

## ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO EM CÉLULAS EPITELIAIS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE FUMANTES, EX-FUMANTES E NÃO-FUMANTES

Adriana Martins de Souza<sup>1</sup>, Aline Marques Da Silva<sup>1</sup>, Leandro José Ramos<sup>2</sup>, Renato André Zan<sup>3</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>4</sup>.

### RESUMO

Os micronúcleos ocorrentes na mucosa oral são bioindicadores de alterações mutagênicas provocadas por agentes agressores como o tabaco, sendo eficazes na detecção dessas alterações. O presente estudo objetivou analisar os efeitos mutagênicos em células esfoliadas da mucosa jugal de fumantes e ex-fumantes. Foram avaliadas quarenta pessoas de ambos os sexos com idade variável, sendo divididos em quatro grupos (não fumantes, fumantes >10 anos, fumantes <10 anos e ex-fumantes), a coleta das células foi realizada na parte jugal da mucosa. A contagem das células se deu por um único observador, em teste cego, utilizando microscopia de luz, sendo avaliadas 1000 células por lâmina analisando a presença de micronúcleos. Constatou-se que fumantes >10 anos tem um aumento significativo da frequência de micronúcleos em relação aos grupos de fumantes <10 anos e não fumantes, sendo que esses danos permanecem no grupo de ex-fumantes não havendo uma redução dos danos provocados pelo tabagismo. Os grupos de fumantes >10 anos e ex-fumantes são formados por pessoas com média de idade superior aos grupos de fumantes <10 anos e não fumantes, o que pode ter ocorrido como cofator dos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** tabaco; micronúcleo; mutagenicidade; mucosa oral.

### ANALYSIS OF MUTAGENIC EFFECT IN EXFOLIATED EPITHELIAL CELLS OF THE ORAL MUCOSA OF SMOKERS, FORMER SMOKERS AND NON-SMOKERS

### ABSTRACT

Micronuclei in oral mucosa are biomarkers of mutagenic changes caused by aggressive agents such as tobacco and they are effective in the detection of these alterations. The present study aimed to analyze the mutagenic effects in cells of jugal mucosa of smokers and former smokers. Forty individuals of both sexes and variable ages were separated into four groups (nonsmokers, >10 years smokers, <10 years smokers and former smokers) and evaluated. Cells were collected from jugal mucosa. The cell count was made by a single observer in a blind test, using a light microscopy. 1000 cells per slide were analyzed looking for the presence of micronuclei. It was found that the group of >10 years smokers has a significant increase in the frequency of micronuclei when compared to groups of <10 years smokers and nonsmokers. This damage remains in the group of former smokers with no reduction of the injury caused by smoking. Groups of >10 years smokers and former smokers are composed by people with a mean age higher than <10 years smokers and non-smokers, what may have occurred as a cofactor of the results.

**Keywords:** tobacco; micronucleus; mutagenicity; oral mucosa.

## INTRODUÇÃO

O tabaco é derivado de duas plantas, a *Nicotiana tabacum* e a *Nicotiana rustica* (1), que receberam o nome "nicotina" em 1559, em homenagem ao descritor de suas propriedades medicinais e "prazerosas", Jean Nicot (2).

Inicialmente o tabaco era muito difundido entre os indígenas, sendo empregado em rituais religiosos por meio de cachimbos, aspiração, ingestão e preparação de chás, sendo considerado pelas populações tradicionais como relevante planta medicinal, utilizada para lavagens intestinais, no combate ao piolho, como colírio e adicionados em

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA), Ariquemes, RO, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA), Ariquemes, RO, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Química do Instituto Federal de Educação Ciências e Tecnologia de Rondônia (IFRO), Jiparaná, RO, Brasil.

<sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PPGBIOEXP) da Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR).



preparações de unguentos, analgésicos e antissépticos (1).

Nos dias atuais as inúmeras alterações que o tabaco provoca por todo o organismo são amplamente conhecidas e divulgadas, sendo o tabagismo considerado uma das mais severas pandemias mundiais (3), responsável pela morte de aproximadamente cinco milhões de pessoas por ano em todo o mundo (4,5), e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) é um fator a ser ponderado, uma vez que é considerado a segunda causa de mortalidade mundial (6).

O hábito de fumar dá origem à aproximadamente cinquenta tipos de doenças, onde se destacam as doenças cardiovasculares, respiratórias obstrutivas crônicas e os cânceres (7), em especial de pulmão e esôfago, sendo que cerca de 10% das neoplasias que acometem o corpo humano se desenvolvem na cavidade oral (8).

Vários agentes têm sido relatados na literatura como causas de risco para a progressão de lesões neoplásicas, tendo estes, grande capacidade de alterar alguns processos vitais celulares como expressão gênica e alterações cromossômicas, e o conhecimento desses agentes é fundamental para a profilaxia de problemas ocasionados pelos mesmos (9).

Embora os sistemas de defesa celular sejam eficazes, a estrutura cromossômica tem alta sensibilidade e, por isso estão mais suscetíveis a ações dos agentes clastogênicos que são aqueles que rompem a estrutura dos cromossomos e/ou dos agentes aneugênicos que são os que interferem no fuso durante a mitose, gerando aberrações cromossômicas que podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasia (10). Destas aberrações cromossômicas, originam-se os micronúcleos (MN), que são estruturas esféricas resultantes de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula-filha durante o processo de divisão celular (11,12).

O MN é considerado um marcador biológico, e vários estudos demonstraram que o teste do MN é eficaz na detecção de alterações mutagênicas, tanto em células epiteliais da mucosa oral como esofágica e brônquica (13).

A utilização de células esfoliadas da mucosa oral como bioindicador de alterações

mutagênicas se dá pelo fato de ser a primeira barreira física quando expostas a agentes genotóxicos, seja por inalação ou ingestão, devido à capacidade de metabolizar esses agentes (14), a análise dessas células é de fundamental importância para a detecção e prevenção de futuros problemas, principalmente neoplásicos, e quais agentes podem ocasionar os mesmos, e devido a isso o presente estudo objetivou analisar a mutagenicidade, por meio da técnica de micronúcleo em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não fumantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA – Manaus, sob o número de protocolo (021/2011).

### GRUPO DE ESTUDO

O presente estudo contou com a participação de 40 pessoas (20 homens e 20 mulheres) com idade variável. As pessoas foram organizadas em quatro grupos: não fumantes (controle negativo), com idade média de 26,2 anos; fumantes >10 anos, com idade média de 23,4 anos; fumantes <10 anos com idade média de 41,3 anos e ex-fumantes com idade média de 49 anos, cada grupo foi composto por 10 indivíduos, sendo 50% de cada sexo.

Os critérios de inclusão foram: não apresentarem lesões visíveis na cavidade oral; fumantes e ex-fumantes com hábito de fumar uma carteira de cigarros industrializados por dia (20 unidades), sendo estes não associados ao consumo de bebidas alcoólicas, e outros entorpecentes. Essa limitação se deu devido ao estudo realizado por Stick e Rosin, onde relataram que a frequência de MN só é possível de ser detectada em indivíduos que fumam no mínimo 20 cigarros/dia, já a exclusão de usuários de bebidas alcoólicas se deve ao fato do mesmo em combinação com tabaco servir como cofator de mutagenicidade (15). A exclusão de usuários de outros entorpecentes se deve ao fato de estar comprovado as múltiplas alterações genéticas provocadas pelos mesmos, entre eles podemos citar a maconha (*Cannabis sativa*), pois observou-se que tabagistas que a fumam tem 240% a mais de

chance de adquirirem câncer do que os usuários de apenas tabaco (16).

Não foram excluídos os usuários de café, chás, chimarrão e refrigerantes, pois estudos relatam que o consumo de cafeína não se associa a nenhum tipo de genotoxicidade da cavidade oral e outras partes do tubo digestivo (17).

#### COLETA DAS AMOSTRAS

Realizou-se enxágue bucal com água destilada (em três repetições) para remover restos de saliva e mucosas de superfície. Em seguida realizou-se a esfoliação na mucosa jugal de ambos os lados para maximizar a amostra celular e eliminar qualquer viés desconhecidos que pudessem ser causados por amostragem em apenas uma face.

A esfoliação foi realizada com a utilização de uma escova de amostragem descartável, (utilizada para o exame de Papanicolau). Foram efetuadas dez rotações da escova contra a parede interior das bochechas, iniciando no centro e aumentando gradativamente a circunferência, produzindo um efeito de espiral para aumentar a amostragem de uma área maior e evitar a erosão contínua em uma única região (14,18).

#### ARMAZENAMENTO DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Após a esfoliação, a cabeça da escova foi introduzida em um recipiente (tubo de ensaio) com 04 ml de solução tampão contendo: 0,01 M Tris Hidrocloro (tris-HCL), 0,1 M Ácido etilondiaminotetracético (EDTA) e 0,02 M Cloreto de sódio (NaCl) com pH 6,8, girando de modo que as células ficassem desalojadas e liberadas na borda interna do recipiente. Em seguida os recipientes foram vedados firmemente a fim de evitar o extravasamento de células durante o transporte para o laboratório (18).

#### PREPARO DAS LÂMINAS

O preparo das lâminas seguiu protocolo descrito por Meneguetti e colaboradores (14). Os tubos de ensaio foram homogeneizados em vórtex. Posteriormente as escovas foram retiradas dos tubos de ensaio e centrifugados a 1.000 rpm por 10 minutos. Em seguida retirou-se o sobrenadante descartando-o e deixando apenas o pellet branco e adicionou-se 4 ml da

solução tampão para nova lavagem das células, o que favoreceu a remoção de bactérias. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens.

Em seguida, acrescentou-se 2 ml de Triarilmetano a 0,1% e 2 ml de xantenos a 0,1% (solução fixadora), sendo a solução novamente homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos, novamente descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet branco, acrescentando-se o triplo da quantidade do pellet de solução, 50% Triarilmetano a 0,1% e 50% xantenos a 0,1%, sendo novamente homogeneizados.

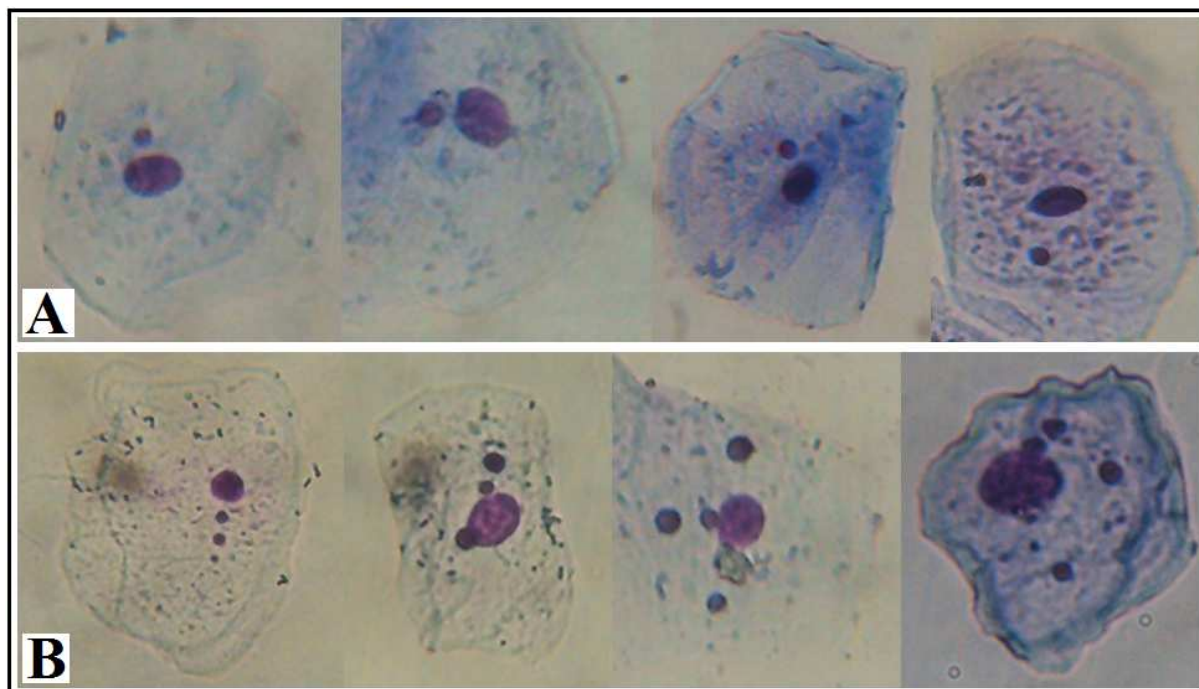
Na sequência o produto resultante dessa homogeneização foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e gotejado três vezes sobre a lâmina de forma que as gotas ficaram separadas. Sem esfregaço a lâmina foi apenas escorrida com movimentos giratórios e colocou-se para secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

Após a secagem as lâminas foram coradas com Triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%; mergulhou-se as lâminas 10 vezes em cada recipiente com submersão de 1 segundo de duração na sequência acima descrita. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corantes e secas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos para futura contagem das células.

#### ANÁLISE DAS LÂMINAS

A análise das lâminas e contagem das células foram realizadas por um único observador, em teste cego, utilizando microscopia de luz. Em cada lâmina foi contadas um total de 1000 células bem distintas ente si, sendo as mesmas observadas com aumento de 400X.

A confirmação desses MNs se deu com base nos seguintes requisitos (19): tamanho do MN em média 1/5 do tamanho do núcleo principal e estar inserido no mesmo citoplasma, tendo uma coloração de intensidade igual ou mais fraca que o núcleo e forma redonda, podendo conter um MN por célula (Figura 1A), ou mais (Figura 1B).



**Figura 1.** A: Células contendo um micronúcleo; B: Células contendo mais de um micronúcleo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o software Graphad Prism 5.0, onde realizou-se o teste de variância (Anova), e Teste Tukey, com intervalo de confiança de 95%, sendo significativo para  $^*(p<0,05)$ ,  $^{**}(p<0,01)$ ,  $^{***}(p<0,001)$ , para a comparação dos quatro grupos de estudo. Também foram calculados a média e o desvio padrão do número de MN.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de micronúcleos ocorrentes a cada 1000 células da mucosa jugal dos voluntários podem ser observadas na Tabela 1. A frequência de micronúcleos ocorrentes a cada 1000 células da mucosa jugal dos voluntários podem ser observadas na Tabela 1.

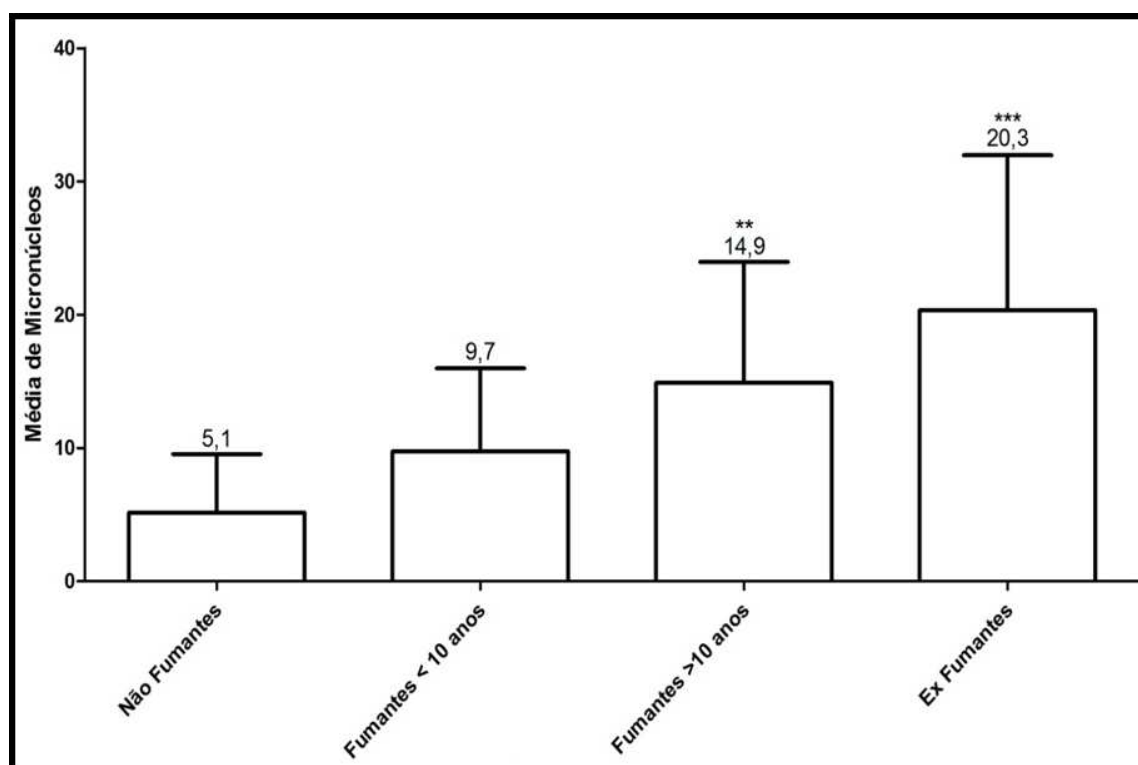
**Tabela 1.** Frequência de micronúcleos na mucosa jugal da cavidade oral

	Não Fumantes	Fumantes <10 anos	Fumantes >10 anos	Ex Fumantes
V1	1	5	13	59
	1	8	14	29
V2	8	9	20	19
	9	4	21	21
V3	1	20	8	22
	0	27	8	25
V4	3	17	10	14
	1	19	14	13
V5	14	5	33	19
	11	4	31	15
V5	2	10	8	12
	1	6	9	32
V7	11	9	9	33
	7	7	2	22
V8	9	11	5	9

	8	9	11	11
V8	8	4	11	13
	6	6	14	9
V10	1	8	27	18
	1	7	30	12
Total	103	195	298	407
Média	5,1	9,7	14,9	20,3

Observando os dados da tabela acima nota-se que o maior número e média de micronúcleo foi no grupo de ex-fumantes (407/20,3), seguido dos fumantes >10 anos (298/14,9), fumantes <10 anos (195/9,7) e o grupo controle negativo formado por não fumantes (103/5,1).

Quando comparados os grupos em estudo, pode-se observar que os resultados do grupo de fumantes <10 anos não apresenta significância estatística em relação ao grupo controle  $p>0,05$ , diferentemente dos grupos fumantes >10 anos e ex-fumantes, que apresentaram respectivamente a significância de  $p<0,01$  e  $p<0,001$ , conforme pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Média de micronúcleos encontrados em 1000 células de mucosa jugal, em diferentes grupos. Significativo para \*\* ( $p<0,01$ ), \*\*\* ( $p<0,001$ ).

Acredita-se que danos mutagênicos podem ser potencializados com o aumento da idade, e devido a isso o presente estudo correlacionou a média de idade dos

participantes por grupo com o aumento na frequência de MN, e os resultados podem ser observados na Figura 3.



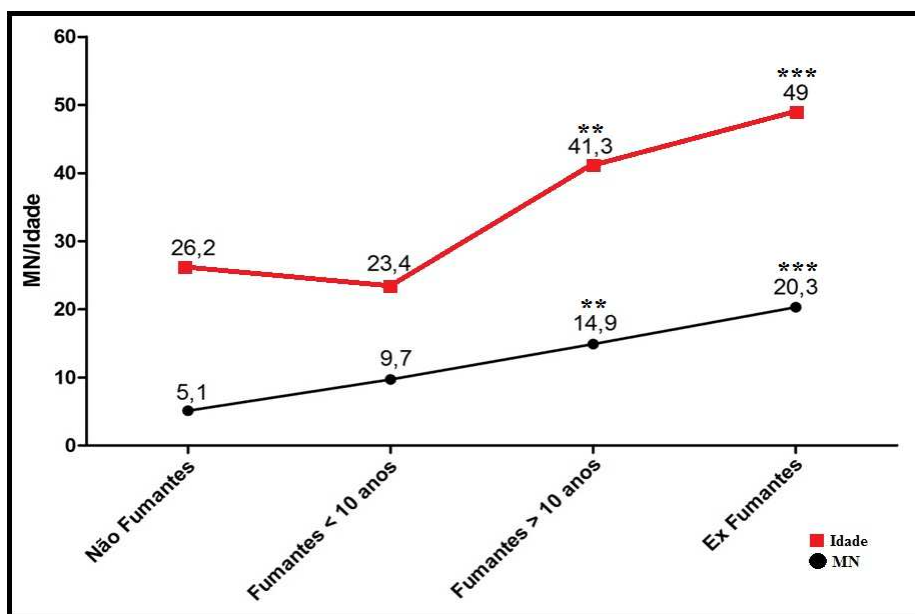


Figura 3. Análise da média de micrônúcleos e da idade dos participantes. Significativo para \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Os resultados obtidos estão em conformidade com estudo de Naderi e colaboradores (20) onde o número médio de MN encontrado em células da mucosa oral foi maior no grupo de fumantes >10 anos em comparação com o grupo de estudo de fumantes <10 anos e não fumantes (20).

No grupo de fumantes >10 anos a média de dependência dos indivíduos foi de 14 anos e no grupo de ex-fumantes foi de 23. Estes dois grupos apresentaram significância entre a frequência de MN em relação ao grupo controle, estando em concordância com estudo onde encontrou significância sobre a indução de MN em relação ao tempo de uso e exposição ao cigarro (21).

O cigarro é constituído por mais de 4.700 tipos de substâncias tóxicas, dentre elas o formaldeído, cetonas, monóxido de carbono e amônia (22, 23), sendo a nicotina responsável pela dependência química ao fumo (24), pois atua nas vias dopaminérgicas centrais, que conferem sensações de prazer e recompensa, e como incitante do sistema nervoso central, intensificando o estado de alerta e diminuindo o apetite (22). Também são encontradas as substâncias consideradas cancerígenas como níquel, chumbo, polônio e o alcatrão que é uma das substâncias com maior poder carcinogênico responsável por uma elevada ocorrência de cânceres de pulmão, boca, laringe, esôfago entre outros (25).

Na cavidade oral o tipo de câncer mais comum em 90% dos casos é o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), popularmente conhecido como Carcinoma Epidermoide ou Espinocelular (26). A ocorrência de CCEO acontece com maior frequência porque o tecido que constitui a cavidade oral apresenta maior abertura a ação dos agentes genotóxicos, pois o epitélio da cavidade oral é um tecido pavimentoso estratificado não queratinizado, e essa ausência de queratinização, implica em uma maior permeabilidade, aumentando a capacidade de absorção destas células (27, 28).

A análise da média de micrônúcleos e da idade dos participantes revelou um resultado significativo em relação ao aumento frequência de MN e o aumento da idade dos participantes, estando este em concordância com estudo que obteve resultados com significância em relação ao aumento da idade dos participantes e a indução na frequência de MN (29).

Outro estudo realizado sobre a frequência de MN na mucosa oral de operadores de postos de gasolina também mostrou significância na ocorrência de MN em relação a variável idade, sendo este resultado esperado, uma vez que a mutagenicidade pode aumentar com a idade (29), existindo duas hipóteses para isso a primeira diz que a maior ocorrência em pessoas idosas se dá por

causa do acúmulo de mutações oncogênicas, já a segunda sugerem que não é o ataque do câncer que aumenta com o passar dos anos, mas a capacidade de defesa do organismo que diminui (30). Independente dos fatores que ocasionam a ocorrência de cânceres principalmente de cabeça e pescoço tem tendência a aumentar com idade, pois na Europa em 98% dos casos os pacientes apresentam idade superior a 40 anos (31), estando em concordância com a idade do grupo em estudo que apresentou significância estatística.

Acredita-se que o fator idade foi o motivo por não haver significância no número de MN do grupo de fumantes <10 anos, em relação aos não fumantes, pois o mesmo apresenta a menor média de idade entre todos os grupos em estudo 23,4 anos, além dos efeitos deletérios do tabaco ser considerados lentos na maioria dos casos (32), porém isso não é um padrão devido a existência das heranças multifatoriais de pessoas que tem pré-disposição genética (33).

Outro dado relevante é o grupo de ex-fumantes apresentarem o resultado com maior significância, somados ao fator da idade ser superior ao grupo controle, esse grupo teve uma média de dependência do tabaco de 23 anos, mostrando que os danos causados nesse período não foram revertidos após interrupção da utilização do mesmo, que ocorreu em média há oito anos. Danos irreversíveis ocasionados pelo tabaco também são observados em outros estudos, como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), que é uma doença ocasionada pela exposição ao tabagismo e gases tóxicos, sua característica é a obstrução progressiva ao fluxo aéreo sendo irreversível depois de ocorrerem às lesões no parênquima (34).

Os problemas ocasionados pelo tabaco também afetam outras gerações, tanto de mães fumantes ativas como passivas,

podendo provocar obstrução dos vasos, abortos espontâneos, nascimentos prematuros, problemas cardiovasculares, mortes fetais e de recém-nascidos, complicações com a placenta, episódios de hemorragia e até mesmo dependência do recém-nascido a nicotina (35).

Todos os problemas acima mencionados podem ser potencializados se trabalharmos com a variável tabagismo em combinação com alcoolismo, devido a maior ocorrência de micronúcleos no grupo fumantes alcólicas em relação a fumantes não alcólicas e não fumantes, demonstrando que o tabaco e álcool em conjunto provocam alterações na frequência de micronúcleos e anomalias metanucleadas (15, 36).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme o objetivo da presente pesquisa em analisar a mutagenicidade em células epiteliais da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não fumantes, os resultados revelaram que fumantes >10 anos tem um aumento significativo da frequência de MN, em relação aos grupos <10 anos e não fumantes, sendo que esses danos permanecem no grupo de ex-fumantes, não havendo uma redução dos danos provocados pelo tabagismo e sim uma permanência. Vale ressaltar que os grupos de fumantes >10 anos e ex-fumantes são formados por pessoas com média de idade superior aos grupos de fumantes <10 anos e não fumantes, o que pode ter ocorrido como cofator dos resultados obtidos, sendo necessários estudos adicionais utilizando as variáveis, tabagismo e idade de uma maneira isolada para uma melhor compreensão dos resultados.

Adriana Martins de Souza, Aline Marques Da Silva,  
Leandro José Ramos, Renato André Zan, Dionatas Ulises  
de Oliveira Meneguetti

*Endereço para correspondência:* Rua Fernando Giongo,  
Bairro Conceição, Nº1433, Porto Velho, Rondônia, Brasil,  
CEP: 76808448.

Telefone: (69)92437860.

Email: [dionatas@icbusp.org](mailto:dionatas@icbusp.org)

Recebido em 22/10/2013

Revisado em 07/05/2014

Aceito em 11/06/2014

## REFERÊNCIAS

- (1) BALBANI, A. P. S.; MONTOVANI, J. C. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.71, n.6, p.820-826, 2005.
- (2) VALE, N. B. A Farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Rev Bras Anesthesiol**, v.52, n.3, p.368-380, 2002.
- (3) FIGUEIREDO, D.C.; SOUZA, P.R.F.; GONÇALVES, M.I.R.; BIASE, N.G. Análise perceptivo-auditiva, acústica computadorizada e laringológica da voz de adultos jovens fumantes e não-fumantes. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.69, n.6, p.791-799, 2003.
- (4) ARORA, M.; MATHUR, N.; GUPTA, V.K.; NAZAR, G.P.; REDDY, K.S.; SARGENT, J.D. Tobacco use in Bollywood movies, tobacco promotional activities and their association with tobacco use among Indian adolescents. **Tobacco Control**, v.21, n.5, p.482-487, 2011.
- (5) OLIVEIRA, R. M.; FUREGATO, A. R. F. Esquizofrenia y dependencia del tabaco: una revisión integradora. **Enfermería Global**, v.11, n.25, p.381-403, 2012.
- (6) SZKLO, A.S.; SAMPAIO, M.M.A.; FERNANDES, E.M.; ALMEIDA, L.M. Perfil de consumo de outros produtos de tabaco fumado entre estudantes de três cidades brasileiras: há motivo de preocupação? **Cad Saúde Públ**, v.27, n.11, p.2271-2275, 2011.
- (7) ABREU, M. N. S.; SOUZA, C. F.; CAIAFFA, W. T. Tabagismo entre adolescentes e adultos jovens de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: influência do entorno familiar e grupo social. **Cad Saúde Públ**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 935 - 943, 2011.
- (8) OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J Bras Patol Med Lab**, v.42, n.5, p.385-392, 2006.
- (9) LOURENCO, J.A.; PITANGUI, C.P.; JORDÃO, A.A.; VANNUCCHI, H.; CECCHI, A.O. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [Tabebuia impetiginosa (Mart. ex DC.) Standl.]. **Rev Bras Plantas Med**, v.12, n.4, p.414-420, 2010.
- (10) CARRARD, V.C.; COSTA, C.H.; FERREIRA, L.A.; LAUXEN, I.S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Rev Fac Odontol Porto Alegre**, v.48, n.1/3, p.77-81, 2007.



- (11) DIETZ, J.; DIEHL, A.S.; PROLLA, J.C.; FURTADO, D.C.; FURTADO, A.D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev Assoc Med Bras**, v.46, n.3, p.207-211, 2000.
- (12) FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Rev Sau Biol - Sabios**, v.7, n.1, p.91-98, 2012.
- (13) CARVALHO, M.B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.; GUEDES, A.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Med Bras**, v.48, n.4, p.317-322, 2002.
- (14) MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F.C.; BOSSO, R.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. New method for detection of mutagenicity in oral mucosa the through of micronucleus test. **HOAJ Biology**, v.1, n.8, p.1-4, 2012.
- (15) STICK, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Inter J Cancer**, v.31, n.3, p.305-308, 1983.
- (16) BERTHILLER, J.; STRAIF, K.; BONIOL, M.; VOIRIN, N.; BENHAÏM-LUZON, V.; AYOUB, W.B.; DARI, I.; LAOUAMRI, S.; et al. Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb. **J Thorac Oncol**, v.3, n.12, p.1398-403, 2008.
- (17) NAGANUMA, T.; KURIYAMA, S.; KAKIZAKI, M.; SONE, T.; NAKAYA, N.; OHMORI-MATSUDA, K. Coffe consumption and the risk of oral, pharyngeal, and esophageal cancers in Japan. **Am J Epidemiol**, v.168, n.12, p.1425-1432, 2008.
- (18) THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; et al. Buccal micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v.4, n.6, p.825-37, 2009.
- (19) BOHRER, P. L. **Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos**. (Dissertação) - Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- (20) NADERI, N. J.; FARHADI, S.; SARSHAR, S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. **Ind J Pathol Microbio**, v.55, n.4, p.433-438, 2012.
- (21) OZKUL, Y.; DONMEZ, H.; ERENMEMISOGLU, A.; DEMIRTAS, H.; IMAMOGLU, N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. **Mutagenesis**, v.12, n.4, p.285-287, 1997.
- (22) CHAVES, E.C.; OYAMA, S.M.R. Aconselhamento telefônico para cessação do tabagismo. **Rev Gaúcha Enfer**, v.29, n.4, p.513-519, 2008.
- (23) TAMASHIRO, E.; COHEN, N.A.; PALMER, J.N.; LIMA, W.T. Effects of cigarette smoking on the respiratory epithelium and its role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.75, n.6, p.903- 907, 2009.
- (24) HORTENSE, F. T. P.; CARMAGNANI, M. I. S.; BRETAS, A. C. P. O significado do tabagismo no contexto do câncer de laringe. **Rev Bras Enfer**, v.61, n.1, p.24-30, 2008.
- (25) DUARTE, J.L.; DE-FARIA, F.A.; CEOLIN, D.S.; CESTARI, T.M.; DE-ASSIS, G.F. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.72, n.2, p.210-216, 2006.



- (26) VENTURI, B.R.M.; CABRAL, M.G.; LOURENCO, S.Q.C. Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.70, n.3, p.385-392, 2004.
- (27) KERN, R. **Avaliação de micronúcleo em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia**. (Dissertação) Ponta Grossa - Master of Dentistry – State University, 2006.
- (28) HOSHI, L. **Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral**. (Dissertação). Rio de Janeiro - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Osvaldo Cruz; 2009.
- (29) GATTÁS, G.J.F.; CARDOSO, L.A.; MEDRADO-FARIA, M.A.; SALDANHA, P.H. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. **Occup Med**, v.51, n.2, p.107-113, 2001.
- (30) DEGREGORI, J. Challenging the axiom: does the occurrence of oncogenic mutations truly limit cancer development with age? **Oncogene**, v.32, n.15, p.1869-1875, 2013.
- (31) ALVARENGA, L.M.; TORREGLOSA, R.M.; CRISTINA, P.B.E.; CABRAL, R.M.J.; VICTOR, M.J.; MARIA, G.B. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.74, n.1, p.68-73, 2008.
- (32) REICHERT, J.; ARAÚJO, A.J.; GONÇALVES, C.M.C.; GODOY, I.; CHATKIN, J.M.; SALES, M.P.U.; et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. **J Bras Pneumol**, v.34, n.10, p.845-880, 2008.
- (33) PIZZOLATO, A.L.B.; MARINS, J.R.; STEIN, J.O.; SQUASSANTE, N.D.; PAES, M.F. **Genética na Escola**, v.5, n.1, p.43-52, 2010.
- (34) LAIZO, A. Doença pulmonar obstrutiva crônica – Uma revisão. **Rev Port Pneumol**, v.15, n.6, p.1157-66, 2009.
- (35) BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Jovem mulher e tabaco. Encontrado em: URL: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=jovem&link=gravidez.htm>. Acesso em: 07 set 2013.
- (36) OLIVEIRA, L.U.; LIMA, C.F.; SALGADO, M.A.; BALDUCCI, I.; ALMEIDA, J.D. Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. **Anal Quant Cytol Histol**, v.34, n.1, p.9-14, 2012.