

Marlon Caetano M. DICKEMANN*

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM ETILISTAS

Jéssica PEGORARO**

MICRONUCLEI FREQUENCY IN ALCAHOLICS

Iuri Salvador MARTINS***


RESUMO

Laura KIRSCH****

Ana Carolina Locatelli ECKER*****

Paula WIETHÖLTER*****

Carolina Barreto MOZZINI*****

 <https://orcid.org/0000-0003-4360-2936>

O álcool etílico é um dos principais agentes químicos relacionados ao desenvolvimento de neoplasias malignas bucais. O uso do etanol tem aumentado em diversas populações e a faixa etária dos indivíduos que o consomem tem ficado cada vez mais baixa. O teste de micronúcleos é apontado como uma ferramenta importante na ação preventiva de carcinogênese e a quantificação da sua frequência representa um instrumento útil no monitoramento de indivíduos expostos a agentes genotóxicos de natureza ocupacional ou ambiental. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar a associação entre o consumo de álcool e a presença de micronúcleos na mucosa oral. Para tanto, foram coletadas células esfoliadas da mucosa oral de 120 sujeitos, com idade variando entre 18 e 54 anos para análise microscópica das células da mucosa oral, juntamente com a aplicação de um questionário de dados pessoais e de hábitos de consumo. Os resultados mostraram que não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o grupo que consome álcool, em comparação ao grupo que não o consome. Portanto, a exposição periódica ao álcool não apresenta risco para o desenvolvimento de micronúcleos na mucosa oral da população estudada.

Recebido em: 29 de Maio de 2018

Aprovado em: 12 de Setembro de 2018

Descritores: Testes para micronúcleos. Neoplasias bucais. Etanol.**ABSTRACT**

Ethyl alcohol is one of the main chemical agents related to the development of oral malignant neoplasias. Ethanol usage has increased in several populations and the age group who consume it is getting lower and lower. Micronuclei test is pointed out as an important tool for carcinogenesis preventive actions and the measurements of its frequency represents a useful instrument for monitoring the individuals who are exposed to occupational and environmental nature genotoxic agents. Therefore, this paper aims to identify the association between alcohol intake and the presence of micronuclei in oral mucosa. For this purpose, oral mucosa exfoliated cells from 120 subjects were collected, aged 18 to 54 years old, to microscopic examination of oral mucosa cells, together to a questionnaire application containing personal data and intake habits. The results presented that no significant statistical associations were found among the group that intakes alcohol when compared to the group that do not intake it. Thus, periodical exposure to alcohol does not present any risks to the development of micronuclei in oral mucosa from the population studied.

Descriptors: Micronucleus tests. Mouth neoplasms. Ethanol.

*Cirurgião-dentista, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil - marlondickemann@icloud.com

**Cirurgiã-dentista, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil - jeepegoraro@gmail.com

***Cirurgião-dentista, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil - smartins.iuri@gmail.com

****Cirurgiã-dentista, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil - laura.kirsch@hotmail.com

*****Cirurgiã-dentista, Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil, ana-ecker@hotmail.com

*****Bióloga, Dra. em Fitotecnia, Docente dos cursos de Biomedicina e Odontologia da Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil - paulawiet@gmail.com (autor para correspondência)

*****Fisioterapeuta responsável pelo ambulatório de fisioterapia oncológica do Hospital da Cidade de Passo Fundo, Dra. em Oncologia - carolmozzini@gmail.com



1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela falha no ciclo celular, especificamente na integridade funcional, a qual causa modificações no comportamento das células, deixando-as agressivas e sem controle. Ela surge através das mutações celulares que afetam os genes responsáveis pelo controle da proliferação celular e função de apoptose, a qual desencadeia alterações no ciclo normal da célula e acaba dividindo-a de forma autônoma, causando o acúmulo celular e, conseqüentemente, a formação tumoral¹⁻³.

Os fatores de risco podem ser tanto externos como internos ao organismo. Os internos normalmente envolvem fatores genéticos e ao próprio indivíduo, e os externos são relacionados a fatores ambientais e maus hábitos e costumes em convivência. Pode haver uma interação entre os fatores e variáveis como o tempo de exposição que predispõe a alteração celular⁴.

O câncer de boca é uma doença causada por diversos fatores, resultado da interação e relação entre seus fatores de risco que têm o poder de afetar os processos de proliferação e crescimento celular, interferindo no seu controle. Os principais fatores são fumo, álcool, radiação solar, micro-organismos, deficiência imunológica e dieta⁵⁻⁷.

O consumo de álcool tem se mostrado um significativo agente potencializador para desencadear lesões cancerosas, pois tem ação genotóxica e é capaz de promover erros genéticos mitóticos aumentando as chances de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. O principal composto do álcool, o acetaldeído, é conhecido como o responsável por aumentar a permeabilidade da mucosa, ou seja, permite maior passagem de carcinógenos na membrana e potencial tóxico à célula, gerando, por exemplo, micronúcleos (MNs)^{8,9}.

Os MNs são estruturas resultantes de restos ou fragmentos cromossômicos que se perderam no processo de divisão da célula e são visíveis no citoplasma das células através de microscopia. O teste de MNs é capaz de detectar interferências na mitose e fenômenos carcinogênicos com simplicidade, rapidez e economia^{10,11}.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar a associação entre o etilismo e a frequência de MNs na mucosa oral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo apresenta delineamento experimental transversal, com análise de relação da associação entre o etilismo e a frequência de micronúcleos na mucosa oral. Foram avaliados 120 participantes de uma comunidade acadêmica do sul do Rio Grande do Sul, os quais foram selecionados ao acaso pelos pesquisadores, no período de fevereiro a agosto de 2016. Este

estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa pelo CAAE 529995216.2.0000.5322

As coletas das células da mucosa oral ocorreram com o uso da escova “cytobrush”, por meio de raspagem interna da mucosa jugal. As células foram colocadas sobre as lâminas para a realização do esfregaço e deixadas em temperatura ambiente até que estivessem totalmente secas. A fixação foi realizada com metanol (QHEMIS) + ácido acético (Marca QHEMIS, 30 ml de metanol e 10 ml de ácido acético) e colocadas na estufa (40 °C) por 30 minutos.

Em seguida, as lâminas foram coradas com o corante Giemsa (Marca QEEL, 10 ml do corante e 30 ml de água destilada) durante 15 minutos e deixadas em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas em temperatura ambiente para a secagem.

Após estarem totalmente secas, as lâminas foram armazenadas em caixas, em temperatura ambiente.

Para a análise, foi utilizado um microscópico óptico (Marca Bioval), em aumento de 400x, onde foram observadas 1000 células por lâmina. A classificação e contagem de MNs seguiram um protocolo sugerido por Tolbert, Shy e Allen(1992)¹¹ e ocorreu da seguinte maneira:

- Contagem das células: foram consideradas as células que tinham os núcleos normais e íntegros, com perímetro nuclear liso e distinto e que apresentavam também o citoplasma íntegro, com exceção das que tinham pequenas dobras e pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;

- Contagem dos MNs: foram considerados MNs cuja estrutura apresentou um halo circundante sugestivo de uma membrana, menos de 1/3 do diâmetro do núcleo principal, intensidade da coloração com Giemsa semelhante ao núcleo e mesmo plano focal à microscopia, bem como ausência de sobreposições ou pontes com o núcleo. Foi considerado o número total de MNs, assim como o de células acometidas pelo aparecimento de MNs em seu citoplasma.

3 RESULTADOS

No período analisado, foram avaliados 120 participantes, com idade média de 25,2 ($\pm 8,3$) anos, variando de 18 a 54 anos, sendo 84 (70%) indivíduos do sexo feminino e 36 (30%) do sexo masculino. Os indivíduos se declararam 91,7% brancos, 3,3% negros e 5% declararam outra raça. Todos os participantes forneceram material suficiente para a confecção das amostras e para a contagem de 1000 células por indivíduo.

Por meio do questionário foi identificado que 24 (20%) participantes usavam enxaguatório bucal com álcool em sua composição, 86 (71,7%) não usavam e 10 (8,3%) não sabiam. Em relação à história de câncer na família, 67 (55,8%) sujeitos afirmaram ter histórico familiar, enquanto 53 (44,2%) sujeitos negaram possuir algum familiar vítima do câncer.

Nenhum indivíduo declarou ingerir álcool diariamente, 107 (89,1%) referiram ingerir periodicamente, destes, 67 (55,8%) declararam ingerir raramente e 40 (33,3%) somente nos finais de semana e, dois (1,7%) referiram que tinham o hábito, mas não ingerem mais e 11 (9,2%) não ingerem. Quando questionados sobre a periodicidade desta ingestão, 63 (52,5%) declararam ingerir raramente, 24 (20,0%) somente bebiam nos finais de semana e 17 (14,2%) bebiam aos finais de semana e uma ou duas vezes por semana e 16 (13,3%) não responderam (Tabela 1).

Tabela 1 - Características da ingestão de bebida alcoólica.

Características	Quantidade	n	%
Ingestão periódica	Raramente	67	55,8
	Somente finais de semana	40	33,3
	Tinham o hábito, mas pararam	2	1,7
	Não ingerem	11	9,2
Periodicidade	Raramente	63	52,5
	Somente finais de semana	24	20,0
	Finais de semana e também uma ou duas vezes na semana	17	14,2
	Não responderam	16	13,3

Dos próprios autores.

A quantidade média de bebida alcoólica ingerida pela população estudada foi 900 mL. O consumo mínimo foi de 100 mL e o máximo de 6000 mL. Os tipos de bebidas ingeridas com mais frequência pela maioria da amostra foram os fermentados correspondendo a 43 (35,8%) indivíduos, em seguida, os destilados correspondendo a 26 (21,7%) indivíduos, 29 (24,2 %) afirmaram ingerir fermentados e destilados, 4 (3,3%) indivíduos responderam Outro e, 18 (15%) indivíduos não responderam (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipos de bebidas alcoólicas ingeridas pela amostra.

Tipo de bebida	n	%
Fermentados	43	35,8
Destilados	26	21,7
Fermentados e destilados	29	24,2
Outro	4	3,3
Não responderam	18	15
Total	120	100

Dos próprios autores.

Em cada lâmina, foram contadas 1000 células. Em 118 indivíduos (98,3%), foram encontradas células contendo no mínimo um MN por célula e em 51 sujeitos foram encontrados dois ou mais MNs por célula, sendo que, em algumas lâminas, foram identificadas ambas as situações. Além disso, foram encontradas duas lâminas nas quais não foram identificados MNs. A média geral de MNs encontrados, considerando todas as lâminas, foi de 7,2 ($\pm 7,2$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de células com um e dois ou mais micronúcleos

Micronúcleos	n	Média	DP
Número de células com 1 micronúcleo	118	4,2	2,7
Número de células com 2 ou mais micronúcleos	51	2,9	2,8
Total de lâminas	120	7,2	7,2

Dos próprios autores.

Correlacionou-se (Correlação de Spearman) a ingestão periódica de álcool e a presença de células com um MN e dois MNs ou mais, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos neste sentido. Também foi correlacionada a quantidade de bebida alcoólica ingerida em mL com a presença de MNs, verificando-se que não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre a ingestão periódica de bebida alcoólica e a presença de micronúcleos.

	Ingestão periódica de bebida alcoólica	
Número de células com 1 micronúcleo	r=0,089 / p=0,372	
Número de células com 2 ou mais micronúcleos	r=0,250 / p=0,094	
Total de lâminas	r=0,052 / p=0,600	
	Média em mL	Relação e p
Número de células com 1 micronúcleo	275	r=0,065 / p=0,592
Número de células com 2 ou mais micronúcleos	625	r=0,106 / p=0,571
Total de lâminas	900	r=0,051 / p=0,674

Dos próprios autores.

Ao comparar a ingestão e a não ingestão de bebida alcoólica e a presença de MNs, não se identificaram resultados estatisticamente significativos, sugerindo assim que, a exposição periódica ao álcool não apresenta risco para o desenvolvimento de MNs na mucosa oral da população estudada (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre a ingestão ou não de álcool e a presença de micronúcleos.

	Ingestão álcool	n	Média	p
Número de células com 1 micronúcleo	Sim	106	4,2(±2,7)	0,571
	Não	12	3,8(±2,0)	
Número de células com 2 ou mais micronúcleos	Sim	46	2,7(±2,8)	0,421
	Não	5	3,8(±2,5)	
Total de lâminas	Sim	107	7,2(±7,2)	0,928
	Não	13	7,0(±7,5)	

Dos próprios autores.

Como o fumo também pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de MN e o questionário utilizado abordou tal questão, analisaram-se de forma descritiva os 11 sujeitos que não ingerem bebida alcoólica, pois todos apresentam MN em suas células. Observou-se que, muito embora não ingerissem bebida alcoólica e apresentassem MN, nenhum deles apresentava o hábito de fumar, ou seja, não apresentavam fatores de risco comprovados para alteração na mucosa oral.

4 DISCUSSÃO

O teste de frequência de MN é uma ferramenta auxiliar no processo de indicação de lesão pré-neoplásica, representando um “dosímetro endógeno”, por meio da mensuração da quantidade dessas alterações encontradas nas células esfoliadas com maior exposição ao potencial agente de mutação¹². Ramirez e Saldanha enfatizam que o processo de carcinogênese parece estar correlacionado com o aumento da frequência de MNs¹³.

Marmot (1984) relata que o etanol além de causar doenças gastrointestinais, problemas vasculares e distúrbios no sistema nervoso, também facilita a penetração de agentes carcinogênicos na mucosa oral. É um fenômeno que se explica através da solubilização de alguns agentes genotóxicos ou também por aumentar a permeabilidade da mucosa na presença do etanol¹⁴.

Um estudo epidemiológico demonstrou que indivíduos alcoólatras apresentavam risco de desenvolvimento de câncer 6,4 vezes maior que indivíduos que não ingeriam álcool. Geralmente, a ação carcinogênica do álcool acontece em níveis de exposição acima de 45 mL diariamente¹⁵. Neste estudo, o menor consumo de etanol foi de 100mL e o maior foi de 6000mL, é importante ressaltar que nenhum dos indivíduos deste estudo ingeria álcool diariamente, portanto, a quantidade era baseada somente nos períodos que o indivíduo relatou ingerir bebida alcóolica.

Um estudo em Porto Rico avaliou o risco de câncer oral entre 286 indivíduos masculinos que consumiam álcool e 417 indivíduos controle também masculinos. Os autores observaram que os consumidores de licor em quantidades de 43 (17mL) drinques ou mais por semana tinham risco aumentado de desenvolver neoplasia oral, por outro lado, os que ingeriam vinho ou cerveja se mostraram com riscos discretos não significativos. Este fato aponta que a concentração alcoólica tem interferência no risco de carcinogênese oral⁹. Assim como Schottenfeld (1979) constatou em seu estudo uma alta ocorrência de lesões ligadas ao etanol em locais como assoalho de boca, esôfago e orofaringe¹⁶.

Um estudo de Harris e Mihic que associava consumo de álcool e lesões orais não encontrou, de forma isolada, uma relação consistente. Entretanto, quando se analisou o efeito sinérgico do tabaco e álcool, obteve-se um aumento no risco de desenvolvimento das lesões orais¹⁷. Stick e Rosin também mostraram que o aparecimento de MN é potencializado quando há sinergismo. Este efeito é explicado pelo possível acréscimo da permeabilidade do tecido oral através dos compostos resultantes da combustão do fumo em associação ao etanol¹².

Estudiosos¹⁸ encontraram um aumento estatisticamente significativo de câncer bucal nos indivíduos somente consumidores de álcool que bebiam menos de um drinque (18mL) por dia, este dado é significativo quando o hábito dura mais de 20 anos de consumo, diferente do presente estudo na qual nenhum indivíduo bebe diariamente. Tratando-se do consumo concomitante do tabaco e bebida altamente alcoólica foi encontrado um aumento de quatro vezes de risco de neoplasia oral, os autores ainda completam que, mesmo quando o consumo associado é moderado, o risco ainda é maior.

Vale ressaltar que é possível que outros fatores associados interfiram no maior aparecimento de MN, como os enxaguatórios bucais com álcool, dietas ricas em gordura animal e fatores genéticos¹⁹.

Pesquisadores indicam que os MNs se desenvolvem quando expostos continuamente aos agentes genotóxicos e desaparecem quando o agente deixa de ser utilizado²⁰. Esse fato permite levar em consideração que a remoção do agente causador pode resultar em uma estabilização celular e, conseqüentemente, é possível que diminua os casos de câncer de boca na mesma medida em que é viável conscientizar precocemente a população através da identificação prévia das primeiras células lesionadas.

5 CONCLUSÃO

Não houve associação estatisticamente significativa entre o consumo de álcool e a presença de micronúcleos. A formação de MNs é um dos meios que o organismo encontra para se adaptar aos danos causados pelos agentes exógenos ou endógenos, mantendo a célula viável. Mesmo que o aumento dos MNs aconteça em decorrência da ação dos agentes genotóxicos, sua ocorrência não deve ser interpretada como um evento estritamente negativo.

REFERÊNCIAS

- 1 Lopes A, Iyeyasu H, Chammas R (eds). Oncologia para graduação. São Paulo, SP: Tecmedd; 2005. Capítulo 3, Bettoni F. Mutação e câncer; p. 35-46.
- 2 Lopes A, Iyeyasu H, Chammas R (eds). Oncologia para graduação. São Paulo, SP: Tecmedd; 2005. Cap. 2, Ferreira FO, Castro RMRPS. Biologia da célula tumoral; p.25-33.
- 3 Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. Rer Bras Cancerol. 2005; 51(3): 227-34.
- 4 O que é o câncer? - INCA [Internet]. www.inca.gov.br. 2016 [cited 20 September 2016]. Available from: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322

- 5 Curado M, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr opin oncol.* [Internet] mai 2009; 21(3):194-200. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001622-200905000-00003>
- 6 Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H. *et al.* Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk: Results from Nordic and Italian Cohorts. *Cancer Res.* [Internet] mar. 2004; 64(6):2258-2263. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15026371>
- 7 La Vecchia C, Tavania A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. *et al.* Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* [Internet] sep. 1997; 33(5):302-312. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415327>
- 8 Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis.* [Internet] sep. 1997; 18(9):1739-1743. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328169>
- 9 Huang W, Win DM, Brown LM, Gridley G, Bravo-Otero E, Diehl SR, Fraumeni Jr. JF, Hayes RB. Alcohol Concentration and Risk of Oral Cancer in Puerto Rico. *Am J Epidemiol.* [Internet] may. 2003; 157(10):881-887. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aje/kwg055>
- 10 Carrard VC, Costa CH, Ferreira LH, Lauxen IS, Rados PV. Teste dos micronúcleos: um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *R Fac Odontol Porto Alegre.* [Internet] jan-dez 2007; 48(1/3):77-81. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/7512>
- 11 Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* [Internet] feb. 1992; 271(1): 69-77. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371831>
- 12 Stick HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer.* [Internet] mar. 1983; 31(3):305-308. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826255>
- 13 Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res.* [Internet] sep. 2002; 1(3):246-60. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963832>
- 14 Marmot MG. Alcohol and coronary heart disease. *Int J Epidemiol.* [Internet] Aug. 2001; 30(4):724-729. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ije/30.4.724>
- 15 Ziegler RG. Alcohol-Nutrient Interactions in Cancer Etiology. *Cancer.* [Internet] 1986; 58(8): 1942-1948. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1097-0142\(19861015\)58:8%2B%3C1942::AID-CNCR2820581423%3E3.0.CO;2-N](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1097-0142(19861015)58:8%2B%3C1942::AID-CNCR2820581423%3E3.0.CO;2-N)
- 16 Schottenfeld D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer.* [Internet] may. 1979; 43(S5):1962-1966. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/227895022_Alcohol_as_a_co-factor_in_the_etiology_of_cancer

- 17 Harris RA, Mihic SJ. Alcohol and inhibitory receptors: Unexpected specificity from a nonspecific drug. *Proc Natl Acad Sci. USA.* Dec. 2003; 101(1):2-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC314125/>
- 18 Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A. *et al.* The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* [Internet] 2003; 108(5):741-749. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.11627>
- 19 Leite ACE, Guerra ENS, Melo NS. Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal: revisão. *Rev Clín Pesq Odontol.* [Internet] jan./mar. 2005; 1(3):31-6. Disponível em: http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/14934/1/ARTIGO_FatoresRiscoRelacionados.pdf
- 20 Andrade MGS, Reis SRA, Robinson WM, Borges-Osório, MR. Micronúcleo: Um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odonto Ciência – Journal of Dental Science.* [Internet] abr./jun. 2005; 20(48):137-141. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/view/1166>