

DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS NÃO-FUMANTES E FUMANTES

Kelly Fernanda Martins,¹ Júlio Boschini Filho ²

RESUMO

A instabilidade genômica é um dos principais aspectos da mutagênese e está associada com a carcinogênese.

Os micronúcleos são cromossomos alterados não incorporados ao núcleo na divisão celular e que apresentam relação com agentes genotóxicos, podendo ser detectados nas células esfoliativas dos epitélios.

Com o objetivo de determinar a presença e a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares, células esfoliativas da mucosa bucal em suspensão salivar de 48 alunos do Curso de Ciências Biológicas, na faixa etária de 20 a 24 anos, sendo 25 não-fumantes e 23 fumantes foram analisadas. As células em suspensão salivar lavadas em solução fisiológica e fixadas em ácido acético e etanol 1:3 durante 24 horas, após hidrolisadas em HCl a 5N na temperatura ambiente durante 30 minutos foram coradas pela reação de Feulgen, durante uma hora e meia e contracoradas pelo Fast Green durante um minuto. Os resultados obtidos indicaram que a variação do percentual da presença de micronúcleos em 1.000 células analisadas por indivíduo, com significância 0,05 ou 5%, foi de 44% entre os não-fumantes para 91% entre os fumantes. Em relação ao percentual de frequência desses micronúcleos, observamos que 100% dos não-fumantes apresentaram frequência variando entre zero e dois, enquanto em 87% dos fumantes variou entre um e três. Quanto às alterações nucleares: brotos nucleares, núcleos interligados e células binucleadas, observamos que a variação de presença nas células foi de 72% entre os não-fumantes para 96% entre os fumantes, sendo que o percentual de variação de frequência foi de zero e dois entre 96% de não-fumantes para um e três entre 87% dos fumantes. A análise estatística revelou associação significativa entre o hábito de fumar e a presença de micronúcleos e outras

alterações nucleares, demonstrando a importância desse teste como indicador da instabilidade genômica.

Descritores: núcleo, micronúcleo, mutagênese, tabagismo, mucosa, genotóxico.

Rev. Fac. Ciênc. Med. Sorocaba, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003

INTRODUÇÃO

A instabilidade genômica é caracterizada pelo aumento considerado da frequência de alterações no material genético das células. A perda da estabilidade é um dos mais importantes aspectos da mutagênese e de transformações genéticas associadas com a carcinogênese (Morgan *et al.*, 1996).

Uma das vias para se detectar a instabilidade genômica é a quantificação da frequência de alterações cromossômicas induzidas por agentes mutagênicos (Lohman *et al.*, 1996).

É atualmente aceitável que danos ao DNA causados por agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos são os principais responsáveis pelo descontrole genético do ciclo celular e, conseqüentemente, pelas alterações cromossômicas.

Estudos demonstram que várias pessoas são geneticamente sensíveis a agentes genotóxicos tais como: radiações, drogas e vírus. Pois, uma vez presentes no meio, podem resultar em dano ao DNA genômico, levando aos mais diversos tipos de alterações nucleares como, por exemplo, a micronucleação (Odagiri *et al.*, 1997).

1 - Acadêmica do curso de Biologia - CCMB/PUC-SP.

2 - Professor Titular do Depto. de Morfologia e Patologia - CCMB/PUC-SP.

Os micronúcleos são estruturas constituídas por material genético cromatínico contido por um envoltório nuclear, menores que o núcleo principal, e resultam de fragmentos cromossômicos que se comportam independentemente dos outros cromossomos do cariótipo durante a divisão celular (Heddle *et al.*, 1990). Eles aparecem ao redor do envoltório nuclear ou no citoplasma de células expostas a agentes genotóxicos e podem ser detectados em células esfoliativas dos epitélios e utilizados como importante parâmetro para análise e avaliação do potencial desses agentes (Conforth, 1991). Portanto, a determinação da taxa de micronucleação, mediante análise microscópica, tem proporcionado uma forma simples e rápida na estimativa da presença de alterações cromossômicas nas células.

Pesquisas recentes têm demonstrado que indivíduos expostos aos mutagênicos podem apresentar com o passar do tempo, alterações cromossômicas em seu genoma e, por isso, merecem especial atenção.

Stich *et al.*, 1982, utilizaram o teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal de fumantes, demonstrando aumento na frequência de micronúcleos com consequência de danos induzidos por agentes potencialmente genotóxicos nas células da camada basal que se encontram em constante divisão nos epitélios esfoliativos.

Segundo pesquisa de Stich *et al.*, 1983, várias são as vantagens do teste do micronúcleo em células dos epitélios esfoliativos, dentre elas destacamos:

- refletir alterações citogenéticas que ocorreram na população de células em constante divisão na camada basal;
- monitorar pessoas com alto risco de desenvolver câncer como fumante e alcoólatras;
- método não invasivo e de preparação simples, o que permite pesquisa em nível epidemiológico;
- resultados compatíveis com os obtidos em técnicas mais sofisticadas como, por exemplo, cultura *in vitro* de linfócitos.

Segundo Hsu, 1987, células expostas a agentes genotóxicos e que apresentam lesões no DNA, aumento na frequência de micronúcleos e que resistem ao processo da apoptose, podem dar origem a neoplasias malignas, enfatizando a importância da frequência e distribuição dos micronúcleos no

biomonitoramento da instabilidade genômica.

Mais recentemente, Bugarin *et al.*, 1998, verificaram que células de indivíduos fumantes sempre apresentavam uma maior frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em relação ao grupo controle, enfatizando, assim, a necessidade de se utilizar o teste do micronúcleo na avaliação periódica dos fumantes, pois o hábito do tabagismo, muitas vezes, pode resultar em neoplasias malignas.

OBJETIVO

Considerando que os estudos relatados em nossa revisão bibliográfica demonstram a importância do teste do micronúcleo no biomonitoramento de indivíduos expostos aos mutagênicos, muitos dos quais responsáveis pela carcinogênese, a presente pesquisa tem como finalidade determinar a frequência de micronúcleos e de outras alterações nucleares em células da mucosa bucal em suspensão salivar de alunos não-fumantes e fumantes do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Médicas e Biológicas da PUC-SP em Sorocaba.

CASUÍSTICA E MÉTODO

A amostragem da nossa pesquisa foi obtida de 48 alunos na faixa etária de 20 a 24 anos, do curso de Ciências Biológicas, os quais foram escolhidos aleatoriamente e divididos em dois subgrupos: controle e exposto. O grupo controle foi constituído por 25 alunos não-fumantes e o grupo exposto por 23 alunos fumantes. Cada estudante respondeu a um questionário que incluiu questões sobre identificação, hábitos, vícios, uso de medicamentos e exposição a agentes genotóxicos.

PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS E CONTAGEM DOS MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES

A coleta foi realizada mediante prévia assepsia bucal e as células da mucosa foram obtidas a partir de uma pequena quantidade de saliva (aproximadamente 2 ml), após lavagem com solução salina 0,9% e centrifugação a 1.500 rpm durante dez minutos. O sedimento obtido foi fixado em ácido

acético e etanol 1:3, lavando-se três vezes com a solução fixadora e permanecendo nesta durante 24 horas. Após, o material fixado foi gotejado em lâminas previamente geladas. Em seguida, as lâminas foram submetidas à hidrólise em HCl 5N por trinta minutos, lavadas em água corrente, secas e coradas pela reação de Feulgen - durante uma hora e trinta minutos - e contracoradas pelo Fast Green durante um minuto (Santelli, 1994).

A determinação da frequência dos micronúcleos e de outras alterações nucleares foi realizada através da contagem de 1.000 células por lâmina, mediante objetiva de imersão em microscópio óptico comum Nikon, modelo E 800, segundo os seguintes critérios:

- a) tamanho menor que 1/3 do núcleo,
- b) mesmo plano de foco do núcleo,
- c) padrão da estrutura e coloração da cromatina idênticos ao núcleo e
- d) nenhuma ligação com o núcleo.

As imagens foram gravadas no microscópio Nikon, modelo E 800 com auxílio do programa

Image Pro-Lite.

MÉTODO ESTATÍSTICO

Na análise estatística do porcentual de presença e de frequência da distribuição de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal dos alunos não-fumantes e fumantes, aplicou-se o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer para as tabelas de associação (Siegel, 1989). Em todos os testes fixou-se o nível de significância em 0,05 ou 5%.

RESULTADOS

Inicialmente, os grupos de alunos não-fumantes e fumantes de nossa casuística foram comparados quanto ao porcentual de presença de micronúcleos e de outras alterações nucleares em células esfoliativas da mucosa bucal coradas pelo método de Feulgen (Figuras 1, 2, 3 e 4).



Figura 1. Micronúcleo em célula da mucosa bucal corada por Feulgen (1.000 X).



Figura 2. Brotos nucleares em célula da mucosa bucal corada por Feulgen (1.000 X).



Figura 3. Núcleos interligados em célula da mucosa bucal corada por Feulgen (1.000 X).



Figura 4. Célula da mucosa bucal binucleada corada por Feulgen (1.000 X).

Os resultados encontrados quanto à variação do percentual de presença de micronúcleos e de outras alterações nucleares nas células da mucosa

bucal dos grupos de alunos não-fumantes e fumantes estão representados nas tabelas 1 e 2.

Grupos	Micronúcleo		Total	% de Presença
	Presença	Ausência		
Não-fumantes	11	14	25	44,0
Fumantes	21	2	23	91,3
Total	32	16	48	66,7

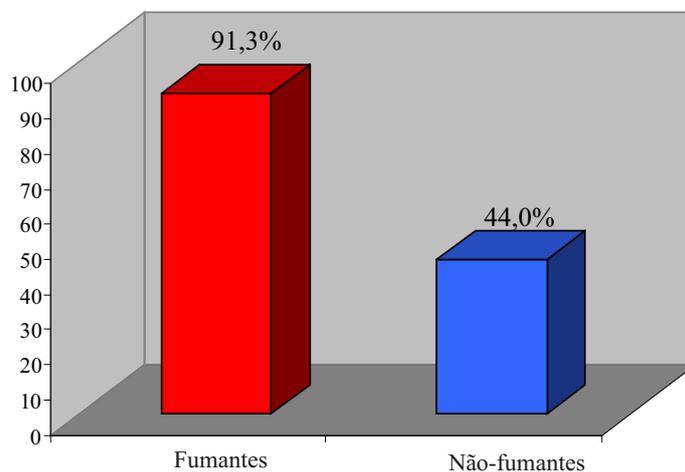
Tabela 1. % de presença de micronúcleos nos grupos não-fumantes e fumantes.

Grupos	Alterações Nucleares		Total	% de Presença
	Presença	Ausência		
Não-fumantes	18	7	25	72,0
Fumantes	22	1	23	95,6
Total	40	8	48	83,3

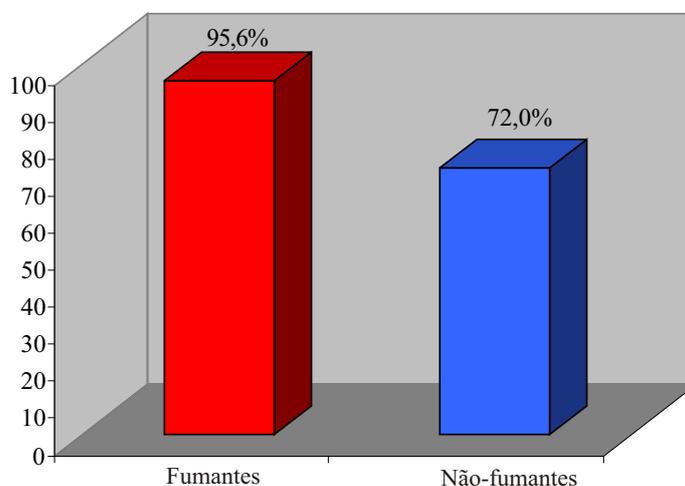
Tabela 2. % de presença de outras alterações nucleares nos grupos não-fumantes e fumantes.

Obs: χ^2 calculado = 12,06 (p < 0,01 ou 1%).

Obs: χ^2 calculado = 0,032166 (p < 0,01 ou 1%).



PRESENÇA DE MICRONÚCLEOS POR 1.000 CÉLULAS



PRESENÇA DE OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES POR 1.000 CÉLULAS

Quanto à variação do percentual de frequência de micronúcleos e de outras alterações nucleares nas células da mucosa bucal dos grupos

de alunos não-fumantes e fumantes, os resultados obtidos estão representados nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

ALUNO	IDADE	SEXO M/F	FREQÜÊNCIA DE MICRONÚCLEO	OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES
1	22	M	1	2
2	22	M	1	1
3	22	M	0	1
4	24	F	0	2
5	21	M	1	0
6	24	M	0	0
7	22	F	0	2
8	22	M	2	1
9	21	F	1	1
10	21	M	0	1
11	21	M	0	2
12	21	F	0	2
13	22	F	1	0
14	22	F	1	0
15	22	F	2	0
16	23	F	0	1
17	22	F	0	1
18	22	F	0	3
19	21	F	1	1
20	21	M	0	1
21	22	F	0	2
22	22	F	1	1
23	22	M	0	1
24	21	M	0	0
25	21	F	1	0

Tabela 3. Frequência de micronúcleos e de outras alterações nucleares no grupo não-fumantes.

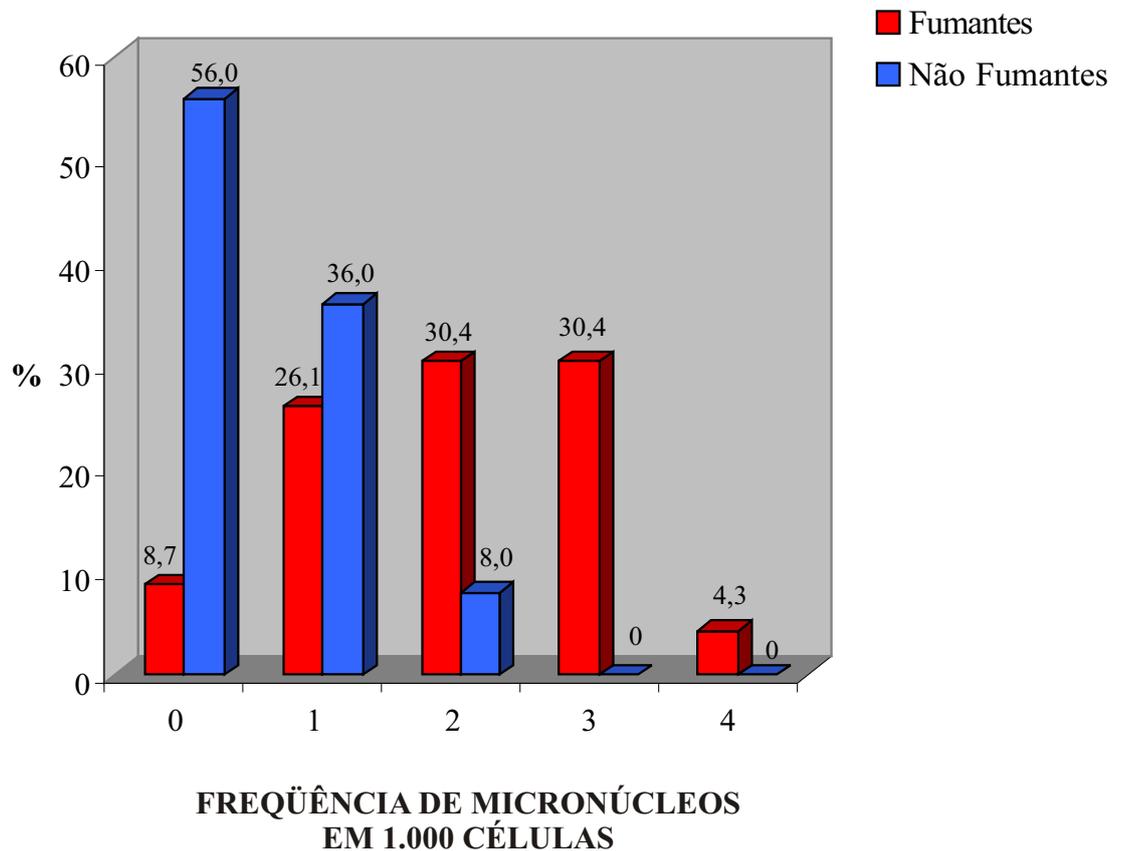
ALUNO	IDADE	SEXO M/F	CONSUMO DE CIGARROS		FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEO	OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES
			NºDIA	DURAÇÃO/ANOS		
1	20	M	6	7	0	1
2	23	M	20	5	2	1
3	24	F	15	9	3	0
4	24	F	10	7	2	2
5	23	F	7	7	2	2
6	23	F	12	6	1	4
7	21	F	25	4	3	1
8	21	F	5	6	3	1
9	21	M	13	6	2	3
10	21	F	6	5	3	3
11	22	M	20	6	1	3
12	22	F	20	6	2	2
13	22	F	7	3	1	2
14	22	F	18	7	3	1
15	22	F	12	7	4	3
16	25	M	8	2	0	3
17	22	M	32	6	3	4
18	22	F	21	9	3	2
19	21	F	33	7	2	2
20	22	F	21	8	2	1
21	22	M	20	7	1	1
22	21	F	18	7	1	2
23	21	F	20	5	1	2

Tabela 4. Frequência de micronúcleos e de outras alterações nucleares no grupo fumantes.

FREQÜÊNCIA DE MICRÓNÚCLEOS	NÃO-FUMANTES		FUMANTES	
	PRESENÇA	% PRESENÇA	PRESENÇA	% PRESENÇA
0	14	56,0	2	8,7
1	9	36,0	6	26,1
2	2	8,0	7	30,4
3	0	0,0	7	30,4
4	0	0,0	1	4,3
Total	25	100,0	23	100,0

Tabela 5. % de freqüência de micronúcleos nos grupos não-fumantes e fumantes.

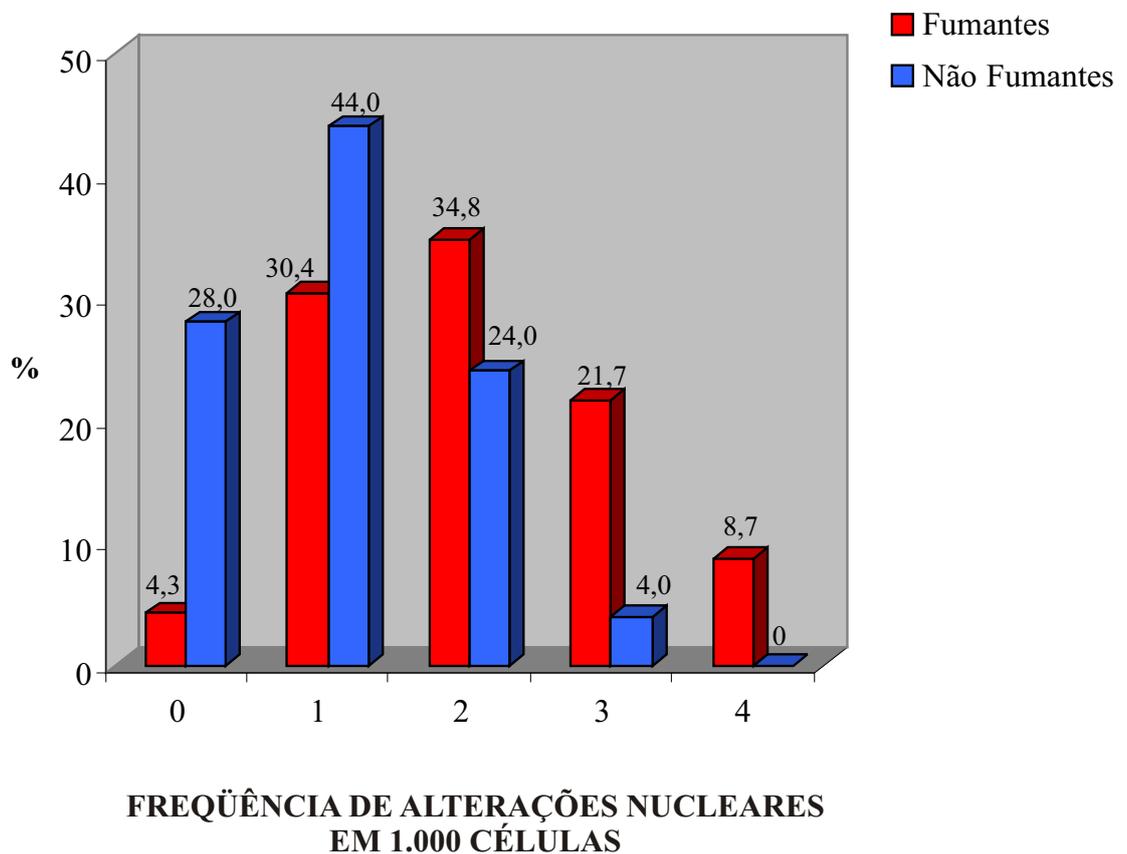
Obs: χ calculado = 20,33 (p < 0,01 ou 1%).



FREQÜÊNCIA DE ALTERAÇÕES NUCLEARES	NÃO-FUMANTES		FUMANTES	
	PRESENÇA	% PRESENÇA	PRESENÇA	% PRESENÇA
0	7	28,0	1	4,3
1	11	44,0	7	30,4
2	6	24,0	8	34,8
3	1	4	5	21,7
4	0	0,0	2	8,7
Total	25	100,0	23	100,0

Tabela 6. % de freqüência de outras alterações nucleares nos grupos não-fumantes e fumantes.

Obs: χ calculado = 9,49 (p = 0,05 ou 5%).



DISCUSSÃO

Atualmente, os pesquisadores da mutagênese buscam com o auxílio da tecnologia, encontrar parâmetros que possam ser utilizados como indicadores do potencial genotóxico de agentes presentes no meio ambiente.

Os mecanismos de formação das alterações nucleares ainda são pouco conhecidos, sendo o micronúcleo o mais estudado e reconhecido internacionalmente. A presença de micronúcleos nas células esfoliativas serve como dosímetro interno, principalmente, na avaliação da extensão em que determinado agente ambiental está associado à instabilidade genômica das células.

O teste do micronúcleo em estudos epidemiológicos pode aumentar o conhecimento a respeito do potencial genotóxico de agentes ambientais e elucidar mecanismos da ação carcinogênica.

Através de criterioso levantamento bibliográfico, observamos que muitos pesquisadores realizaram o teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal mediante coleta por raspagem da superfície e preparação das lâminas pelo método do esfregaço.

Em nossa pesquisa, optamos pela realização do teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal que se encontravam em suspensão salivar nos alunos não-fumantes e fumantes da nossa casuística. Procuramos dessa forma, aumentar o grau de precisão da análise, uma vez que pela inovação metodológica que praticamos, obtivemos uma amostragem mais homogênea de células esfoliadas espontaneamente, pois as células arrancadas através do raspado nem sempre se encontram no mesmo estágio biológico por pertencerem a estratos diferentes do epitélio bucal.

Stich *et al.*, 1982, investigando a importância do teste do micronúcleo na avaliação da exposição de indivíduos aos agentes genotóxicos químicos - álcool etílico e tabaco - nas formas isolada e associada, demonstraram que a frequência de micronúcleos se apresenta maior na forma associada.

Stich *et al.*, 1983, mediante teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes, observaram que a frequência de micronúcleos em indivíduos fumantes se apresentava maior em relação a dos não-fumantes.

Dietz *et al.*, 2000, demonstraram a importância do teste do micronúcleo em relação aos fatores de risco do câncer esofágico, comparando a frequência de micronúcleos entre não-fumantes e fumantes com resultados compatíveis aos de Stich *et al.*, 1983, para mucosa bucal.

Em nossa pesquisa, analisamos a variação do percentual de presença e de frequência de micronúcleos nas células da mucosa bucal dos grupos não-fumantes e fumantes e ao compararmos com os resultados encontrados na literatura, observamos que a variação do percentual de micronúcleos nas células foi de 44% entre os não-fumantes para 91% entre os fumantes (Tabela 1). Quanto ao percentual de variação da frequência, observamos que 100% dos não-fumantes apresentaram frequência variando entre zero e dois micronúcleos, enquanto 87% dos fumantes apresentaram frequência variando entre um e três micronúcleos em 1000 células analisadas por indivíduo (Tabela 5).

Em relação às outras alterações nucleares, considerando o critério de classificação proposto por Tolbert *et al.*, 1992, e as modificações sugeridas por Manelli-Oliveira, 2000, optamos por pesquisar em nossa casuística o percentual de presença e de frequência das seguintes alterações nucleares: brotos nucleares, núcleos interligados e células binucleadas.

Investigando a variação do percentual de presença e de frequência dessas alterações entre os grupos de não-fumantes e fumantes, observamos que a variação do percentual de presença nas células foi de 72% entre os não-fumantes para 96% entre os fumantes (Tabela 2). Quanto ao percentual de variação da frequência dessas alterações observamos que 96% dos não-fumantes apresentaram a frequência variando entre zero e dois, enquanto 87% dos fumantes apresentaram frequência variando entre uma e três alterações nucleares em 1000 células analisadas por indivíduo (Tabela 6).

Considerando a faixa etária dos alunos investigados em nossa casuística podemos deduzir que os nossos resultados são compatíveis com os já publicados na literatura, principalmente os relatados por Stich *et al.*, 1983, Santelli *et al.*, 1994, Dietz *et al.*, 2000 e indicam que o teste do micronúcleo é uma maneira relativamente simples, rápida e de baixo custo na detecção de danos cromossômicos.

CONCLUSÕES

Após o estudo estatístico de nossos resultados com significância de 0,05 ou 5%, podemos concluir que :

- a) existe associação significativa entre o hábito de fumar e a presença de micronúcleos e outras alterações nucleares nas células esfoliativas da mucosa bucal;
- b) as células esfoliativas em suspensão salivar podem ser usadas no teste do micronúcleo ou de outras alterações nucleares, uma vez que os resultados foram compatíveis com os obtidos por outros autores mediante raspagem e esfregaço;
- c) as modificações metodológicas introduzidas na coleta e preparação favoreceram a padronização da amostra, aumentando o número de células por lâmina;
- d) as células da mucosa bucal respondem aos efeitos genotóxicos do tabagismo através do aumento da presença e frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares;
- e) o micronúcleo é um indicador mais sensível aos efeitos do tabagismo nas células da mucosa bucal de fumantes quando comparado às demais alterações nucleares investigadas em nossa pesquisa;
- f) estudos adicionais se fazem necessários uma vez que pesquisadores relatam variação da frequência de micronúcleos em função da faixa etária, sexo e hábito de fumar.

ABSTRACT

The instability genomic is one of the main aspects of the mutagenicity and it is associated with the carcinogenicity.

The micronucleus is chromosomes not altered incorporated to the nucleus in the cellular division and that they present relationship with agents genotoxic, could be detected in the cells exfoliated of the epithelia. With the objective of determining the presence and the micronucleus frequency and other nuclear alterations, the buccal cells exfoliated of the mucous in suspension to salivate of 48 students of the Course of Biological Sciences, in the 20-24 year-old age group, being 25 no-smokers and 23 smokers were analyzed. The cells in suspension to salivate washed in

physiologic solution and fixed in acetic acid and etanol 1:3 for 24 hours, after hydrolysis in HCl for 5N in the temperature sets for 30 minutes they were stained for the reaction of Feulgen, during 1h and half and counterstain for Fast Green, for 1 minute. The obtained results indicated that the variation of the percentile of the micronucleus presence in 1000 cells analyzed by individual, at level of significant 0,05 or 5%, was not of 44% among the no-smokers for 91% among the smokers.

In relation to the percentile of frequency of those micronucleus it observed that 100% of the no-smokers presented frequency varying between 0 and 2, while in 87% of the smokers it varied between 1 and 3. With relationship to nuclear alterations: Broken egg, interlinked nuclei and cells binucleate, observed that the presence variation in to cells it was of 72% among the no-smokers for 96% among the smokers, and the percentile of frequency variation was of 0 and 2 among 96% of no-smokers for 1 and 3 among 87% of the smokers.

The statistical analysis revealed significant association among the habit of smoking and the micronucleus presence and other nuclear alterations, demonstrating the importance of that test as indicator of the instability genomic.

Key-words: nuclei, micronuclei, mutagenicity, tobacco, mucous, genotoxic.

Agradecimentos

Agradecemos ao professor-doutor Neil Ferreira Novo pela orientação no planejamento e análise estatística de nossos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bugarin OT, Casilhas AD, Munoz MPR, Corona JS, Cantu JM, Zuniga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and abnormalities in buccal mucosa Mutat Res 1998;413:277-282.
2. Cornforth MN, Goodwin, GH. Transmission of radiation induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblast. Radiat Res 1991;126:210-7.
3. Dietz J, Diehl AS, Prolha JC, Furtado CD, Furtado AD. Pesquisa de micronúcleos em mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. Rev Assoc Med Bras 2000;46:1-10.
4. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Macgregor

- JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 1990;123:61-118.
5. Hsu TC. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *Dev Biol* 1987;23:591-603.
 6. Lohmann THO, Okazaki K, Madruga MR, Pereira CAB, Gay MNR. Radiosensitivity of blood lymphocytes from basocellular carcinoma patients as detected by micronucleus assay. *Mutat Res* 1996;357:97-106.
 7. Manelli-Oliveira R. Citoesqueleto e alterações nucleares em células tumorais : uma abordagem tridimensional ao microscópio confocal. Dissertação de mestrado 2000. Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas.
 8. Morgan WF, Day JP, Kaplan MI, Mcghee M, Limoli L. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res* 1996;146:247-58.
 9. Odigari Y, Uchida H, Shibazati S. Interindividual variation in cytogenetic response to X-rays and colchicines measured with the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 1997;381:1-13.
 10. Santelli GMM, Cerqueira EN, Oliveira CT, Pereira CAAB. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1994;322:203-8.
 11. Siegel S, Castellan JN Jr. Nonparametric statistics. 2nd ed. New York; McGraw-Hill: 1989. 399p.
 12. Stich H, Curtes J, Parida B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer* 1982;30:553-8.
 13. Stich TICH, H.; SAN, R.; ROSIN, M. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cells. *Mutat Res* 1983;407:93-105.
 14. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992;271:69-77.