

Associação de alterações morfológicas da mucosa bucal com fatores genotóxicos e comportamentais

Association of morphological changes in the oral mucosa with genotoxic and behavioral factors

Asociación de cambios morfológicos en la mucosa oral con factores genotóxicos y conductuales

Recebido: 13/10/2022 | Revisado: 21/10/2022 | Aceitado: 24/10/2022 | Publicado: 29/10/2022

Taiane Nunes Magalhães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2977-4064>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: taianenunesmagalhaes@gmail.com

Nayara Nágila Neves Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1575-2654>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: nayaranagilanevesalves@gmail.com

Rebeka Alves Ramos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4325-8410>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: rebekaalves504@gmail.com

Maria Karoline Sales de Sá

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0643-7057>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: mkaroline.sales@gmail.com

Karen Almeida da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7022-1015>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: karensilva1999@gmail.com

Ana Livia do Nascimento Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1942-2540>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: liviaana617@gmail.com

Yara Raphaela Maia dos Santos Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3850-8139>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: yararaphaella09@gmail.com

Rosimeire Cristina Dalla Martha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6547-5985>
Secretária de Estado de Saúde, Brasil
E-mail: rosidalla@hotmail.com

Elieth Afonso de Mesquita

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6562-5656>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: eliethbio@unir.br

Resumo

Em mucosas saudáveis, as células epiteliais estão fortemente aderidas umas às outras, mas, na presença de alterações inflamatórias ou neoplásicas, perdem a sua força coesiva. Nesse sentido, a citologia esfoliativa possibilita o diagnóstico precoce de lesões epiteliais malignas e pré-malignas, bem como diagnóstico de infecções, inflamações, e demais doenças ocasionadas por genotóxicos. Esse trabalho teve como objetivo identificar alterações morfológicas no epitélio da mucosa bucal fazendo uma correlação com hábitos sociais, como o tabagismo, etilismo e alimentício, em acadêmicos e servidores da Universidade Federal de Rondônia. A pesquisa foi experimental com abordagem quanti-qualitativa a partir de 17 amostras biológicas coletadas da mucosa bucal de voluntários. A técnica de coleta foi a citologia esfoliativa na parte interna das bochechas. As lâminas coradas pela técnica de Papanicolau foram analisadas por microscopia óptica com auxílio de software morfométrico. As informações de comportamentos sociais foram obtidas através da técnica de entrevista semi-estruturada. A técnica para avaliação da correlação entre variáveis quantitativas foi o coeficiente de correlação produto-momento de Pearson. “Verificou-se uma elevada frequência de atipia celular em participantes que possuíam hábitos de tabagismo, etilismo, má alimentação e de medicações constantes”. O hábito de tabagismo demonstrou uma forte relação com o grau elevado de displasia (IV), incluindo nessa classificação os fumantes passivos. Conclui-se que a técnica esfoliativa constitui uma ferramenta aliada às avaliações de alterações morfológicas teciduais e podem identificar precocemente malignidades.

Palavras-chave: Mucosa oral; Neoplasia; Alterações morfológicas; Bioindicadores.

Abstract

In healthy mucous membranes, epithelial cells are strongly adhered to each other, but in the presence of inflammatory or neoplastic changes, they lose their cohesive strength. In this sense, exfoliative cytology allows the early diagnosis of malignant and premalignant epithelial lesions, as well as the diagnosis of infections, inflammations, and other diseases caused by genotoxics. This paper aims to identify morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa, making a correlation with social habits, such as smoking, alcohol consumption and food, in academics and servants of the Universidade Federal de Rondônia. The research was experimental with a quanti-qualitative approach from 17 biological samples collected from the oral mucosa of volunteers. The collection technique was exfoliative cytology on the inner part of the cheeks. The slides stained by the Pap smear technique were analyzed by optical microscopy with the aid of morphometric software. Information on social behaviors was obtained through the semi-structured interview technique. Pearson's product-moment correlation coefficient was the technique for evaluating the correlation between quantitative variables. There was a high frequency of cell atypia in participants who had habits of smoking, alcoholism, poor diet and constant medication. Smoking shows a strong relationship with the high degree of dysplasia (IV), including passive smokers in this classification. It is concluded that the exfoliative technique is a tool combined with the evaluation of morphological changes and can identify malignancies early.

Keywords: Oral mucosa; Neoplasm; Morphological changes; Bioindicators.

Resumen

En las mucosas sanas, las células epiteliales están fuertemente adheridas entre sí, pero en presencia de los cambios inflamatorios o neoplásicos, pierden su fuerza cohesiva. En este sentido, la citología exfoliativa permite el diagnóstico precoz de lesiones epiteliales malignas y premalignas, así como el diagnóstico de infecciones, inflamaciones y otras enfermedades causadas por genotóxicos. Este estudio tuvo como objetivo identificar alteraciones morfológicas en el epitelio de la mucosa oral, haciendo una correlación con los hábitos sociales, como el tabaquismo, el consumo de alcohol y la alimentación, en académicos y servidores de la Universidad Federal de Rondônia. La investigación fue experimental con un enfoque cuantitativo-cualitativo a partir de 17 muestras biológicas recolectadas de la mucosa oral de voluntarios. La técnica de recolección fue citología exfoliativa en la parte interna de las mejillas. Los portaobjetos tallados por la técnica de Papnicolau fueron analizados por microscopía óptica con la ayuda de software morfométrico. La información sobre los comportamientos sociales se obtuvo a través de la técnica de la entrevista semiestructurada. El coeficiente de correlación producto-momento de Pearson fue la técnica para evaluar la correlación entre variables cuantitativas. Hubo una alta frecuencia de atipia celular en participantes que tenían hábitos de tabaquismo, alcoholismo, mala alimentación y medicación constante. El tabaquismo mostró una fuerte relación con el alto grado de displasia (IV), incluyendo a los fumadores pasivos en esta clasificación. Se concluye que la técnica exfoliativa es una herramienta combinada con la evaluación de cambios morfológicos y puede identificar neoplasias malignas de manera temprana.

Palabras clave: Mucosa oral; Neoplasia; Cambios morfológicos; Bioindicadores.

1. Introdução

A qualidade de vida está intrinsecamente relacionada às ações e hábitos executados no dia a dia quase que automaticamente, sejam eles bons ou ruins. Apesar de informações disponibilizadas e acessíveis, muitas pessoas mantêm comportamentos que são declaradamente prejudiciais à saúde. Segundo o Instituto Nacional de Câncer/INCA (2021), o consumo do tabaco que mata mais de 8 milhões de pessoas por ano, sendo que mais de 7 milhões dessas mortes resultam do uso direto desse produto e 1,2 milhão de mortes é o resultado de não fumantes expostos ao fumo.

Mesmo sem a percepção, ocorre exposição diária a diversos agentes genotóxicos, essas substâncias têm um potencial de afinidade para interagir com o DNA, causando mutações, induzindo modificações na sequência nucleotídica ou da estrutura em dupla hélice do DNA de um organismo vivo, que pode contribuir para o desenvolvimento de tumores (Araújo & Borin, 2012). O estudo citológico contribui na identificação de alterações celulares que indicam potenciais mutações nas células. A partir do conhecimento morfológico normal de uma célula e do tecido que esta constitui, desenvolveu-se a técnica de citologia esfoliativa (CE), método diagnóstico de doenças por observação morfológica em microscopia de luz das células obtidas por meio de esfregaços ou aspirações (Spieler & Matthias Rössle, 2012).

Os componentes nucleares importantes para a análise são a densidade e padrão de distribuição da cromatina, o padrão de coloração (hiponormo ou hiper cromasia) e o tamanho, formato e quantidade de nucléolos (Yang, 2014). Vale salientar que a cromatina de uma célula epitelial escamosa fisiologicamente se apresenta, comumente, distribuída homoganeamente e sem sinais

de hiperchromasia. Em estados de divisão celular exacerbada (inflamação, por exemplo) ou descontrolada (neoplasias) os nucléolos podem ser múltiplos e, comumente, bastante evidentes. Enquanto, na hiperchromasia nuclear, o aumento da intensidade de coloração do núcleo é decorrente de um aumento aparente da quantidade de cromatina, que também é indicativo de maior atividade celular (Yang, 2014).

O citoplasma, por sua vez, diante de processos reativos (fisiológicos ou não) pode mostrar várias alterações morfológicas, incluindo vacuolização, maior granulosidade e extensões (projeções) citoplasmáticas. Em células saudáveis, o citoplasma aparenta ter pouca opacidade (passível de passagem de luz), organelas pouco evidentes e homogeneidade (Mehrotra, 2013).

As células do epitélio da mucosa bucal podem apresentar diversas alterações morfológicas em virtude de uma série de condições não neoplásicas como, por exemplo, na presença de doenças infecciosas, inflamatórias, reparativas, dentre outras. É imprescindível a correlação desses achados citológicos com a descrição clínica da amostra para descartar hipóteses de doenças malignas e pré-malignas e realizar, com segurança, o diagnóstico correto de cada amostra (Mehrotra, 2013).

A detecção precoce de qualquer tipo de atipia celular é de extrema importância para o aumento dos índices de sobrevivência, pois essas anormalidades podem ser bioindicadoras de instabilidade genômica. Ao detectar alterações no material genético precocemente é possível prolongar os anos de vida da pessoa acometida com esse male, embora o câncer não tenha uma causa única que possa ser tratada especificamente, reduzindo os diversos fatores de riscos externos, facilita-se a sua prevenção (INCA, 2018).

Esse trabalho teve como objetivo identificar alterações morfológicas no epitélio da mucosa bucal, fazendo uma correlação com hábitos sociais, como o tabagismo, etilismo e alimentício, em acadêmicos e servidores da Universidade Federal de Rondônia. A utilização de células epiteliais da mucosa oral como bioindicadores de alterações mutagênicas, citotóxicas e genotóxicas se dá pelo fato de ser a primeira barreira física quando expostos a fatores de riscos, seja por meio de inalação ou ingestão, devido à capacidade de metabolizar esses agentes. A análise dessas células é de fundamental importância para a detecção e precaução de futuros problemas, como a neoplasia (Tomaz et al., 2017).

2. Metodologia

Trata-se de um estudo de abordagem quanti-qualitativa. Pesquisa explicativa, a qual preocupou-se em identificar os fatores que determinaram ou que contribuíram para a ocorrência dos fenômenos (Speit et al., 2007), portanto o método utilizado foi o experimental, que possibilitou a manipulação e o controle das variáveis, no intuito de identificar qual a variável independente que determinou a causa da variável dependente, ou o fenômeno em estudo.

O presente estudo foi inicialmente submetido à aprovação da Universidade Federal de Rondônia - Campus Porto Velho, do núcleo de saúde (NUSAU) sob número: 3.967.094, no Município de Porto Velho/RO, para que pudesse ser realizado com acadêmicos e servidores da Universidade Federal de Rondônia/UNIR, Campus Universitário situado na BR-364, Km 9,5 sentido Acre, em Porto Velho- RO. As amostras coletadas foram processadas no Laboratório de Histoanálise (LABHIS), localizado no CIBEBI - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia da UNIR.

Foram convidadas 17 pessoas para participarem do estudo. Os quais foram informados sobre os objetivos e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os fatores de inclusão na pesquisa: serem maiores de 18 anos, acadêmicos ou servidores da Universidade Federal de Rondônia, não estar com anemia ou imunodeprimidos, não ser indígena ou vulnerável; o fator de exclusão estava relacionado com pessoas que possuíam doenças graves previamente diagnosticadas, as que tomavam remédios controlados e menores de idade. Dentre o N amostral (17) um voluntário era o controle positivo da

pesquisa, possuindo hábitos de tabagismo, etilismo e má alimentação; já o controle negativo da pesquisa não fumava, não bebia e se alimentava predominantemente de forma saudável.

A coleta foi realizada de forma não invasiva, com mínimo risco de desconforto. Parte do N amostral foi realizado anteriormente à pandemia do SARS-CoV-2 e outra metade se deu após o período de retorno às atividades remotas da Universidade. Para a coleta foram utilizados materiais estéreis, desembalado na presença do voluntário e EPIs que resguardavam a saúde do coletador. A espátula utilizada foi friccionada suavemente na mucosa das bochechas e foi imediatamente realizada uma lâmina histológica para análise microscópica.

Os dados com relação às enfermidades bucais foram coletados através da técnica de entrevista. Para tal, foi elaborado um formulário estruturado, contendo questões que exploraram dados com relação à saúde do acadêmico, de forma que, os discentes que aceitaram participar da pesquisa pudessem evidenciar fatores de riscos ou excluí-los. O questionário foi adicionado a plataforma *google* onde foi possível ser enviado para os participantes por meio de um *link*, para que respondessem.

Anamnese

A anamnese foi realizada por meio da técnica de entrevista, sendo um tipo de comunicação existente entre o pesquisador que pretende colher informações sobre fenômenos e indivíduos que detenham essas informações e possam transmiti-las.

O questionário foi elaborado na plataforma do *google*, conhecida como *google forms*. Trata-se de um questionário de avaliação da qualidade de vida e da saúde, que se subdividia em duas categorias: dados pessoais, onde foram perguntados sobre faixa etária, gênero e etnia; e informações de saúde tais como se fazia ou não uso de alguma medicação constante (ex: contraceptivos, remédios para pressão, alergias, entre outros), se possuíam conhecimento de algum caso de câncer na família, se considerava sua alimentação saudável, se faziam consumo de álcool, sim ou não, e se a resposta fosse, sim, qual era a frequência desse consumo, da mesma forma foram questionados quanto ao fumo se consumiam ou não e se a resposta fosse sim qual era a frequência e qual a quantidade.

Se viu necessário também o questionamento sobre se eram ou já haviam sido fumantes passivos, pois, a exposição a agentes genotóxicos é tão grave quanto a ser um fumante direto, e também foram questionados quanto ao uso de entorpecentes, se faziam uso sim ou não e se sim com qual frequência.

Método de coleta e coloração

Para coleta do material foi solicitado um jejum de pelo menos 1h; foi orientado o enxágue bucal para remoção de possíveis resquícios de alimentos que poderiam ter permanecido na cavidade oral. Uma amostra de células epiteliais foi obtida da mucosa das bochechas, utilizando a técnica de citologia esfoliativa (CE).

Técnica de citologia esfoliativa (CE): A coleta do material foi realizada através de uma espátula de madeira de 1,5 cm de largura, friccionada nas laterais internas da bochecha; houve a transferência direta das células aderidas para uma lâmina de vidro por meio de um esfregaço; as células dispostas sobre a lâmina de vidro foram imediatamente fixadas em álcool 95% e posteriormente coradas pelo kit panótico rápido (eosina e hematoxilina). Secagem a temperatura ambiente (TA) para análise morfológica em microscopia ótica.

Identificação e análise das amostras

As lâminas foram devidamente identificadas antes de cada coleta com iniciais que indicam a ordem de coleta e o gênero: Amostra (A) / Homem (H) ou mulher (M), esse método foi adotado para que se cumprisse o estabelecido pelo conselho de ética sobre a confidencialidade do indivíduo voluntário.

Todo o material coletado foi analisado microscopicamente em objetiva de 40x, cada lâmina foi examinada completamente, até contabilizar 200 células por lâmina, para obtenção de percentual de células normais e células com alterações morfológicas, possibilitando as amostras serem classificadas dentro dos critérios do sistema clássico (quadro 1), desenvolvido por Papanicolau e Traut (1941) e adaptado por Folsom et al., (1972); Dolens et al, (2012).

Quadro 1 - Sistema de classificação de grau de displasia.

Classificação	Características
Classe I	Ausência de células anormais na amostra
Classe II	Células com alterações sugestivas de inflamação ou infecção
Classe III	Presença de células anormais sugestivas de malignidade
Classe IV	Células com característica fortemente sugestiva de malignidade
Classe V	Exame citológico conclusivo de malignidade

Fonte: Brasil & Instituto Nacional de Câncer (2012).

Teste de micronúcleo: Para a análise mutagênica das células da mucosa foram examinados os micronúcleos em magnificação de 400x no microscópio, sendo avaliado um total de 200 células por amostra. A classificação de um micronúcleo é dada através da observação das estruturas que apresentam as seguintes considerações ter de 5 a 30% do diâmetro do núcleo principal, estar no mesmo plano laminar, apresentar cor e textura semelhantes ao núcleo, possuir morfologia ovalada ou arredondada e estar claramente separado do núcleo principal (Barbon et al., 2014).

Também foi realizada uma análise da morfometria da célula (núcleo e micronúcleos), utilizando o tratamento e reconhecimento de imagens por reconhecimentos de padrões. Uma imagem, matematicamente, pode ser descrita por uma função bidimensional de intensidade de luz $f(x,y)$. O padrão, em análise de imagens, refere-se a qualquer componente que possa ser determinado quantitativamente, mesmo que sujeito a variantes. O reconhecimento foi realizado por diferenciação e/ou por classificação.

A análise de morfometria se deu a partir das lâminas focalizadas em objetiva de 40x, a qual foi adaptado a sistema fotomicrográfico, onde foram obtidas fotomicrografias em formato JPG, transferidas para o computador e capturadas com o auxílio de um software analisador de imagens (Image J) onde foram identificados e mensurados os diâmetros da área citoplasmática e do núcleo e de micronúcleos, quando observados, para gerar um diâmetro médio geral, média de valores associado a intensidade luminosa e o desvio padrão.

Os parâmetros de atipias celulares utilizados para análise e prognóstico estão descritos em (Valente et al., 2017). Para classificação de grau de displasia foi utilizado os critérios do sistema clássico, desenvolvido por (Papanicolau & Traut, 1941) e adaptado por (Folsom et al., 1972; Dolens et al, 2012).

Análise estatística

O coeficiente de correlação de Pearson é um teste que mede a relação estatística entre duas variáveis contínuas. Se a associação entre os elementos não for linear, o coeficiente não será representado adequadamente.

O coeficiente de correlação de Pearson pode ter um intervalo de valores de +1 a -1. Um valor de 0 indica que não há associação entre as duas variáveis. Um valor maior que 0 indica haver associação positiva. Isto é, à medida que o valor de uma variável aumenta, o mesmo acontece com o valor da outra variável. Um valor menor que 0 indica uma associação negativa. Isto é, à medida que o valor de uma variável aumenta, o valor da outra diminui (Miot, 2018).

3. Resultados

Características dos voluntários

Os resultados obtidos foram apresentados conforme as avaliações qualitativas e quantitativas demonstradas na tabela abaixo. Participaram do estudo 17 pessoas que podem ser caracterizadas em faixa etária (18-29; 30-39; 40-49 e 50-59) e gênero masculino (M) e feminino (F). Dentre os voluntários masculinos (6) 50% estavam entre a faixa etária mais jovem e em femininos (11) 54,5% também estavam na faixa etária mais jovens, fator que vem de encontro à idade acadêmica da maioria que estuda em cursos diurnos.

O maior número de mulheres na presente pesquisa deve-se ao fato do índice elevado de acadêmicas quando comparado com acadêmicos, as cadeiras nas universidades vêm sendo ocupadas em maior porcentagem por mulheres segundo censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE (2018).

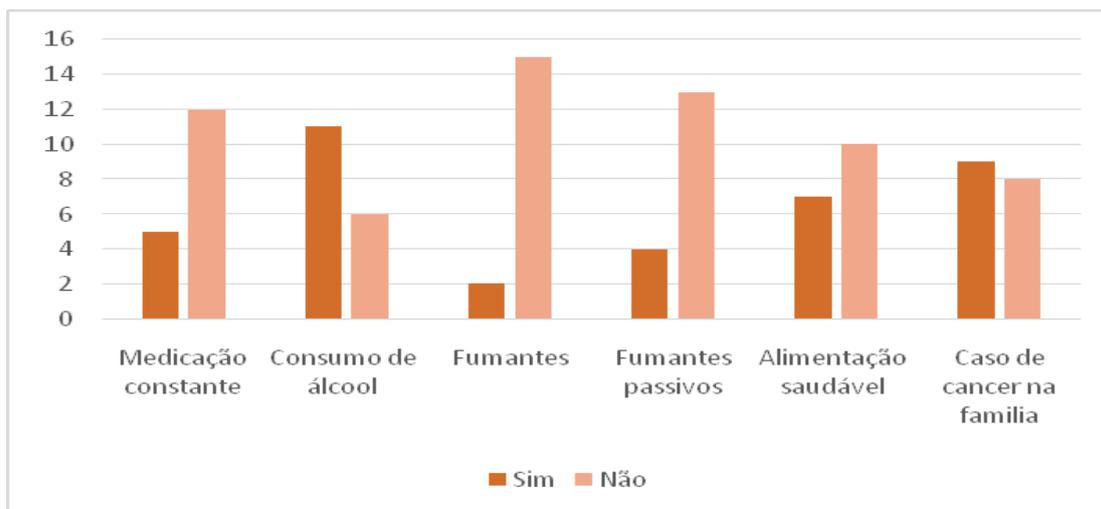
Tabela 1 - Coleta de dados pessoais realizada através da aplicação de questionários.

Características	M (n=6)	F (n=11)
Faixa etária 18 a 29	3	6
Faixa etária 30 a 39	1	4
Faixa etária 40 a 49	2	0
Faixa etária 50 a 59	0	1

Fonte: Autores.

A anamnese permitiu catalogar informações sobre comportamentos sociais, como: tabagistas e não tabagistas, fumantes passivos, etilista ou não, os que faziam uso ou não de medicação constante, os que se alimentavam de forma não saudável, e os que possuíam conhecimento de algum tipo de câncer na família, todos os dados foram computados e se apresentam no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Variáveis analisadas correlacionadas com respostas fornecidas pelos participantes através de anamnese.



Fonte: Autores.

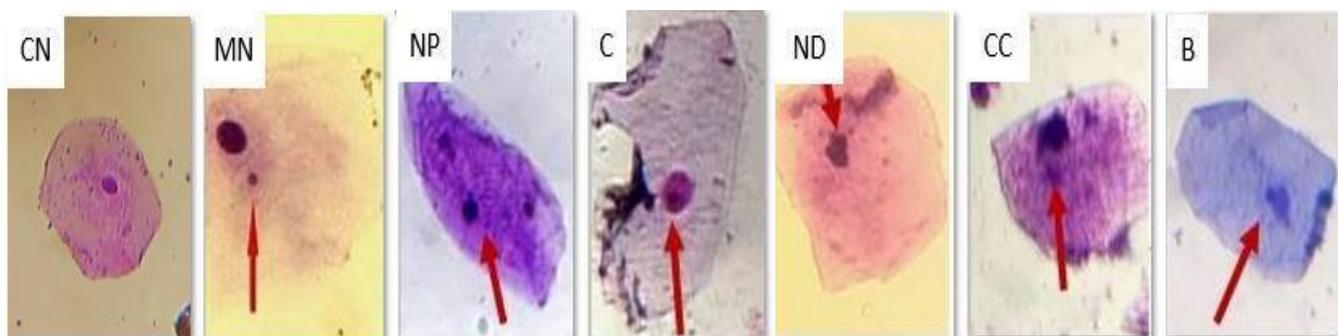
Dentre as pessoas que responderam que consumiam bebida alcoólica, 60% declararam consumir apenas nos finais de semana e 40% apenas em reuniões sociais. Com relação ao fumo, os que declaram consumi-lo afirmam fazer uso diário do cigarro, consumindo em média 6 unidades por dia. Dentre os participantes, 29% usam medicação constante. O índice de

correlação usado para relacionar os dados dos participantes com as atipias celulares encontradas foi o método de Pearson, utilizado para correlacionar os hábitos de vida e informações quanto a saúde dos voluntários no tópico (3.5).

Alterações morfológicas – análise qualitativa

A atipia celular citopatológica pode ser caracterizada pelo aumento do tamanho do núcleo, presença de bordas irregulares, micro nucleação, brotamento nuclear, células binucleadas e/ou picnóticas, comparadas às células normais (Figura 1).

Figura 1 - Fotomicrografias dos critérios de multiplicação celular observadas no aumento de 400x no microscópio óptico, lâminas coradas com (HE).



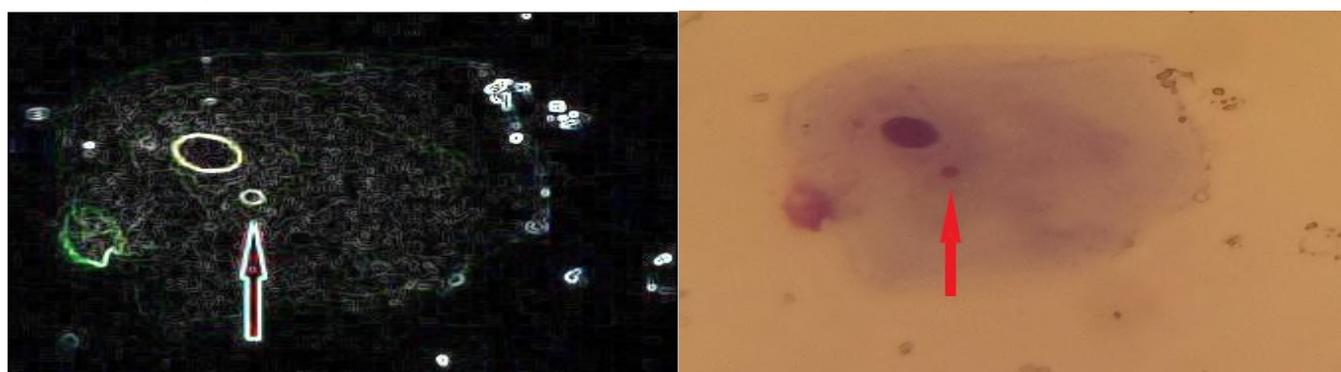
Legenda: Células Normais (CN), Micronucleação (MN), Núcleo Picnótico (NP), Cariorrexe (C), Núcleo Deformado (ND), Cromatina Condensada (CC), Brotamento (B). Fonte: Autores.

Cada processo diferenciado de proliferação tem um indicador diferente. Prognóstico de genotoxicidade são células que apresentam micro nucleação (MN) e/ ou brotamento (B); células com cariorrexe (C) e cromatina condensada (CC) indicam apoptose celular; núcleos picnóticos (NP) sugerem necrose, comparadas às células normais, (CN) (Tomaz et al., 2016).

Teste de micronúcleo

Já com base na análise de morfometria realizada através do *software Image J* foi possível detectar o percentual de variação de área entre núcleos e micronúcleos. Sendo estes detectados por destaque de borda, recurso do *software* que distinguiu o núcleo de micronúcleo como visto na figura abaixo.

Figura 2 - Captura de imagem de célula *software Image J*, com tratamento de imagem *FindEdgs* (encontrar bordas) e sem o tratamento de imagem.



Fonte: Acervo pessoal.

Alterações morfológicas – quantitativas

Foi realizada uma investigação quantitativa e qualitativa dos resultados morfológicos. Onde observaram-se parâmetros celulares descritos por Valente et al. (2017), tais parâmetros foram reconhecidos, contabilizados e demonstrados. Liderando as atipias celulares encontra-se a micro nucleação e brotamento. Sendo observado uma elevada micro nucleação (MN) na amostra AH2, AH1 e AM1, com 21,1%, 17% e 12% respectivamente.

Tabela 2 - Análise quanti-qualitativa dos prognósticos de genotoxicidade.

AMOSTRA	MN	B	C	CC	NP	CN
AH1	17%	5%	0%	2%	3%	73%
AH2	21,1%	7,5%	3%	3%	2%	63,31%
AH3	4,5%	0,5%	0%	0%	1%	93,99%
AH4	2,4%	2%	0%	0%	1%	94,6%
AH5	3%	0%	0,5%	0%	0,5%	96%
AH6	0,9%	0%	0%	0%	0,4%	98,7%
AM1	12%	2%	0,9%	1%	2%	82,1%
AM2	2,2%	0%	0%	0%	0%	97,1%
AM3	0%	0,4%	0,2%	0%	0%	99,4%
AM4	0%	3,3%	0,4%	0%	0%	96,3%
AM5	0%	0%	0%	0,8%	0%	99,2%
AM6	0,6%	0%	0,1%	0%	0%	99,3%
AM7	7,7%	0%	0%	0%	0%	92,3%
AM8	1,2%	0%	0%	0%	0%	98,7%
AM9	0%	0%	0%	0%	0,2%	99,8%
AM10	0%	2%	0,4%	0%	0%	99,5%
AM11	0,4%	0%	0%	0%	0%	99,6%

Legenda: Micro Nucleação (MN), Brotamento (B), Cariorrexe (C), Cromatina Condensada (CC), Núcleo Picnótico (NP), Células normais (CN). Fonte: Autores.

Os processos de diferenciação celular e de proliferação dessas células têm um indício diferente. A observação de atipias celulares bio indicam prevalência de alterações mutagênicas ou até mesmo de inflamações da mucosa bucal.

Os dados quantitativos foram caracterizados em níveis de comprometimento tecidual classificando o grau de displasia de cada indivíduo por meio do sistema clássico, desenvolvido por Papnicolau e Traut (1941) e adaptado por Folsom et al., (1972); Dolens et al, (2012). Nota-se que 50% das amostras oriundas de homens (AH) possuem células com indicação de inflamação ou infecção (classe II), enquanto 27% das amostras oriundas de mulheres (AM) apresentam essa classificação.

Quadro 2 - Resultado qualitativo das análises dos voluntários masculinos e feminino caracterização do grau de displasia.

AMOSTRAS	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
AH1			X		
AH2				X	
AH3		X			
AH4		X			
AH5		X			
AH6	X				
AM1			X		
AM2	X				
AM3	X				
AM4		X			
AM5	X				
AM6	X				
AM7		X			
AM8	X				
AM9	X				
AM10		X			
AM11	X				

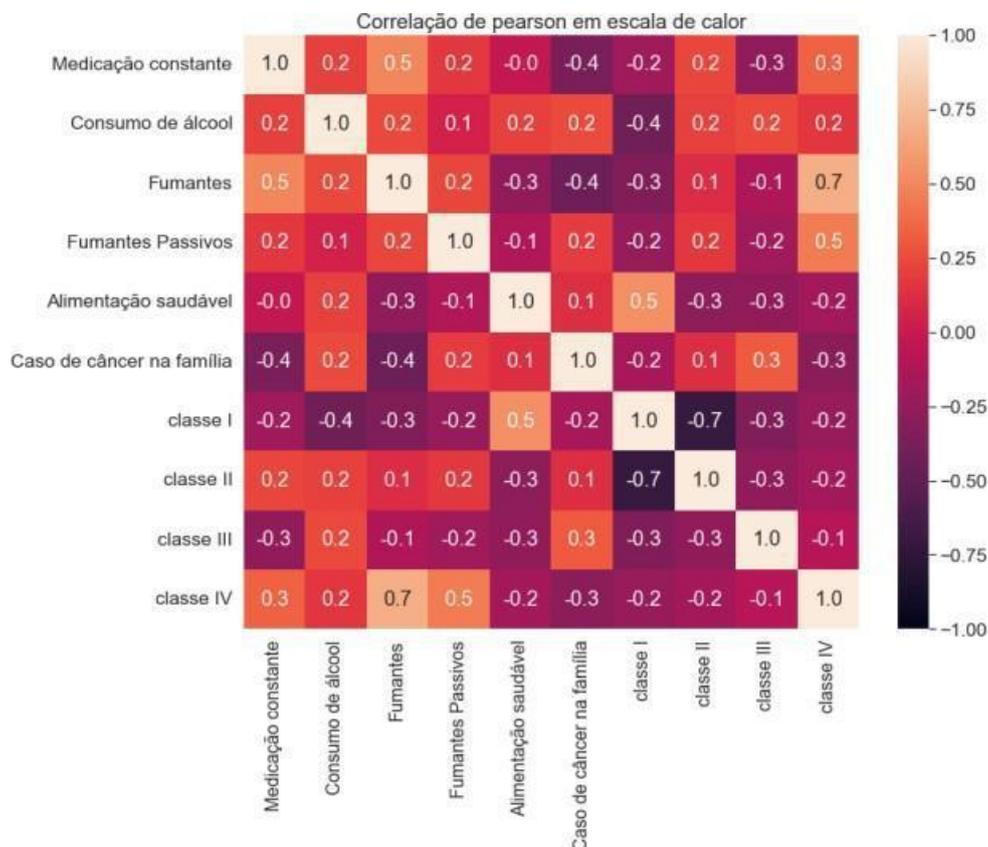
Fonte: Autores.

As análises feitas foram comparadas com os resultados, baseados nos parâmetros celulares, e na anamnese.

Correlação das variáveis (hábitos sociais) com classificação de displasia

As respostas obtidas no formulário *online* foram correlacionadas com a análise morfológica quanti-qualitativa pelo método de Pearson. O método de correlação de Pearson foi utilizado para estabelecer as ligações diretas ou indiretas de ocorrências neoplásicas com o hábito de vida dos participantes da pesquisa.

Figura 3 - Correlação de variantes e grau de displasia pelo método de Pearson em escala de calor.



Fonte: Autores.

O coeficiente de correlação de Pearson indica que, quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis, valores acima de 0,1 possuem uma relação considerável (Miot, 2018). Neste sentido, observa-se uma forte relação do tabagismo (0,7) com células com características fortemente sugestivas de malignidade (classe IV), indicando, ainda, que fumantes passivos (0,5) também estão sujeitos a fatores de risco.

4. Discussão

O consumo de álcool tem sido considerado um dos maiores fatores de risco no processo carcinogênico, pois ocorre uma ação de oxidação do acetaldeído através da enzima desidrogenase alcoólica, então o acetaldeído é transformado em desidrogenase aldeído e a variação genética dessas duas enzimas podem influenciar na capacidade de o álcool ter um potencial na alteração celular (Garcia, 2009).

O álcool e o tabaco atuam como coadjuvantes, aumentando a permeabilidade da mucosa, deixando a camada protetora da cavidade bucal sensível e propensa a agentes teratogênicos. O hábito de fumar e beber, podem aumentar as probabilidades do desenvolvimento de uma neoplasia no sistema digestório, principalmente o câncer bucal, isso porque o álcool ajuda a dissolver as substâncias presentes no cigarro, deixando-as em concentrações elevadas (Leite et al., 2021).

O álcool também pode causar estresse oxidativo ocasionando alterações nos genes, abre portas para agentes carcinogênicos tanto provenientes do ambiente quanto os associados ao tabaco, isso por promover quebra de barreiras na mucosa bucal, desenvolver subnutrição deixando o indivíduo mais suscetível a neoplasias (INCA, 2022).

Estudos recentes mostram que os fármacos disponíveis no mercado são obtidos após um longo processo de fabricação onde sofrem ação catalisadora de moléculas reativas que podem ser genotóxicas ou carcinogênica, e permanecem assim no

insumo farmacêutico ativo, vários compostos químicos já foram catalogados como agentes genotóxicos, e seu uso constante pode acarretar atipia celular pela sua capacidade de reagir com o DNA (Araújo & Borin, 2012). Por essa razão muito se fala sobre recorrer à de medicação apenas com prescrição médica, pois assim o indivíduo trata da sua enfermidade diretamente e com um período certo para fim do tratamento, evitando assim o risco de intoxicação desnecessariamente, mas isso é inviável para pessoas que precisam fazer uso constante de medicação sendo o caso dos voluntários do presente estudo.

No presente estudo as atipias celulares encontradas com mais frequência foram células micronucleadas, e com brotamento nuclear, forte indicadoras de exposição a agentes genotóxicos sendo essa atipia celular amplamente utilizada no biomonitoramento, por ser um teste de baixo custo e rápida análise além do processo ser minimamente invasivo (Uchôa & Magalhães, 2020).

A observação de micronúcleos e brotamento nuclear indicam ação de genotoxicidade. A micro nucleação foi a atipia celular mais frequente nas amostras com 70% de aparição. Acredita-se então que a micro nucleação está intrinsecamente relacionada à sugestão de neoplasia. Então, a associação do tabaco álcool, má alimentação e uso de medicação constante são considerados os principais fatores de risco para alteração celular com forte relevância para malignidade ou genotoxicidade (INCA, 2022).

O índice de probabilidade que o gênero masculino tende a desenvolver neoplasias ou apresentar células mutagênicas no trato digestório é maior que a do gênero feminino, as neoplasias digestivas são mais frequentes em homens, a partir dos 40 anos, e apresentam melhor prognóstico quando diagnosticada e tratada em estágios iniciais (INCA, 2018).

No presente estudo foi observado que os participantes que não consumiam álcool ou consumiam raramente, se alimentavam de forma saudável e não utilizavam medicação constantemente se mantiveram no grau de classe I: ausência de células anormais na amostra.

O estudo mostrou que 35% dos participantes apresentaram algum tipo de inflamação ou infecção, que não tiveram significativa relevância com as variáveis analisadas no presente estudo. Esses participantes ficaram agrupados na classe II que indica uma inflamação ou infecção, classificação essa criada por Papanicolau e Traut (1941) e adaptada por Folsom et al., (1972); Dolens et al., (2012). Dentre os participantes dois (AH1 e AM1) mostraram índice relevante de atipia celular e estavam no grupo de participantes que possuíam alguns dos fatores de risco como casos de câncer na família, consumo de álcool, má alimentação, esses ficaram caracterizados no grau de classe III onde incute células anormais sugestivas de malignidade. O índice do coeficiente de correlação de Pearson apresenta uma associação positiva entre as variáveis citadas acima com valores acima de 0,1 mostrando correlação direta entre as variáveis.

A frequência de células atípicas foi significativamente maior entre fumantes ativos, fumantes passivos, os que não se alimentavam de forma saudável e consumidores frequentes de medicação constante, como pode ser observado no quadro de correlação de Pearson que demonstra correlação direta entre as variáveis com valores acima de 0,3. Assim sendo classificado um dos voluntários, do sexo masculino que estava na faixa etária entre os 40 a 49 anos (AH2), que preenchia todos esses requisitos em classe IV: células com características fortemente sugestivas de malignidade (Folsom et al., 1972) (Papanicolau & Traut, 1941).

A média do tamanho dos micronúcleos analisados no presente trabalho foi de 11% com prevalência em 70% das amostras, todos possuíam cor e textura semelhante aos núcleos das células em que estavam presentes e se encontravam no mesmo plano laminar, dando assim a confirmação de todos os parâmetros para identificação de micronúcleo. A presença de micronúcleos permite a identificação do aumento da frequência de mutações em células expostas a uma quantidade variada de agentes genotóxicos (Uchôa & Magalhães, 2020).

Ao observarmos, os resultados referentes ao grau de displasia e anamnese estão de comum acordo e confirmam a questão levantada que hábitos de fumar, consumir bebidas alcoólicas, possuir uma má alimentação e consumo de produtos com

potencial genotóxicos causam mutação celular com significativa sugestão de malignidade. E esses dados estão fundamentados no coeficiente de correlação de Pearson, onde consideramos a partir de 0,1 um valor relevante que indica uma associação positiva entre as variáveis, onde quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis (Miot, 2018).

5. Conclusão

O tabaco é o agente genotóxico mais indicativo para frequências e diversidades de alterações celulares.

O micronúcleo é um indicador de genotoxicidade, porém diversidades de alterações citogenéticas precisam ser mais associadas, como as células binucleadas, o que pode evitar um diagnóstico difundido.

Os estudos citogenéticos são importantes ferramentas bioindicadoras para diagnóstico precoce de displasias e neoplasias da mucosa oral e distúrbio hormonal.

Referências

- Araujo, A. C. F., & Borin, M. de F. (2012). Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. *Revista Brasília Médica*, 49(4), 267–278. <https://rbm.org.br/details/125/pt-BR/influencia-de-excipientes-farmacuticos-em-reacoes-adversas-a-medicamentos>
- Barbon, F., Wiethölter, P., Burille, A., Casarin, D., Solda, C., Flores, R., Elvira, C., & Sabadin, S. (2014). Micronúcleos em fumantes e etilistas. *J Oral Invest*, 3(2), 42–45. <https://doi.org/10.18256/2238-510X/j.oralinvestigations.v3n1p42-45>
- Leite, R. B., Marinho, A. C. O., Costa, B. L., Laranjeira, M. B. V., Araújo, K. D. T., & Cavalcanti, A. F. M. (2021). The influence of tobacco and alcohol in oral cancer: literature review. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 57. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210001>
- Folsom, T. C., White, C. P., Bromer, L., Canby, H. F., & Garrington, G. E. (1972). Oral exfoliative study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 33(1), 61–74. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(72\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90209-5)
- Instituto Nacional de Câncer (2021). *Tabagismo*. <https://www.inca.gov.br/tabagismo>.
- Instituto Nacional de Câncer (2022). *Bebidas alcoólicas*. <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/prevencao-e-fatores-de-risco/bebidas-alcoolicas>.
- Instituto Nacional de Câncer (2018). *Prevenção e fatores de risco*. <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/prevencao-e-fatores-de-risco>.
- Instituto Nacional de Câncer (2012). *Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais*. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/nomenclatura-brasileira-para-laudos-citopatologicos-cervicais-2012.pdf>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018). *Estatísticas de Gênero Indicadores sociais das mulheres no Brasil*. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101551_informativo.
- Dolens, E. da S., Nakai, F. V. D., Santos Parizi, J. L., & Alborghetti Nai, G. (2012). Cytopathology: A useful technique for diagnosing oral lesions?: A systematic literature review. *Diagnostic Cytopathology*, 41(6), 505–514. <https://doi.org/10.1002/dc.22875>
- Mehrotra, R. (2013). *Oral Cytology - A Concise Guide*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5221-8>
- Miot, H. A. (2018). Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*, 17(4), 275–279. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.174118>
- Spieler, P., & Matthias Rössle. (2012). Nongynecologic Cytopathology. *SpringerLink*. <https://doi.org/10.1007-978-3-642-24719-4>
- Garcia, S. M. N. (2009). Genes De Metabolização Do Álcool E O Risco De Câncer De Cabeça E Pescoço [Master's thesis, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-27102009-204856/publico/DissertacaoSilviaMNG.pdf>
- Papnicolau GN;Traut HF. (2013). The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 121(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9111103/>
- Speit, G., Schmid, O., Fröhler-Keller, M., Lang, I., & Triebig, G. (2007). Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.013>
- Tomaz, B. C. A., Ferri, R. N. da S., & Filho, J. B. (2017). Frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de pacientes anêmicos. *Revista Da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, 18(4), 214–220. <https://doi.org/10.5327/z1984-4840201626811>
- Uchôa, I. S., & Magalhães, M. do A. V. (2020). Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(2), 3851–3857. <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n2-208>.
- Valente, D., Costa-Amaral, I. C., Carvalho, L. V. B. de, Santos, M. V. C. dos, Castro, V. S. de, Rodrigues, D. del R. F., Falco, A. D., Silva, C. B., Nogueira, S. M., Gonçalves, E. S., Moreira, J. C., André, L. C., Teixeira, L. R., Sarcinelli, P. de N., Sisenando, H. A., Oliveira, M. S. de, Perini, J. A., Mattos, R. de C. O. da

C., & Larentis, A. L. (2017). Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>

Yang, G. C. H. (2014, July 4). *Yang GCH Liver. Chaper 29 In: Comprehensive Cytopathology. 4th. Ed. Expert Consult: Online and Print (Eds: ResearchGate; unknown.*
https://www.researchgate.net/publication/269572668_Yang_GCH_Liver_Chaper_29_In_Comprehensive_Cytopathology_4th_Ed_Expert_Consult_Online_and_Print_Eds_Bibbo_M_and_Wilbur_D_Saunders_Philadelphia_pp_726-750_Nov_2014