Investigação

EFEITOS GENOTÓXICOS DO USO CRÔNICO DO FUMO NA MUCOSA ORAL

Genotoxic effects of the chronic tobacco use in the oral mucosa.

Amália A. B. Campos⁽¹⁾, Priscila C. Gonçalves⁽¹⁾, Maria A. Noventa⁽¹⁾ *

(1) Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca – SP, Brasil

* Autor correspondente: maria.noventa@unifran.edu.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo relacionar o uso do fumo com o aumento de quebras cromossômicas das células da mucosa oral em fumantes crônicos levando a riscos de surgimento de câncer bucal, pela técnica do micronúcleo. Diversos agentes atuam de forma genotóxica nas células e estão relacionados aos vários estágios da carcinogênese. Com relação à cavidade bucal, o fumo tem sido descrito como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas. A possibilidade de redução da incidência do câncer de boca está relacionada ao conhecimento e controle de fatores que são considerados de risco para o desenvolvimento da doença. Os micronúcleos são porções de cromatina resultantes de mitoses aberrantes que permanecem próximas ao núcleo celular, e têm sido utilizados como marcadores para avaliar o grau de injúria genotóxica ao qual as células animais estão expostas. A amostra constou de células esfoliadas da língua e da mucosa jugal de 10 indivíduos fumantes e 10 não-fumantes. As células obtidas foram coradas pelo método de Feulgen e contracoradas por "Fast Green". Observou-se um aumento estatisticamente significativo de micronúcleos em células esfoliadas dos indivíduos fumantes, o que permite sugerir que o hábito de fumar predispõe o indivíduo a danos genéticos que podem levar a câncer bucal.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de boca, micronúcleos, fumo, efeitos genotóxicos, mucosa oral.

ABSTRACT

This study aimed at linking tobacco use with increased chromosome breakage of the oral mucosa in chronic smokers taking the risk of developing oral cancer, the micronucleus assay. Several agents act in a genotoxic in cells and are related to various stages of carcinogenesis. With respect to the oral cavity, the smoke has been described as the main risk factor for the development of malignant and premalignant. The possibility of reducing the incidence of oral cancer is related to knowledge and control of factors that are considered at risk of developing the disease. Micronuclei are pieces of chromatin resulting from aberrant mitosis that remain near to the cell nucleus, and have been used as markers to assess the degree of genotoxic insult to which animal cells are exposed. The sample consisted of exfoliated cells of the tongue and jugal mucosa of 10 smokers and 10 nonsmokers. Cells were stained with Feulgen and counterstained by fast-green. There was a statistically significant increase of micronuclei in exfoliated cells of smokers, which allows us to suggest that smoking predisposes individuals to genetic damage that can lead to oral cancer.

KEY-WORDS: mouth cancer, micronuclei, genotoxic effects, oral mucosa.

INTRODUÇÃO

Diversos agentes atuam de forma genotóxica nas células e estão relacionados aos vários estágios da carcinogênese. Com relação à cavidade oral, o fumo tem sido descrito como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas (ROBERTS, 1997, MAHAPATRA et al., 2015). O fumo (DeMARINI, 2004, MERCHANT & PITIPHAT, 2015) e o uso excessivo de álcool (REIS, 2002), comuns a inúmeros processos patológicos, têm apresentado papel especial na etiopatogenia do câncer de boca e do esôfago (DIETZ, 2000). O tabagismo é conceituado como o hábito de fumar cigarros, charutos e cigarros de palha, constituindo a principal causa do câncer oral e também do câncer de pulmão e laringe. Segundo o INCA (2002), o tabaco é a maior causa isolada de doenças e mortes no mundo. Na fumaça do tabaco já foram detectadas mais de 60 substâncias carcinogênicas. A alteração que ocorre na mucosa oral decorre da presença dessas substâncias associadas à exposição contínua ao calor desprendido pela combustão do fumo. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no tabaco e produtos resultantes da nitrosação da nicotina atuam como iniciadores e promotores da carcinogênese. O câncer oral é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo o carcinoma epidermóide a sua forma mais prevalente (INCA, 2008). O Brasil figura na literatura com altas taxas de câncer oral, variando a sua prevalência de região para região (REIS, 2002).

A agressão ao DNA da célula ocorre constantemente por agentes oxidantes. Estes agentes são administrados diretamente como no caso da fumaça do cigarro, que

é rica em peróxidos, superóxidos e produtos nitrogenados, ou resultam da metabolização de alimentos e bebidas alcoólicas, cujos metabólitos são nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e acetaldeído (ANDRADE, 2005).

A possibilidade de redução da incidência do câncer de boca está relacionada ao conhecimento e controle de fatores que são considerados de risco para o desenvolvimento da doença. Neste contexto, destaca-se a influência do hábito de fumar e do consumo excessivo de bebidas alcoólicas (FREITA, 2005).

Diversos são os testes utilizados no biomonitoramento de populações humanas expostas a agentes mutagênicos, destacando-se entre eles o Teste de Micronúcleo. Os micronúcleos são porções de cromatina resultantes de mitoses aberrantes que permanecem próximas ao núcleo celular e sua frequência tem sido utilizada para avaliar o grau de injúria genotóxica ao qual as células animais estão expostas. Este teste apresenta vantagens sobre a análise cromossômica clássica por ser um procedimento simples, eficaz e realizado a baixo custo (SARTO et al., 1987). Além disso, a frequência de micronúcleos aparece elevada em tecidos expostos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente, tornando-o valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese oral. O objetivo deste trabalho é relacionar o uso do fumo com o aumento de quebras cromossômicas das células da mucosa oral em fumantes crônicos levando a riscos de surgimento de câncer oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

A amostra incluiu 20 indivíduos distribuídos em dois grupos:

grupo de fumantes crônicos: constituído por 10 indivíduos que informaram uso frequente de cigarro industrializado há mais de dois anos. Grupo de não-fumantes: constituído, também, por 10 indivíduos que informaram não fumar.

Os indivíduos fumantes e não-fumantes foram pareados segundo o sexo e a idade a fim de constituir um grupo controle. Os indivíduos participaram da pesquisa espontaneamente, foram informados sobre os procedimentos experimentais e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este trabalho seguiu orientação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Franca, tendo sido aprovado sob número do protocolo CEPE - 0028/09.

Coleta de Células e preparação das Lâminas

A amostra constou de células esfoliadas da língua e da mucosa jugal de indivíduos fumantes e não-fumantes. A coleta de células da mucosa oral foi feita, após enxágue com água, mediante raspagem gentil em movimentos contínuos e unidirecionais com Swab umedecido em NaCl 0,9%. As células foram suspensas em 5 mL de soro fisiológico. O material foi centrifugado por 10 min a 328 g e o sobrenadante desprezado, obtendo-se dessa forma um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Estas foram fixadas em 1mL de solução metanol: ácido acético (3:1, v/v) e posteriormente transferidas para lâminas limpas, úmidas e geladas. Após secagem durante 24 horas, as lâminas contendo células esfoliadas foram submersas em solução de HCl 1 N por 30 minutos. Procedeu-se à coloração com a reação de Feulgen e a contracoloração com o "Fast Green" 0,05% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolvido em etanol 95% (Merck Incorporation Co. Whitehouse Station, N.J. USA).

Análise de Micronúcleo

Toda análise foi realizada em teste cego quanto ao conhecimento sobre os indivíduos. A contagem das células foi feita em microscopia óptica comum com aumento máximo de 1000x. Foram considerados micronúcleos, estruturas com distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) a do núcleo, visualizadas no mesmo plano deste. Somente células com citoplasma íntegro foram computadas. Células apresentando núcleo fragmentado e citoplasma vacuolado foram computadas separadamente. Foi realizada a contagem de 1.000 células para cada indivíduo e o número de células micronucleadas foi registrado. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleo foram os previamente estabelecidos por Coutryman & Heddle (1976): 1) presença de material nuclear; 2) ter intensidade de luz maior ou igual à do núcleo; 3) ter forma circular ou oval; 4) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; 5) estar completamente separado do núcleo.

Análise dos Resultados

A análise estatística foi feita usando Student’s t-test com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Foram contadas 1000 células totais para cada um dos indivíduos usados no estudo e computadas separadamente células micronucleadas e células com outras alterações como núcleo fragmentado e citoplasma vacuolado, situações que indicam que a célula pode estar em apoptose devido ao alto grau de injúrias genéticas sofridas. A análise dos resultados mostrou que nenhum dos indivíduos controle ou experimental apresentou mais de um micronúcleo por célula.

O número total de alterações observadas em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes (experimentais) e não-fumantes (controle) está apresentado na Tabela 1. Observa-se pela tabela que todos os indivíduos fumantes apresentam um número maior de micronúcleos e outras alterações celulares do que seu respectivo controle.

TABELA 1 – Números absolutos de alterações observadas em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não-fumantes/1000 células.

Não Fumantes	MN	NF	CV	Fumantes	MN	NF	CV
C1 – F, 18	2	0	0	E1 – F, 18	9	4	3
C2 – F, 28	0	0	0	E2 – F, 28	3	0	2
C3 – F, 41	1	1	1	E3 – F, 41	2	1	2
C4 – M, 23	3	1	0	E4 – M, 23	5	3	2
C5 – M, 45	1	0	1	E5 – M, 45	5	4	2
C6 – M, 24	1	0	0	E6 – M, 24	3	1	1
C7 – M, 25	3	0	0	E7 – M, 25	6	0	1
C8 – F, 61	3	0	1	E8 – F, 61	4	0	0
C9 – F, 26	2	0	0	E9 – F, 26	6	0	2
C10 – M, 22	4	2	3	E10 – M, 22	7	6	4

C – controle; E – experimental; M – masculino; F – feminino; MN – micronúcleos; NF – núcleo fragmentado; CV – citoplasma vacuolado.

Foi observado que a ocorrência de micronúcleos nas células esfoliadas da mucosa oral dos indivíduos do grupo experimental composto por indivíduos fumantes crônicos, apresentou uma frequência significativamente maior de micronúcleos quando comparadas às células obtidas da mucosa oral dos indivíduos do Grupo de não fumantes (p< 0,05) (Tabela 01). A avaliação de alterações indicativas de apoptose como a presença de núcleo fragmentado e a ocorrência de citoplasma vacuolado revelou que a ocorrência de danos citoplasmáticos (citoplasma vacuolado) é significativamente maior no grupo experimental do que no grupo controle (p< 0,05), porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando considerados os danos de fragmentação ao núcleo celular (p> 0,05) (Tabela 02). A ocorrência de micronúcleos e de outras alterações também foi detectada em níveis significativamente maiores em função do hábito de fumar (p< 0,005) (Tabela 03).

TABELA 2: Média ± Desvio Padrão de cada uma das alterações observadas em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes/1000 células

MICRONÚCLEOS		NÚCLEO FRAGMENTADO		CITOPLASMA VACUOLADO	
Não-Fumantes	Fumantes	Não-Fumantes	Fumantes	Não-Fumantes	Fumantes
2,0 ± 1,25	5,0 ± 2,11	0,4 ± 0,7	1,9 ± 2,18	0,6 ± 0,97	1,9 ± 1,1

MN – Estatisticamente significativo (p=0,0011); NF – Não é estatisticamente significativo (p=0,0532); CV – Estatisticamente significativo (p=0,0117).

TABELA 3: Média ± Desvio Padrão do total de alterações observadas em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes/1000 células

Não-Fumantes	Fumantes	P
3,0 ± 2,45	8,8 ± 4,66	0,0027 *

DISCUSSÃO

O câncer oral constitui um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. A possibilidade de redução da incidência do câncer de boca está relacionada ao conhecimento e controle de fatores que são considerados de risco para o desenvolvimento da doença. Neste contexto, destaca-se a influência do hábito de fumar e do consumo excessivo de bebidas alcoólicas (BRENER et al, 2007, CARVALHO, 2003).

Dados apresentados no presente estudo permitem dizer que, como já relatado na literatura (LESSA et al, 2009, MARTINS, 2003), o processo de transformação maligna é acompanhado de um aumento na frequência de danos cromossômicos e que os componentes do cigarro são efetivos na indução de danos cromossômicos e a apoptose é induzida pelos efeitos genotóxicos de componentes do cigarro. O Teste de Micronúcleo pode ser utilizado no biomonitoramento de indivíduos fumantes e na avaliação da frequência de danos cromossômicos nas lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral.

Apesar de o estudo deixar clara a associação entre o tabagismo e o aparecimento de danos celulares e apesar de todos os indivíduos fumantes apresentam um número maior de

micronúcleos e outras alterações celulares do que seu respectivo controle pode-se observar, fazendo-se uma análise individual de cada um dos envolvidos, que alguns apresentam uma quantidade alta de micronúcleos (9 no caso do indivíduo experimental 1 – Tabela 3) e outros parecem não possuir um aumento significativo destas alterações quando comparados ao seu controle (2 no caso do experimental 3 contra 1 de seu respectivo controle), mas esse desvio entre os indivíduos é comum (MARTINS, 2003).

O melhor meio de combater o câncer oral é a prevenção, através do diagnóstico precoce e da tentativa de eliminação dos fatores de risco. A educação em saúde, através de programas que visem à valorização das avaliações periódicas e a importância do exame da cavidade oral são as maiores armas disponíveis para diminuir a alta ocorrência do câncer oral na comunidade (INCA 2002).

Após a análise estatística deste estudo pode-se concluir que existe associação significativa entre a exposição ao fumo e a presença de micronúcleos e outras alterações citoplasmáticas nas células esfoliadas da mucosa oral. O aumento na frequência de micronúcleos pode representar um marcador precoce para indicar o aumento do risco relativo individual para o desenvolvimento de câncer oral.

REFERÊNCIAS

Andrade MGS, Reis SRA, Robinson WM. et al. 2005. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odonto Ciência*. 20(48):137-141.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa, AA. et al. 2007. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53(1):63-69.

Carvalho C. 2003. Cresce Incidência de Câncer de Boca no Brasil. *Revista Brasileira de Odontologia*. 60(1):36-39.

Coutryman PI, Heddle JA. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*. 41:321-332.

DeMarini DM. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research*. 567(2-3):447-454.

Dietz J, Diehl AS, Prolla JC. et al. 2000. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 46(3):207-211.

Freita VS, Lopes MA, Meireles JRC. et al. 2005. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 29(2):189-199.

Doc. eletrônico (internet): INCA, Instituto Nacional do Câncer. 2008. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br> [Acessado em 02/2015].

Doc. eletrônico (internet). INCA, Instituto Nacional do Câncer. 2002. Falando Sobre Câncer da Boca. Disponível em: Disponível em <http://www.inca.gov.br> [Acessado em 02/2015].

Doc. eletrônico (internet): Lessa JPR, Dórea LTM, Cerqueira EMM. 2008. Danos cromossômicos e apoptose em células esfoliadas do epitélio bucal: uma avaliação da associação com o hábito de fumar e com o câncer oral. In: *Anais da 60ª Reunião Anual da SBPC*. (Campinas, Brasil). 1 p.

Disponível em: <http://sbpcnet.org.br/livro/60ra/resumos/resumos/R3205-1.html> [Acessado em 02/2015].

Mahapatra S, Kamath R, Shetty BK. et al. 2015. Risk of oral cancer associated with gutka and other tobacco products: A hospital based case - control study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 11(1):199-203.

Martins KF, Boschini-Filho J. 2003. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. 5(1):43-53.

Merchant AT, Pitiphat W. 2015. Total, Direct and Indirect Effects of Paan on Oral Cancer. *Cancer Causes and Control*. 26(3):487–491.

Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS. et al. 2002. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 16(3):221-225.

Roberts DM. 1997. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytologica*. 41(4):1008-1014.

Sarto F, Finnato S, Giacomelli L. et al. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 2:11-17.