

Teste de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal como uma alternativa para identificação precoce de câncer bucal em fumantes



<https://doi.org/10.56238/sevened2023.007-031>

Juscélio Clemente de Abreu

Doutor em citogenética
Centro Universitário de Caratinga – UNEC

Julyanna Dutra de Oliveira

Graduanda do sétimo período de Medicina
Centro Universitário de Caratinga – UNEC

Camila Goulart Hudson

Graduanda do sétimo período de Medicina
Centro Universitário de Caratinga – UNEC

Marco Antônio Ferraz Junqueira

Mestre em Saúde Coletiva
Centro Universitário de Caratinga – UNEC

Enrico Lopes Campos de Abreu

Graduando do quinto período de Medicina
Centro Universitário de Caratinga – UNEC

RESUMO

Os micronúcleos são estruturas constituídas por material genético cromatídeo contido por uma membrana, menores que o núcleo principal, normalmente, são formados ao redor da carioteca ou espalhados ao longo do citoplasma das células. Várias são as vantagens do teste do micronúcleo para o diagnóstico de carcinomas espinocelulares em usuários crônicos de tabaco sob suas diversas formas, sendo uma das principais, a possibilidade de detecção precoce de danos genéticos na mucosa bucal, antes mesmo da manifestação de quaisquer outros sinais clínicos e histológicos que evidencie o carcinoma, além de ser um teste não invasivo; indolor; de baixo custo; com alta especificidade e sensibilidade e de alto valor preditivo

Palavras-chave: Câncer bucal, Fumantes,

1 INTRODUÇÃO

O ser humano está continuamente sendo exposto diariamente a diversas substâncias citotóxicas e genotóxicas, de forma consciente ou inconsciente. Dentre estas substâncias, as da fumaça do cigarro, figuram entre as mais prejudiciais.

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de aproximadamente 4.720 substâncias tóxicas diferentes, das quais, 60 são consideradas potencialmente mutagênicas. As principais são: nicotina, benzopireno, benzeno, níquel, arsênico, as radioativas (polônio 210 e carbono 14), os metais pesados (chumbo e o cádmio) e os aditivos (conservantes, flavorizantes, intensificadores, umectantes e compostos de amônio). Isso, sem citar os resíduos de agrotóxicos.

Já é notório na literatura científica que o hábito do consumo crônico de tabaco está relacionado ao aumento das taxas de desenvolvimento de carcinomas orais. No processo de formação do câncer, a citotoxicidade pode acarretar lesão crônica seguida por aumento da multiplicação celular compensatória, hiperplasia e então desenvolvimento do tumor. Desse modo, há correlação entre a



citotoxicidade e os danos genéticos, sendo que o acúmulo desses danos no genoma pode favorecer a progressão de uma célula normal em maligna (CARVALHO et al., 2002).

De acordo com Martins e Boschini Filho (2003), indivíduos geneticamente sensíveis a agentes citotóxicos e genotóxicos, tais como radiações, drogas e vírus, podem apresentar danos no DNA genômico (genotoxicidade), levando aos mais diversos tipos de alterações celulares (citotoxicidade). Entre estas alterações se destaca a formação de micronúcleos.

Desde os trabalhos clássicos de Stich et al. (1982) e Bugarin et al. (1998), que verificaram que células de epitélios esfoliativos de indivíduos fumantes sempre apresentavam uma maior frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em relação ao grupo controle, o teste do micronúcleo vem sendo utilizado na avaliação periódica dos fumantes, pois o hábito do tabagismo, muitas vezes, pode resultar em neoplasias malignas.

Os micronúcleos são estruturas constituídas por material genético cromatídeo contido por uma membrana, menores que o núcleo principal, e resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos que se comportam independentemente dos outros cromossomos do núcleo durante a divisão celular. Normalmente, são formados ao redor da carioteca ou espalhados ao longo do citoplasma das células.

O micronúcleo forma-se como uma resposta ao dano genético ocasionado pela ação de agentes mutagênicos, e, por este motivo, a avaliação deste bioindicador é amplamente utilizada para indicar a exposição aos agentes tóxicos contidos no cigarro (MENDES, 2018).

Várias são as vantagens do teste do micronúcleo em células dos epitélios esfoliativos, dentre elas destacam-se: refletem as alterações citogenéticas que ocorreram na população de células em constante divisão na camada basal; monitoraram pessoas com alto risco de desenvolver câncer como fumante e alcoólatras; é um método não invasivo e de preparação simples, o que permite pesquisa em nível epidemiológico; e possibilita resultados compatíveis com os obtidos em técnicas mais sofisticadas como, por exemplo, cultura *in vitro* de linfócitos e DNA satélite.

Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste do micronúcleo como indicador de danos citogenéticos em células do epitélio de revestimento oral, brônquico e esofágico (CARVALHO et al., 2002; MUÑOZ et al; 1987; STICH et al; 1982; RAMIREZ et al; 1999 e LIPPMAN et al; 1990). Este teste é indicado como principal procedimento, tendo em vista que é rápido, barato, não-invasivo, com a possibilidade de ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob o uso recorrente de tabaco e outras substâncias mutagênicas (CARVALHO et al., 2002) que podem induzir o câncer de boca.

O câncer de boca pode ser definido como um conjunto de neoplasias malignas que afetam diversos sítios anatômicos na região da cabeça e do pescoço. Não há, na literatura internacional, uma padronização das localizações primárias incluídas nas definições de câncer de cavidade oral ou câncer de boca. Neste contexto, serão consideradas como câncer de boca as neoplasias malignas de lábio,



língua, gengiva, assoalho da boca, palato duro, outras partes da boca, que correspondem, respectivamente, aos códigos C00, do C002 ao C05.0 e C06 da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) (BRASIL, 2022)

O perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos pelo câncer de boca está bem estabelecido na literatura. A doença é mais prevalente em homens, com mais de 40 anos, tabagistas, de baixa escolaridade e baixa renda. A língua é considerada o órgão mais agredido, e o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histopatológico mais frequente (RUTKOWSKA et al., 2020).

A Política Nacional de Prevenção e Controle do Câncer (PNPCC) afirma que o câncer é uma doença crônica e prevê, em suas diretrizes, ações de promoção da saúde, prevenção primária, detecção precoce, diagnóstico, tratamento e cuidados paliativos. De acordo com a normativa, deve-se garantir toda a linha de cuidado na rede de atenção à saúde, baseando-se em evidências científicas (BRASIL, 2013).

O fato das neoplasias se apresentarem indolores, o atraso no reconhecimento da lesão pelo dentista ou pelo médico e a falta de acesso da população aos serviços de saúde, dificultam o diagnóstico precoce do câncer de boca e de outras lesões pré-malignas, como as leucoplasias, que podem preceder o seu aparecimento na boca e que por isso são consideradas precursoras do carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC).

Considerando-se os estudos supracitados que demonstram a importância do teste do micronúcleo no biomonitoramento de indivíduos expostos aos mutagênicos, muitos dos quais, responsáveis pela carcinogênese bucal, o presente capítulo teve como objetivo de apresentar esta técnica alternativa; não invasiva; indolor; de baixo custo; com alta especificidade e sensibilidade e alto valor preditivo, para identificação precoce do câncer de bucal em fumantes, porém, pouco conhecida entre os odontólogos e outros profissionais de saúde.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE BOCA

O câncer de boca representa 3% dos casos de câncer no mundo, levando em consideração todos os tipos de câncer (SOARES, BASTOS NETO e SANTOS, 2019). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), para o ano de 2030 a estimativa de casos novos está em torno de 27 milhões, sendo que, o Brasil apresenta a maior taxa de incidência câncer de boca da América do Sul, de 3,6 casos por 100 mil habitantes, e a segunda maior taxa de mortalidade, de 1,5 morte por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022).

A etiologia do câncer de boca é multifatorial, de maior predisposição para neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço. Os principais casos estão relacionados a fatores epigenéticos em relação aos indivíduos que fazem uso recorrente de álcool e tabaco possuem uma.



A identificação de fatores de risco que auxiliam no diagnóstico precoce da doença é essencial, porém, no Brasil a identificação das lesões malignas em estágio inicial corresponde a menos de 10% dos diagnósticos (VOLKWEIS et al., 2014).

A alta na prevalência, incidência e letalidade dos indivíduos acometidos pelo câncer de boca na população brasileira apontam a necessidade desta patologia ser investigada por meio de pesquisas epidemiológicas, não apenas para monitoramento da

doença, mas como forma de garantir a caracterização do perfil da população de risco e traçar políticas de saúde pública para toda a população (SANTOS et al., 2012).

Embora a cavidade oral possa ser acometida por diferentes tipos de neoplasias malignas como os tumores de glândulas salivares (adenocístico, mucoepidermóide, tumor de células acinares e adenocarcinomas), sarcomas e melanomas, o tipo histológico mais freqüente é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC), representando 90% dos tumores malignos dessa região (BRASIL, 2022).

A identificação dos fatores de risco e o diagnóstico precoce são de basilar importância para elaboração de políticas públicas de prevenção.

2.2 FATORES DE RISCO PARA A NEOPLASIAS ORAIS: O CONSUMO DE TABACO

As neoplasias orais, tal como outras, é uma alteração celular pouco reversível, resultante de mutações em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA; no controle da proliferação e da diferenciação celular. Além disso, alterações em genes das vias de apoptose podem contribuir para a promoção da doença, uma vez que células que têm DNA lesado escapam da morte e podem gerar descendentes geneticamente alteradas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias devem, portanto, atuar na indução de alterações no material genético, levando à ocorrência tanto de mutações gênicas quanto de alterações cromossômicas.

O consumo de tabaco industrializado é o mais importante fator de risco independente para o desenvolvimento de neoplasias orais e de faringe, constituindo-se na principal causa evitável de morte prematura. Estima-se que 10 milhões de pessoas morrerão de doenças tabaco-relacionadas no ano próximo ano (2020) dos quais 70% estarão em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil.

Além do cigarro industrializado, outras formas de consumo do tabaco, a exemplo do cachimbo, charuto e o mascar do fumo, também estão associadas a essas neoplasias (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005).

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de aproximadamente 4.720 substâncias tóxicas diferentes, das quais, 60 são consideradas potencialmente mutagênicas. As principais são: nicotina,



benzopireno, benzeno, níquel, arsênico, as radioativas (polônio 210 e carbono 14), os metais pesados (chumbo e o cádmio) e os aditivos (conservantes, flavorizantes, intensificadores, umectantes e compostos de amônio). Isso, sem citar os resíduos de agrotóxicos.

Das 60 substâncias potencialmente mutagênicas, destacam os hidrocarbonetos aromáticos, o benzopireno e as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNs): nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopyrrolidina (NPYR), nitrosodimetilamina (NDMA), e 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-piridil) - 1-butanona (NNK), que são solúveis em água e que apresentam maiores danos às células (JOHNSON, 2001).

2.3 MÉTODO DE COLETA E A QUALIDADE DO ESFREGAÇO DE MUCOSA ORAL

A citopatologia é um método diagnóstico, baseado na análise das características morfológicas de um pequeno conjunto de células que se destacam das superfícies epiteliais, decorrente do processo constante de esfoliação e renovação celular.

O estudo dessas células pode sugerir um diagnóstico de acordo com as alterações estruturais encontradas. Existem relatos de inúmeros métodos de coleta dessas células na literatura. A citologia esfoliativa convencional e a citologia esfoliativa em base líquida são dois dos mais conhecidos dentre esses métodos. Sendo que no presente projeto será focado apenas considerações sobre citologia esfoliativa convencional.

A análise citológica é uma técnica minimamente invasiva, que se constitui em menor traumatismo, representando, assim, um método diagnóstico de ínfima morbidade para o paciente. Com isso, credita-se à citopatologia um melhor efeito psicológico, em relação às demais técnicas diagnósticas, proporcionando uma maior colaboração por parte do doente bem como a sua adesão ao tratamento. Outra vantagem é a maior superfície de amostragem, já que não é criada qualquer solução de continuidade, haja visto que o exame não compromete a integridade do epitélio, podendo a esfoliação ser realizada em mais de um sítio (LUCENA, et al. 2011).

Como desvantagens, a citopatologia caracteriza-se fundamentalmente pelo estudo das células que se destacaram de um tecido de revestimento pela fricção de um instrumento de coleta. Logo, conclui-se que, por meio desse método diagnóstico, não é possível estabelecer o caráter de normalidade da relação intercelular. A visualização de células isoladas, sem a análise das alterações arquiteturais do tecido, tem sido considerada uma das principais limitações do uso da citologia esfoliativa, por aumentar a possibilidade de falsos-positivos e falsos negativos (MERLIN, 2002).

Além disso, pode-se citar o alto grau de resultados não conclusivos ou com material insuficiente ou inadequado. Tais resultados podem decorrer da não padronização da técnica e/ou inexperiência do responsável pela coleta. Outro ponto negativo é o fato de o exame só ser utilizado em lesões de



superfícies, ou seja, lesões confinadas na profundidade de tecidos, como o ósseo e o conjuntivo propriamente dito que não podem ser diagnosticadas (FONTES, 2008).

O epitélio da mucosa bucal destinado a análise do teste do micronúcleo possui várias vantagens, como o baixo custo e a praticidade de coleta que facilita o desenvolvimento de pesquisas de biomonitoramento de substâncias citotóxicas e genotóxicas.

A técnica utilizada neste teste constitui raspagem do epitélio da mucosa bucal por meio de uma espátula de madeira ou plástico, como sugerido por Tolbert et al. (1992) e Palaskara, Jindal, (2010).

Ao iniciar a coleta, o primeiro passo é garantir uma assepsia local através de bochecho com água a fim de evitar que a presença de bactérias ou outras substâncias interfiram nas leituras (SUHAS et al., 2004 e THOMAS, 2009). Em seguida, a raspagem do epitélio da mucosa bucal latero-inferior dos pacientes com a espátula de madeira é realizada. Por fim, após a coleta, as amostras serão direcionadas ao armazenamento em solução salina a 0,9% (MACHADO-SANTELLI, 1994 e BONASSI et al. 2009).

2.4 TIPOS DE COLORAÇÃO EM TESTES DE MICRONÚCLEOS

As maiores diferenças na forma de se realizar o teste de micronúcleo encontrado nos textos científicos, isso é na sua metodologia, são no tipo de coloração usada para identificar o micronúcleo. Um método de coloração de baixo custo e bastante empregado é o de May-Grünwald/Giemsa (MGG). Neste método, as lâminas, com o esfregado de células da mucosa bucal são secas ao ar e em seguida coradas com May-Grünwald por 5 minutos. Depois dessa fase, as lâminas são coradas com Giemsa 15 minutos e após esse processo são lavadas em água corrente (PALASKARA; JINDAL, 2010). Tal método de coloração possibilita uma melhor observação do núcleo da célula e é amplamente utilizada em células do tecido sanguíneo, apesar de não apresentar marcação específica para o DNA (THOMAS et al., 2009; NERSESYAN et al., 2006).

De acordo com Nersesyanyan et al. (2006), a maior limitação da MGG é a falta de especificidade para marcação de DNA, o que permite que aconteçam resultados falso-positivos com certa frequência. Corantes fluorescentes também podem ser usados para realização do teste do micronúcleo, mas esta técnica possui menor frequência de uso (aproximadamente, 13%) quando se fala dos laboratórios que fazem parte do projeto HUMN (BONASSI et al., 2009). Este método de avaliação demanda maior custo devido ao uso de anticorpos e de um microscópio de fluorescência.

A técnica de Feulgen é a mais comum para estudos de micronúcleos (aproximadamente, 56%) nos laboratórios que fazem esse tipo de teste (TOLBERT et al., 1992; THOMAS et al., 2009; BONASSI et al., 2009). O primeiro a ser feito nessa técnica é a imersão das lâminas, contendo as células da mucosa bucal, em HCl a 1 M em temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida, uma nova imersão das lâminas é realizada em HCl a 1 M a 60 °C por 10 minutos e, novamente, em HCl a 1 M a



temperatura ambiente por 1 minuto. As imersões realizadas na solução de HCl são responsáveis pela hidrólise das bases, sendo uma das fases mais importantes para coloração na técnica de Feulgen. Essa hidrólise feita possui a finalidade de separar as bases púricas do açúcar da desoxirribose, expondo os grupos aldeídos livres, deixando a cadeia do DNA preservada e apurinica (CHIECO; DERENZINE, 1999). Na etapa seguinte à hidrólise, as lâminas são imersas no reagente de Schiff por 1 hora (TOLBERT et al., 1992). Nesta etapa, as regiões específicas das células com os grupamentos aldeídos livres na molécula do DNA apurinico associam-se a Pararosanilina, um corante não metilado na cor magenta dissolvido no reagente de Schiff (CHIECO; DERENZINE, 1999). A ligação entre a pararosanilina e a molécula do DNA é considerada específica, impedindo assim as ações dos interferentes inespecíficos no resultado. Este método de coloração é o mais propício quando o objetivo é quantificar o DNA devido ao fato de possuir alto grau de especificidade para marcação da molécula de DNA (CHIECO; DERENZINE, 1999). Ademais, na coloração por Feulgen/Fast Green, o citoplasma fica com uma coloração que ajuda na identificação do micronúcleo, se trata de uma coloração transparente e clara, que permite uma identificação mais adequada do micronúcleo em microscópio óptico comum (HOLLAND et al., 2008; THOMAS et al., 2009).

2.5 CRITÉRIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

Para a identificação dos micronúcleos será utilizada a técnica proposta por Tolbert; Shy; Allen (1992), com modificações já realizadas por Carvalho et al. (2002) e necessárias para o sucesso da técnica. Os padrões sugeridos são:

a) Contagem de células: devem ser incluídas as que tenham os núcleos normais e os intactos, com perímetro nuclear liso e distinto; que apresentassem o citoplasma intacto corados por Fast Green, com exceção das que tinham pequenas dobras e pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes.

b) Contagem dos micronúcleos: deve-se ser considerados micronúcleos aqueles que apresentam um halo circundante sugestivo de uma membrana, menos de 1/3 do diâmetro do núcleo associado, intensidade da coloração com Schiff semelhante ao núcleo e mesmo plano focal a microscopia. A análise deverá ser realizada em 1.000 células para cada uma das lâminas a ser analisadas, de cada indivíduo e a seguir o número de micronúcleos das regiões A e B deverão ser somados e a mediana deverá ser expressa em número de micronúcleos por 1.000 células. A presença de células micronucleadas é evento aleatório, que exibe uma distribuição de Poisson, e deste modo a comparação entre as frequências de micronúcleos deverá ser realizada por teste não-paramétrico com $p < 0.05$.



2.6 AVALIAÇÃO DO QUANTITATIVO DE CÉLULAS

Seguindo a sugestão de Tomas et al. (2009), para células da mucosa da boca, a avaliação quantitativa de células será realizada a partir da análise de 1.000 a 2.000 células, esse número pode variar devida a coleta do material e para melhor precisão da pesquisa. A pesquisa inicial é individual e o material coletado de cada voluntario deverá ser analisado separadamente. As células devem ser quantificadas e dentre elas, as com a presença de micronúcleos, também serão contadas, separando em grupos.

2.7 COMO OBTER E PREPARAR O MATERIAL PARA ESTUDO CITOGENÉTICOS: DANOS CROMOSSÔMICOS E APOPTOSE

O material destinado à análise citopatologia deve ser coletado por meio de raspagem gentil da mucosa oral com espatula abaixador de língua, e com ele deve ser realizado um esfregaço em lâmina de vidro limpa previamente contendo uma gota de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). As lâminas com o material coletado deverão ser secas ao ar à temperatura ambiente e posteriormente deverão ser fixadas em solução de Carnoy (etanol/ácido acético na concentração de 3:1) por 24 horas.

A hidrólise das células contidas nas lâminas deverá ser realizada em ácido clorídrico (5N) por 15 minutos seguindo-se de lavagem em água destilada por três vezes.

A coloração deverá feita utilizando o reativo de Schiff, e a contra coloração com Fast Green a 1%. As lâminas permanentes deverão montadas com Entelan®.

2.8 CUIDADOS PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS DE TESTES DE MICRONÚCLEOS

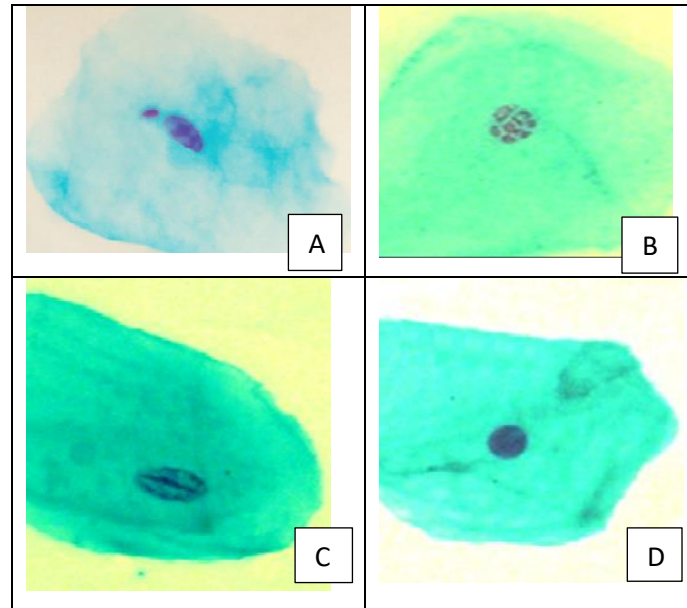
Toda a análise citopatologia deverá realizada sob microscopia óptica (200x) e em teste cego sobre as amostras coletas.

Deverão ser analisadas no mínimo 2.000 células por indivíduo, para uma maior acurácia do teste, pois micronúcleos aleatórios e/ou alterações nucleares, sem significância estatística, podem ser identificadas na mucosa bucal. Os critérios de identificação de micronúcleo deverão seguir os descritos por Tolbert, Shy e Allen (1992), considerando-se micronúcleos estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentando-se em relação a este, estrutura cromatinica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano (FIGURA 1a).

Nas análises citopatologias, também deverão computadas células apresentando alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose: cariorréxis, cromatina condensada e picnose (FIGURAS 1b, c, d). Somente células com citoplasma íntegro deverão ser computadas, seguindo orientações de padrões citopatológicos gerais em condições benignas e malignas, de acordo com o caderno técnico em citopatologia do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).



FIGURA 1 - Fotomicrografias indicativas de ocorrência de Micronúcleo (A), Cariorréxis (B), Cromatina condensada (C) e Pícnose (D).



2.9 SUGESTÕES PARA OS PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de análise de variância (ANOVA) deverá ser utilizado para a detecção de diferenças significativas das frequências de micronúcleos pelo teste F ($p < 0,05$) e a comparação das frequências médias deverá ser feita por meio do teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade.

Para confirmação de efeitos aleatórios sobre os parâmetros analisados, a distribuição de Poisson deverá ser verificada, para determinar se o número de possíveis ocorrências de alterações nucleares discretas seja muito maior do que o número médio de ocorrências em um determinado intervalo de tempo ou espaço. Desta forma, o número de possíveis ocorrências, muitas vezes não se sabe exatamente. Os resultados devem ocorrer de forma aleatória, ou seja, totalmente por acaso e da probabilidade de ocorrência não deve ser afetado por ser ou não os resultados ocorridos anteriormente, de modo que as ocorrências são independentes.

Outros testes estatísticos também devem ser utilizados, tais como sugerido por Miranda (2006):

- Teste de ShapiroWilk para verificar se as variáveis tinham distribuição normal;
- Correlação de Spearman para verificar a correlação entre os grupos;
- Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon para verificar a existência de diferença entre grupos dependentes (comparação intraindividual dos pacientes com câncer bucal);
- Teste das Somas dos Postos de Wilcoxon para verificar a existência de diferença entre grupos independentes;
- Teste de KrustalWallis para comparar grupos independentes;
- Teste Exato de Fisher para verificar associação entre variáveis;
- Curvas 'ROC' para determinar pontos de corte e variáveis com poder de predição de doença;



- Teste de McNemar para comparar sensibilidade e especificidade entre as variáveis.

2.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Como trata-se de um estudo que envolve coleta de amostra biológica e com seres humanos, o mesmo deverá ser cadastrado na Plataforma Brasil e avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) registrado no conselho nacional de saúde.

Os sujeitos da pesquisa deverão ser conscientizados quanto aos objetivos da pesquisa e informados de que os preceitos éticos deverão ser assegurados, inclusive o anonimato, sendo necessária uma assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução n° 466/12 que trata de pesquisa envolvendo seres humanos (BRASIL, 2012).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo exposto acima, verifica-se que o teste do micronúcleo possibilita a detecção precoce de danos genéticos na mucosa bucal, antes mesmo da manifestação de quaisquer outros sinais clínicos e histológicos que evidencie o câncer, tornando-o valiosa ferramenta na prevenção dos carcinomas espinocelulares que são responsáveis por mais de 90% das neoplasias malignas que ocorrem na mucosa bucal e têm como principal fator de risco o uso crônico do tabaco sob suas diversas formas.



REFERÊNCIAS

- BONASSI, S. et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis*. v. 24, n. 4, p. 295-302, 2009.
- BRASIL, Conselho Nacional de Saúde (Brasil). Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Brasília, 2012. Disponível em: http://www.conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Caderno de referência 2: citopatologia não ginecológica. In: Fátima Regina Gomes Pinto, Leticia Maria Correia Katz Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012.
- BUGARIN O.T., et al. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res*. v. 413: p. 277-282, 1998.
- CARVALHO, M. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe, *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 48, n. 4, p. 317-22318, 2002.
- CHIECO, P.; DEREZINI. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 111 p. 345-358, 1999.
- FONTES K. B. F. C. et al. Contribuição da citopatologia para o diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral. *J Bras Patol Med Lab*. v. 44, n. 1, p. 17-24, 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, v. 659, p. 93-108, 2008.
- JOHNSON, N. Tobacco Use and Oral Cancer: A Global Perspective. *Journal of Dental Education*. v. 65, n. 4, p. 328-339, 2001.
- LIPPMAN S.M., et al. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int J Cancer*; v. 45, p. 811-815, 1990.
- LUCENA E. E. S. et al. Método de Coleta e a Qualidade do Esfregaço de Mucosa Oral. *Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac*. v. 11, n. 2, 2011.
- MACHADO-SANTELLI, G.M. et al. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*, v. 322, p. 203-208, 1994.
- MARTINS, K.F.; BOSCHINI FILHO, J. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não fumantes e fumantes. *Revista da Faculdade Ciências Médicas*, n. 5, p. 43-53, 2003.
- MENDES, S.C. Teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal como ferramenta da biomonitoração em fumantes: uma revisão de literatura. *Ciências Biológicas e de Saúde Unit*, v. 4, n. 1, p. 53-64, 2018.



- MERLIN J.C. Citologia cérvico-vaginal: estudo dos métodos colpocitológicos convencional e de monocamada ou base líquida baseado na celularidade retida em instrumentos de coleta. Dissertação [Dissertação em Biologia Celular] - Universidade Federal do Paraná - UFPR; 2002.
- MUÑOZ N., HAYASHI M., BANG LJ. Effect of riboflavin, retinol and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. *J Natl Cancer Inst*; v. 79, p. 687-691, 1987.
- NERSESYAN, A. et al. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated Oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 15, p. 1835-1840, 2006.
- MIRANDA, M. A. S. P. Micronúcleos e outras anomalias nucleares: um teste de predição para o câncer bucal. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- MONIKA RUTKOWSKA et al. Oral cancer: the first symptoms and reasons for delaying correct diagnosis and appropriate treatment. *Adv Clin Exp Med*. 2020;29(6):735–743
- PALASKARA, S.; JINDAL, C. Evaluation of micronuclei using Papanicolaou and May Grunwald Giemsa Stain. In *Individuals With Different Tobacco Habits – A Comparative Study*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 4, p. 3607-3613, 2010.
- RAMIREZ A., et al. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *Oral Oncol*, v 6, p. 199-204, 1999.
- SANTOS RA, PORTUGAL FB, FELIX JD, SANTOS PMO, SIQUEIRA MM. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. *Rev Bras Cancerol*. 2012; 58(1):21-9.
- STICH, H.; CURTES, J.; PARIDA, B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *International Journal of Cancer*, v. 30, p. 553-558, 1982.
- SOARES, E.C.; BASTOS NETO, B.C.; SANTOS, L.P. de S. Estudo epidemiológico do câncer de boca no Brasil. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 192-8, set./dez. 2019. <https://doi.org/10.26432/1809-3019.2019.64.3.192>
- SUHAS, S. et al. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Research*, v. 561, p. 15-21, 2004.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v. 4, p. 295- 302, 2009.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, v. 271, p. 69-77, 1992.
- WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncology*, v. 41, n. 3, p. 244–260, 2005.
- VOLKWEIS MR, BLOIS MC, ZANIN IIR, ZAMBONI R. Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Câncer Bucal em um CEO. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac*. 2014; 14(2):63-70.