho, 1997).

A sistematização dos dados de cinco RCBP⁴² brasileiros verificou que o risco para o desenvolvimento do câncer de boca pode ser até dez vezes maior nos fumantes. Segundo a estimativa do INCA⁴³ para o câncer de boca, até o final de 1999 serão diagnosticados 7.950 casos novos perfazendo 3% de todos os tipos de câncer, dos quais 5.850 no sexo masculino e 2.100 no sexo feminino. Atualmente, dentre todos os tipos de câncer, o de boca é responsável por 7,5% nos homens e 2,6% nas mulheres (INCA, 1999).

As médias anuais para as taxas de mortalidade por câncer de boca-faringe na Baixada Santista no período de 1980 a 1993 foram de 17,22 por 100.000 indivíduos, ocupando o terceiro lugar na causa de óbitos da região (Medrado-Faria, 1999). Entretanto, a incidência do câncer de boca na população brasileira ainda parte de uma estimativa epidemiologicamente inadequada uma vez que ainda não se realiza a sistematização dos dados hospitalares em todas as regiões do Brasil.

⁴² Registro de Câncer de Base Populacional. Atualmente ocorrem somente nas cidades de Belém, Fortaleza, Goiânia, Campinas e Porto Alegre.

⁴³ Instituto Nacional do Câncer.

1.6.3 - Prevenção

A prevenção do câncer de boca consiste basicamente em três níveis de acordo com as fases da carcinogênese. A prevenção primária consiste em eliminar os agentes mutagênicos decorrentes do hábito de vida das pessoas, especificamente o etilismo e o tabagismo. O enriquecimento da dieta com vitaminas e alguns oligoelementos é a estratégia da prevenção secundária, onde ocorre uma tentativa de reverter ou inibir o processo carcinogênico através da eliminação dos radicais livres⁴⁴. Já a prevenção terciária consiste na identificação das lesões cancerizáveis e remoção das mesmas (Oliveira & Oliveira, 1997).

Um problema preocupante que se mantém há quase uma década na prevenção do câncer oral na população brasileira, ocorre devido à falta de acesso aos serviços de saúde por parte dos pacientes ou ao despreparo dos profissionais da saúde em detectar o câncer de boca em seus estádios iniciais. De acordo com a classificação TMN⁴⁵, lesões de até 4 cm de diâmetro enquadram-se como estágio II, o que já representa uma lesão bem evidente. Entretanto, uma avaliação preliminar dos dados do Registro Hospitalar de Câncer do Hospital do Câncer/INCA mostra que aproximadamente 60% dos pacientes chegam ao hospital com o câncer de boca já nos estádios III e IV, quando o tratamento não pode ser curativo (INCA, 1996).

O principal papel da prevenção primária está na conscientização da população. Entretanto, quanto à prevenção secundária, recentemente tem havido uma necessidade de definir marcadores precoces, para a avaliação do risco do desenvolvimento do câncer da cavidade oral que possam ser utilizados em triagens quimiopreventivas. Marcadores potenciais, principalmente celulares e imuno-histoquímicos foram desenvolvidos em um passado recente, porém poucos vem sendo efetivamente utilizados no atendimento clínico das populações.

⁴⁴ Os radicais livres (O_2 , H_2O_2 , $-OH$) são moléculas resultantes das reações de oxi-redução que ocorrem normalmente no organismo. Quando esses radicais atingem um limiar acima do normal, ocorre uma alta reatividade com os ácido nucleicos, podendo promover mutações. Essas mutações podem ser responsáveis pela iniciação do processo carcinogênico. Muitos agentes mutagênicos, tais como o álcool e o tabaco, colaboram para a formação desses radicais.

⁴⁵ Classificação clínica dos tumores malignos, onde T, com amplitude de 0 a 4, representa a extensão do tumor primário; N, de 0 a 3, as condições dos linfonodos regionais e M, seguido por 0 ou 1 corresponde à ausência ou presença de metástases à distância (Sobin & Wittekind, 1997).

Uma triagem clínica usando alguns desses marcadores verificou o efeito da quimioprevenção com beta-caroteno, vitamina E e C na mucosa oral de 24 pacientes com leucoplasia e 24 pacientes que haviam sido previamente submetidos a ressecção de câncer primário. Houve uma redução em alguns parâmetros da cinética celular como o número de RONS⁴⁶, a porção micronuclear e a normalização da expressão gênica da citoqueratina. A rediferenciação da mucosa oral foi mais intensa nos pacientes que abandonaram o etilismo e o tabagismo. No entanto, a quimioprevenção por tempo prolongado parece ser ineficiente (Barth e col., 1997).

Considerando que a frequência de micronúcleos em células de escamação da mucosa oral é uma forma de avaliar precocemente as quebras cromossômicas em células em divisão celular, e que a frequência dessas quebras pode aumentar conforme o estímulo carcinogênico, o teste do micronúcleo pode servir como um instrumento auxiliar na prevenção secundária a ser utilizado no monitoramento de pacientes submetidos à quimioprevenção.

Associou-se a administração por três meses de cápsulas de retinol (100.000 UI por semana) e beta caroteno (300.000 UI por semana) na dieta de 40 filipinos rurais que mascaram betel, à uma diminuição de 4,2% a 1,4% na média das células com micronúcleos da maioria dos indivíduos tratados. Apesar do tratamento não ter reduzido a frequência de micronúcleos em todos os pacientes, esta não elevou-se em qualquer paciente. Nos 11 pacientes que receberam placebo, a frequência de micronúcleos não foi alterada. Tais resultados sugerem que um aumento de retinol e/ou beta-caroteno na dieta podem reduzir a incidência de câncer oral (Stich e col., 1984).

Um grupo de pescadores usuários de tabaco e portadores de leucoplasias orais com frequência elevada de micronúcleos recebeu um tratamento quimiopreventivo monitorado. A amostra foi dividida em três grupos, administrando-se ao primeiro, beta caroteno; ao segundo, beta caroteno com vitamina A; e ao terceiro, placebo. Depois de três meses, a frequência de células com micronúcleo reduziu-se no primeiro grupo, porém não houve redução estatística-

⁴⁶ Regiões organizadoras de nucléolo

mente significativa de leucoplasias orais em comparação com o grupo placebo. Depois de seis meses, observou-se redução no número de micronúcleos nos dois primeiros grupos, remissão de leucoplasias orais e inibição de novas leucoplasias (Stich e col., 1988).

Benner e col. (1994a) avaliaram a frequência de micronúcleos em 57 pacientes portadores de câncer oral em estágios iniciais após administração de isotretinoína⁴⁷. Essa droga foi administrada durante três meses, seguida por uma dosagem inferior da mesma droga ou beta caroteno por mais nove meses. A análise citogenética foi realizada tanto na área lesada como em uma outra considerada controle, resultando em uma frequência elevada de micronúcleos na área lesada. No entanto, após três meses de tratamento houve um declínio nessa frequência. Os autores concluíram, então, que o tratamento quimiopreventivo com isotretinoína não somente reduz a frequência de micronúcleos, como a mantém reduzida durante o tratamento combinado por isotretinoína e beta caroteno.

No mesmo ano esses mesmos autores realizaram o biomonitoramento de pacientes portadores de leucoplasia através das células de escamação da mucosa oral da região lesada e de outra região da boca, aparentemente normal, antes e após o tratamento com 400 unidades internacionais de α -tocoferol diariamente durante 24 semanas. Observou-se uma diminuição significativa na frequência de micronúcleos após o tratamento com α -tocoferol em ambas regiões da mucosa oral dos pacientes. A frequência de micronúcleos tanto antes como após o tratamento foi maior nas células da área lesada com relação à área aparentemente normal. Embora esses resultados indiquem que o α -tocoferol tenha um efeito benéfico sobre a carcinogênese oral, não há avaliação histológica ou clínica estatisticamente significantes associadas às variações na frequência de micronúcleos (Benner e col., 1994b).

Prasad e col. (1995) verificaram aumento na frequência de micronúcleos e de aductos de DNA em 298 pacientes portadores de lesões pré-malignas da mucosa oral de usuários de tabaco tipo *chutta*⁴⁸. Desses pacientes, 150 foram tratados com um coquetel de nutrientes com-

⁴⁷ ácido 13-cis retinóico (13-cRA), um agente quimio-protetor do grupo dos retinóides assim como retinol, tretinoína e etretinato muito utilizado na quimioterapia das lesões da mucosa oral.

⁴⁸ tabaco enrolado

posto por vitamina A, riboflavina, zinco e selênio e 148 receberam placebo. Após um ano esses pesquisadores observaram uma redução estatisticamente significativa na frequência de micronúcleos e de aductos de DNA nas células da mucosa oral dos pacientes submetidos ao coquetel de nutrientes comparado ao grupo que recebeu placebo.

Pacientes portadores de leucoplasia oral foram divididos em dois grupos, um tratado com 3g de uma mistura de chá chinês (administração oral e tópica) e outro com placebo. Após seis meses o tamanho da lesão diminuiu em 37,9% dos que receberam chá e cresceu em apenas 3,4%. A incidência de micronúcleos, bem como a frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas, encontrada nos linfócitos do grupo tratado foram estatisticamente menor do que no grupo controle (Li e col., 1999). Estes autores verificaram ainda, através do número e volume total de regiões organizadoras de nucléolos corados pela prata (AgNOR) e do índice de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) das células lesadas, que a proliferação celular diminuiu nos pacientes que foram submetidos ao tratamento alternativo .

Estudos do efeito de extratos alcoólicos brutos, oleosos e oleorresínicos de açafrão (turmeric) sobre a frequência de micronúcleos revelaram que esses extratos não aumentam a frequência de micronúcleos nos linfócitos de pessoas saudáveis. Posteriormente verificou-se que esses três compostos ofereciam proteção contra a indução de micronúcleos provocada pelo benzo(a)pireno. Ainda, estudos subsequentes revelaram que a administração desses compostos durante três meses à pacientes com fibrose submucosa reduz o número de micronúcleos, tanto de células da mucosa oral, como dos linfócitos (Hastak e col., 1997).

Finalmente, uma experiência clínica com o teste do micronúcleo foi realizada por Garewal e col. (1993) que analisaram sua frequência em fumantes e usuários do tabaco de mascar com ou sem leucoplasia. Verificaram que as células micronucleadas ocorreram com incidência muito baixa e freqüentemente não estão presentes nos indivíduos não usuários do tabaco de mascar. O hábito de fumar isoladamente não causou aumento significativo na frequência de micronúcleos, independentemente da presença ou ausência de leucoplasia. A frequência de micronúcleos

elevou-se nos mascadores de tabaco, mais especificamente no local onde o fumo é colocado. Nesses esfregaços, quando a frequência de micronúcleos atinge 1%, foram observadas outras anomalias citológicas.