

TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS EXFOLIATIVAS DA MUCOSA BUCAL COMO FERRAMENTA DA BIOMONITARAÇÃO EM FUMANTES: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Silvana de Castro Mendes¹

Isaianne Kelly Martins de Souza²

Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior³

Odontologia



cadernos de
graduação

ciências biológicas e da saúde

ISSN IMPRESSO 1980-1785

ISSN ELETRÔNICO 2316-3143

RESUMO

O hábito de fumar está relacionado ao surgimento de patologias orais que são desencadeadas quando as células são expostas a agentes que causam danos genéticos. O controle da exposição aos agentes genotóxicos pode ser feito por meio de bioindicadores. Neste caso, um dos mais utilizados na biomonitoração é o micronúcleo. O teste do micronúcleo é amplamente indicado em caso de danos no DNA, contudo é possível detectar na literatura uma falta de padronização em relação a esta técnica e a principal consequência disso é a frequência de resultados inconsistentes, necessitando assim de um maior esclarecimento sobre esta técnica. O objetivo deste trabalho foi avaliar as metodologias mais utilizadas no teste do micronúcleo em células da mucosa bucal de fumantes por meio de uma revisão de literatura. Para isso, foram selecionados artigos na base de dados eletrônicos (Portal de Periódicos Capes), teses e dissertações da biblioteca setorial do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os trabalhos selecionados tiveram ênfase em efeitos da exposição a agentes genotóxicos, em específico na mucosa bucal e em técnicas para coloração de células. O período de coleta foi de Julho de 2013 a Julho de 2014. Um total de 23 trabalhos foram selecionados para esta revisão. Conclui-se que a técnica de coloração de *Feulgen* é mais utilizada, por ser um corante específico para o DNA. Número de células e os critérios de

inclusão de indivíduos avaliados representam um ponto crítico nessa técnica. Sugere-se a adoção de um bioindicador complementar como contraprova em relação aos resultados obtidos com o teste do micronúcleo.

PALAVRAS-CHAVE

Micronúcleo. Fumantes. Mucosa Bucal.

ABSTRACT

Part of oral diseases is triggered when cells are exposed to agents that cause genetic damage. The use of biological indicators to monitor such effects is extremely important in controlling exposure to genotoxic agents. In this case, one of the biomarkers used in biomonitoring is micronucleus. The micronucleus test is widely mentioned in the case of DNA damage, but the literature is possible to detect a lack of standardization with regard to this technique and the main result is often inconsistent results, thus requiring further clarification of this technique. The aim of this study was to evaluate the methodologies used in micronucleus test in oral mucosa cells of smokers through a literature review. For this, were selected articles in electronic database (Portal Capes), theses and dissertations of the library at the Department of Nuclear Energy UFPE. The selected works had emphasis on effects of exposure to genotoxic agents, in particular in the oral mucosa and techniques for cell staining. The collection period was July 2013 to July 2014. A total of 23 papers were selected for this review. We conclude that the Feulgen staining technique is more used because it is a specific dye for DNA. Number of cells and the inclusion criteria evaluated individuals is a critical point in this the technique. It is suggested the adoption of a complementary biomarker as a control in relation to the results obtained with the micronucleus test.

KEYWORDS

Micronuclei. Smoker. Oral Mucosa

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de doenças degenerativas está relacionado aos hábitos de vida como uso de álcool, cigarro, drogas, condições de estresse, fatores genéticos, deficiência de micronutrientes, bem como exposições ocupacionais à genotoxinas e procedimentos médicos com uso das radiações, representam as mais prováveis causas de danos genéticos, que levam a tais doenças (TOLBERT *et al.*, 1992).

Na busca de se evitar os efeitos danosos ao DNA, pode-se lançar mão da utilização de bioindicadores eficientes e menos invasivos. Estes são de importância significativa para a implementação de programas de monitoração individual, diagnóstico e

tratamento de doenças associadas ao dano genético. Um dos indicadores biológicos que atende estas demandas é o micronúcleo, uma resposta ao dano genético causado pela ação de agentes mutagênicos, sendo por esta razão a avaliação deste bioindicador amplamente utilizada para indicar a exposição aos agentes tóxicos contidos no cigarro (HOLLAND *et al.*, 2008).

Para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados na análise dos micronúcleos em células da mucosa bucal, critérios metodológicos e epidemiológicos devem ser observados, tais como: seleção criteriosa de indivíduos, técnicas adequadas de coleta, utilização de corantes específicos e contagem representativa do número de células (CEPPI *et al.*, 2010).

Apesar de ter uma descrição ampla na literatura, o uso do micronúcleo em células exfoliativas da mucosa bucal ainda não há um consenso sobre a padronização da metodologia empregada e é possível encontrar divergências entre os autores em relação aos métodos de coloração das células, o que pode representar resultados equivocados na monitoração da exposição de agentes tóxicos, principalmente em fumantes. Portanto, se faz necessário uma reflexão à luz da literatura para compreender o método mais eficiente para o teste do micronúcleo em células da mucosa bucal.

2 MÉTODOS

A concepção dessa revisão de literatura foi pautada em uma busca em artigos encontrados no sítio eletrônicos do Portal de Periódicos CAPES, dissertações e teses disponíveis na biblioteca setorial do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As palavras chaves utilizadas nas bases foram: *micronucleus assay*, *exfoliated buccal*, *smokers*. Foram utilizados artigos na língua inglesa e dissertações e teses em português. Estes trabalhos tiveram ênfase em efeitos da exposição à agentes genotóxicos, em específico na mucosa bucal e técnicas para coloração de células contendo micronúcleos. O período de coleta foi de julho de 2013 a julho de 2014 e 23 trabalhos foram selecionados para esta revisão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICRONÚCLEO

O micronúcleo é uma estrutura separada do núcleo principal de uma célula, resultante da não inclusão do cromossomo ou parte dele no núcleo principal da célula durante a mitose. Essa estrutura é um subproduto das aberrações cromossômicas instáveis, ou caracterizadas pela perda de cromossomos inteiros no processo de divisão celular. Sua formação completa-se quando o envoltório nuclear é restituído ao redor dos cromossomos das células descendentes (FERNANDES, 2005).

A elevada ocorrência de micronúcleos tem relação com o dano cromossômico causado pela exposição a agentes mutagênicos, defeito no processo mitótico ou falha no reparo do DNA (BONASSI *et al.*, 2003; FENECH *et al.*, 1999; HOLLAND *et al.*,

2008). Por apresentar associações positivas com ação de agentes causadores de dano no DNA, este teste vem ganhando maior aceitação e empregabilidade na monitoração das exposições ambientais e ocupacionais. Fernandes (2005) e Barbosa (2003) apresentaram o teste do micronúcleo em linfócitos do sangue periférico como uma técnica viável e rápida para indicação do dano causado pelas exposições ocupacionais às radiações ionizantes. Este bioindicador pode também promover uma marcação do estágio inicial da carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2003).

Um aspecto relevante acerca da presença dos micronúcleos é a relação com os hábitos de vida dos indivíduos, tais como o consumo de cigarro, álcool e deficiência de vitamina na dieta, os quais também podem contribuir para os danos genéticos (FENECH *et al.*, 1999). A relação entre a frequência de micronúcleos e o hábito de fumar tem sido alvo de diversos estudos, os quais apontam para uma relação direta entre o hábito de fumar e a frequência de micronúcleos em fumantes (HOLLAND *et al.*, 2008; FENECH *et al.*, 1999; DIENGIRE *et al.*, 2012).

Um exemplo disso são os resultados apresentados em um dos estudos do projeto HUMN, em que foi detectado um aumento discreto na frequência de micronúcleos em linfócitos de fumantes em relação aos não fumantes (BONASSI *et al.*, 2003). Entretanto, este trabalho reportou aumento significativo de micronúcleo quando associado com a exposição ocupacional a agentes genotóxicos em fumantes que consomem menos de 30 cigarros por dia. Bonassi e outros autores (2003) explicam que a exposição ocupacional a agentes genotóxicos podem mascarar os efeitos relacionados ao fumo em consumidores de menos de 20 cigarros por dia.

Além dos linfócitos, as células da mucosa bucal demonstram ter potencial para avaliação de micronúcleos em indivíduos cronicamente exposto aos agentes presentes na fumaça do cigarro. A utilização dessas células consiste em uma técnica de menor incômodo para os indivíduos avaliados, pois a coleta é minimamente invasiva, especialmente se comparado à coleta de outras amostras como a de linfócitos (HOLLAND *et al.*, 2008). Esta técnica proposta inicialmente por Stich e outros autores (1982) tem sido utilizada desde então para monitoração humana a agentes causadores de dano no DNA.

A frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal foi utilizada para monitorar a exposição de trabalhadores ao tabaco em uma fábrica de cigarro na Índia. Nesse caso, os trabalhadores expostos apresentaram elevada frequência de micronúcleos no epitélio bucal (BAGWE; BHISEY, 1993). Entretanto, a região oral onde a amostra é coletada é capaz de influenciar os resultados. Em pesquisa conduzida por Suhas e outros autores (2004) foram observadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos de fumantes e não fumantes quando comparadas diferentes regiões da mucosa oral. Os autores dessa pesquisa chamam a atenção para maior frequência de micronúcleos relacionada com hábito de fumar, principalmente para região da mucosa bucal e palato.

Martins e Boschini-Filho (2003) utilizaram os resultados do teste do micronúcleo para alertar sobre riscos do tabagismo e a importância do teste do micronúcleo na biomonitoração dos fumantes. Nestse trabalho ficou evidente que as células de indivíduos

fumantes apresentaram uma maior frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em relação ao grupo controle. Vão de encontro com a revisão onde o tabagismo crônico por meio do consumo de cigarro, tabaco mascado ou inalado na forma de rapé¹ apresenta relação significativa com patologias orais (HOLLAND *et al.*, 2008).

Estas informações são relevantes, pois as células da mucosa bucal são a primeira barreira contra a ingestão e inalação de agentes carcinogênicos. Essa barreira natural pode metabolizar fração desses agentes, resultando em produtos reativos (HOLLAND *et al.*, 2008). Aproximadamente 90% dos cânceres humanos tem origem em células epiteliais. Portanto, as células epiteliais bucais representam um alvo para o início de processos genotóxicos resultantes da ação de agentes carcinogênicos e que entram no corpo por inalação ou ingestão (THOMAS *et al.*, 2009; ROSIN, 1992).

Pesquisas reportam que devido as células da mucosa bucal renovarem-se entre 7 e 21 dias, há grandes possibilidades de se verificar os efeitos genotóxicos de exposições agudas ocorridas nesse intervalo. No caso de exposições crônicas oriundas dos hábitos de vida, recomenda-se avaliação periódica a cada 3 meses para que a avaliação sazonal seja levada em conta e assim os riscos sejam estimados com maior precisão (THOMAS *et al.*, 2009).

3.2 METODOLOGIAS PARA O TESTE DO MICRONÚCLEO EM MUCOSA ORAL

3.2.1 Técnicas de Coleta

A metodologia empregada para o teste do micronúcleo em células esfoliativas da mucosa bucal apresenta vantagens consideráveis sobre a cultura de células. Tais vantagens, como o baixo custo e a simplicidade de execução, possibilita o estudo epidemiológico (MAJER *et al.*, 2001). A parte prática do teste inclui a raspagem do epitélio da mucosa bucal por meio de uma espátula de madeira ou plástico (SITCH *et al.*, 1982; TOLBERT *et al.*, 1992; PALASKARA; JINDAL, 2010).

Um percentual de 54% dos laboratórios ao redor do mundo, que participam do Projeto HUMN, utilizam um depressor de língua em madeira e uma escova citológica (BONASSI *et al.*, 2009). Thomas e outros autores (2009) sugerem que seja utilizada uma escova citológica de cabeça pequena para maximizar a quantidade de células coletadas, contudo estes autores recomendam que antes das coletas haja um bochecho prévio para garantir uma assepsia da região bucal no intuito de evitar que a presença de bactérias ou outros achados possam interferir nas leituras. As células podem ser coletadas da língua, palato e mucosa bucal (SUHAS *et al.*, 2004).

Uma vez coletadas, as células podem ser armazenadas em solução salina a 0,9% ou solução tampão em pH neutro. Este método de coleta é o mais encontrado na literatura e utilizado entre os laboratórios colaboradores do projeto HUMN (MACHADO-SANTELLI, 1994; BONASSI *et al.*, 2009).

1 Tabaco moído muito fino, que é comercializado em pó seco usado para aspirar ou inalar pelo nariz (VIEGAS, 2008).

3.2.2 Tipos de Coloração

A maior variação na metodologia do teste do micronúcleo encontrado nos textos científicos está no tipo de corante utilizado para identificação do micronúcleo.

Uma técnica de coloração de menor custo e bastante utilizada na identificação de micronúcleos é a coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG). Nesta técnica, as lâminas, contendo o esfregaço com células da mucosa bucal são secas ao ar, em seguida coradas com May-Grünwald por 5 minutos. Após esta etapa as lâminas são coradas com Giemsa por 15 minutos e posteriormente lavadas em água corrente (PALASKARA; JINDAL, 2010).

Esta técnica permite uma melhor visualização do núcleo da célula e é amplamente utilizada em células sanguíneas, contudo não apresenta marcação específica para o DNA (THOMAS *et al.*, 2009; NERSESYAN *et al.*, 2006). Segundo Nersesyan e outros autores (2006), a maior limitação da MGG é a falta de especificidade para marcação de DNA, o que possibilita maior ocorrência de resultados falso-positivos. Achados comuns em células podem ser interpretados equivocadamente como micronúcleos. Estes autores enfatizam ainda que a avaliação de micronúcleos, utilizando lâminas coradas com a técnica de MGG deve ser realizada com cautela e critério, no intuito de evitar resultados falso-positivos.

Uma alternativa em relação à técnica citada acima para identificação de micronúcleos é a coloração com Papanicolau, que apesar de ser uma técnica menos específica em relação aos corantes citados anteriormente, tem sido utilizada em alguns trabalhos. No trabalho de Palaskara e Jindal (2010) os resultados da comparação deste corante com o MGG indicou melhor visualização dos micronúcleos em células da mucosa bucal de fumantes e consumidores de tabaco sem fumaça. Os autores justificam esse resultado pela utilização de álcool na fixação das células, o que permitiu um fundo com maior clareza quando comparadas com lâminas secas ao ar e coradas com MGG.

Esta justificativa está em comum acordo com as colocações de Dindgire e outros autores (2012) os quais enfatizam que o álcool etílico usado na fixação das células na técnica tem efeito bactericida e mantém a integridade da célula. No caso da coloração, Giemsa, Palaskara e Jindal (2010) relatam que as lâminas apresentaram um fundo repleto de detritos celulares e proteínas salivares que possivelmente podem comprometer a contagem dos micronúcleos.

Marcadores fluorescentes também podem ser empregados para visualização do micronúcleo, contudo esta técnica tem menor frequência (aproximadamente, 13%) de utilização entre os laboratórios que fazem parte do projeto HUMN (BONASSI *et al.*, 2009). Esta técnica apresenta maior custo devido ao uso de anticorpos e de um microscópio de fluorescência.

A técnica de *Feulgen* é a mais comumente empregada (aproximadamente, 56%) nos laboratórios que realizam o teste do micronúcleo (TOLBERT *et al.*, 1992; THOMAS *et al.*, 2009; BONASSI *et al.*, 2009).

A primeira etapa dessa 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 essenciais para coloração na técnica de *Feulgen*. A hidrólise realizada tem o objetivo de separar as bases púricas do açúcar da desoxirribose, expondo os grupos aldeídos livres, deixando a cadeia do DNA intacta 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 grupos 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 dessa forma as ações dos interferentes inespecíficos no resultado.

Este tipo de coloração é a mais indicada quando o objetivo é quantificar o DNA devido à característica desse corante possuir alto grau de especificidade para marcação da molécula de DNA (CHIECO; DERENZINE, 1999). Além disso, na coloração por *Feulgen Fast Green*, o citoplasma apresenta 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).

3.2.3 Critérios para Identificação do Micronúcleo

Um importante fator para o sucesso da técnica do micronúcleo, além do tipo de coloração utilizada, são os critérios de identificação. Os critérios desenvolvidos por Tolbert e outros autores (1992), para inclusão de células que serão contabilizadas na identificação de micronúcleos, tem sido amplamente utilizados (THOMAS, *et al.*, 2009; HOLLAND *et al.*, 2008; PALASKARA; JINDAL, 2010; MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; MARTINO-ROTH, 2002).

Bonassi e outros autores (2009) realizaram um levantamento em diversos laboratórios no mundo, que publicaram artigos, envolvendo micronúcleo em células exfoliativas, no intuito de verificar o atual quadro das principais metodologias empregadas. Neste levantamento 50% de um total de 46 laboratórios utilizam os critérios descritos por Tolbert e outros autores (1992).

No protocolo proposto por Tolbert e outros autores (1992) os parâmetros propostos a serem observados são: (a) citoplasma intacto e posição da célula relativamente plana na lâmina; (b) pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes; (c) poucos ou nenhuns detritos e (d) núcleo normal e intacto, perítmetro nuclear distinto. Os critérios sugeridos para identificação dos micronúcleos são: (a) perímetro redondo e suave, sugerindo presença de membrana; (b) menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para que sejam diferenciadas forma e cor; (c) *Feulgen* positivo, ou seja, rosa no campo claro iluminado; (d) mesma intensidade de coloração em relação ao núcleo; (e) textura similar a do núcleo; (f) mesmo plano focal do núcleo e (g) ausência de sobreposição ou ponte com o núcleo.

Com este protocolo Tolbert e outros autores (1992) obtiveram sucesso em identificar excesso de micronúcleos em pacientes em tratamento de radioterapia. Nesta pesquisa ficou evidenciada a distinção entre outras anomalias nucleares e o micronúcleo.

3.2.4 Avaliação do Quantitativo de Células

O número de células contadas é considerado um ponto crítico na análise do micronúcleo, em relação a resultados estatisticamente significantes. Os primeiros estudos, envolvendo micronúcleos na década de 1980, avaliaram um baixo número de células, aproximadamente 500 (HOLLAND *et al.*, 2008). Posteriormente, Tolbert e outros autores (1992) recomendaram um aumento na contagem do número de células para no mínimo 1000, com a possibilidade de considerar a avaliação de 2000 a 3000 células se menos de 5 micronúcleos forem observados na contagem de 1000 células.

Para células da mucosa bucal, Thomas e outros autores (2009) sugeriram determinar inicialmente todos os tipos de células, a exemplo das células basais, binucleadas e células diferenciadas, a partir da contagem de 1000 células. Em seguida, após a identificação do tipo célula, o próximo passo é avaliar os biomarcadores do dano genético pela contagem de no mínimo de 2000 células.

Aproximadamente 60 % dos laboratórios que participaram da pesquisa de Bonassi e outros autores (2009) relataram preparar ao menos duas lâminas por indivíduos estudados e 26 % afirmaram contar aproximadamente 1000 células por lâmina e 39% desses laboratórios adotaram a contagem de 2000 células. Esta pesquisa chamou atenção também para variação no número de células analisadas, de 500 a 4000 por indivíduo.

Martino-Roth e outros autores (2002) avaliaram o risco genotóxico associado à exposição ocupacional de mecânicos que trabalham no reparo e armazenamento de baterias e pintores de automóveis. Estes autores analisaram aproximadamente 3000 células por indivíduo em pesquisa, envolvendo a incidência de micronúcleos em células da mucosa bucal dos trabalhadores. Nesta pesquisa a média encontrada de micronúcleos para os trabalhadores foi de aproximadamente $8,55 \pm 5,08$, enquanto que, no grupo controle esta média foi de $2,12 \pm 1,62$.

Assim, Martino-Roth e outros autores (2002) justificam essa diferença devido ao fato dos trabalhadores estarem em constante contato com o chumbo, que é reconhecidamente um agente genotóxico responsável por causar quebras no cromossomo, levando ao aumento da frequência de micronúcleos. Este elemento também é comumente encontrado no tabaco do cigarro na forma do seu isótopo radioativo, o ^{210}Pb (SKWARZEC *et al.*, 2001).

Na pesquisa de Palaskara e Jindal (2010) o número de células examinadas foi de aproximadamente 1000. Como já informado, o trabalho teve como objetivo comparar duas técnicas coloração, em indivíduos com diferentes hábitos de consumo de tabaco. Os resultados encontrados pelos autores indicaram maior frequência de micronúcleos em consumidores de tabaco em relação ao grupo controle. A média de micronúcleos encontrados para o grupo controle foi aproximadamente $6,13 \pm 2,2$, utilizando a técnica do Papanicolau e $3,53 \pm 1,4$ com o Giemsa. Já entre os indivíduos

do grupo formado por fumantes a média de micronúcleos foi maior, $22 \pm 5,88$ e $17,67 \pm 5,76$ para as técnicas do Papanicolau e Giemsa, respectivamente.

O trabalho de Suhas e outros autores (2004) teve por objetivo avaliar a frequência de micronúcleos em células esfoliativas da mucosa bucal de consumidores de *beedi* em diferentes regiões da mucosa oral. Nesta pesquisa foram contadas 500 células para as regiões da língua, palato e mucosa bucal, totalizando 1500 células contadas. A região da mucosa bucal e do palato dos fumantes apresentaram as maiores médias, $1,28 \pm 0,68$ e $0,88 \pm 0,60$ ($p < 0,02$) respectivamente. No grupo controle essas médias foram de $0,76 \pm 0,60$ para mucosa bucal e $0,52 \pm 0,51$ ($p < 0,03$) para o palato.

Contudo não houve diferença estatística significativa entre fumantes e não fumantes quando comparada a frequência de micronúcleos na região ventral da língua. Esse fato é explicado pela dinâmica do fluxo da fumaça do cigarro, composta por partículas e gases que primariamente colidem com palato mole, região dorsal da língua e outras partes da cavidade oral (SUHAS *et al.*, 2004).

Bagwe e Bhisey (1993), no intuito de determinar a extensão da exposição interna e efeitos genotóxicos da exposição ocupacional ao *beedi*, analisaram aproximadamente 2000 células provenientes da mucosa bucal dos trabalhadores de uma fábrica de cigarro na Índia. Os funcionários que trabalhavam no processamento do cigarro apresentaram uma frequência média de $0,85 \pm 0,19$; já os indivíduos que trabalhavam enrolando o *beedi*, apresentaram uma frequência de $0,85 \pm 0,20$. Nesta pesquisa, os indivíduos do grupo controle, apresentaram uma frequência média de micronúcleos de aproximadamente $0,45 \pm 0,05$. Segundo os autores esses resultados indicam o potencial efeito clastogênico da exposição ocupacional ao tabaco.

4 CONCLUSÃO

Os trabalhos selecionados indicam que o teste do micronúcleo é uma importante ferramenta para monitoração individual. Contudo devido ao amplo espectro de agentes que podem influenciar a frequência de micronúcleos é preciso estabelecer critérios bem definidos na seleção de indivíduos e seus hábitos de vida, a fim de evitar resultados inconsistentes.

A técnica de coloração mais indicada e empregada entre os trabalhos que utilizam o micronúcleo como indicador do dano genético é a de *Feulgen*. Esta técnica de coloração é DNA específica, o que reduz a probabilidade de resultado falso-positivo entre os indivíduos avaliados.

No caso específico dos fumantes, para avaliar o grau de risco ao tabagismo, sugere-se um estudo mais aprofundado, utilizando bioindicadores complementares, como a avaliação presença do ^{210}Pb , um elemento genotóxico, em matrizes como a urina, cabelo e dentina.

2 Cigarro indígena com baixo grau de tabaco enrolado a mão em uma folha de *Diospyros melanoxylon* e amarrado com um fio de algodão, muito consumido no Sul da Ásia (SUHAS *et al.*, 2004).

REFERENCIAS

BAGWE, A.N.; BHISEY, A.R. Occupational exposure to tobacco and resultant genotoxicity in bidi industry workers. **Mutation Research**, v.299, p.103-109,1993.

BARBOSA, I.M.S.S. **Quantificação de micronúcleos em linfócitos como dosímetro biológico em pacientes expostas à radiação gama**. 2003. Dissertação (Mestrado) – CTG. Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

BONASSI S. *et al.* Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v.543 p.155-166, 2003.

BONASSI, S. *et al.* State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMN_{XL} project initiative. **Mutagenesis**, v.24, n.4, p.295-302, 2009.

CEPPI, M. *et al.* Human population studies with the micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, v.705, p.11-19, 2010.

CHIECO, P.; DEREZINI. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cell Biology**, v.111 p.345-358, 1999.

DINDGIRE, S.L. *et al.* Comparative study of exfoliated oral mucosal cells micronucleus frequency in potentially malignant and malignant lesions. **International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology**, v.3, p.15-20, 2012.

FENECH, M. *et al.* The HUman MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, **Mutation. Research**, v.428, p.271-283, 1999.

FERNANDES, T.S. **Emprego das Aberrações Cromossômicas Instáveis e Micronúcleos no Biomonitoramento Individual: Estudo Comparativo**. 2005. Dissertação (Mestrado) – CTG, Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

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.

MACHADO-SANTELLI, G.M.*et al.* Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**, v.322, p.203-208, 1994.

MAJER, B.J. *et al.* Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v.489, p.147-172, 2001.

MARTINO-ROTH, M.G. *et al.* Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.495-500, 2002.

MARTINS, K.F.; BOSQUINI FILHO, J. Determinação da frequência de micronúcleo e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.5, p.43-55, 2003.

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.

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.

ROSIN, M.P. The use of micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. **Mutation Research**, v.267, p.265-276, 1992.

SKWARZEC, B. *et al.* Inhalation of ^{210}Po and ^{210}Pb from cigarette smoking in Poland. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.57, p.221-230, 2001.

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.

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.

THOMAS, P. *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.4, p. 295-302, 2009.

VIEGAS, C.A.A. Formas não habituais de uso do tabaco. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, p.1069-1073, 2008.

Data do recebimento: 14 de Julho de 2018

Data da avaliação: 26 de Julho 2018

Data de aceite: 3 de Agosto de 2018

1 Acadêmica do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE. E-mail: 'silvana.castromendes@gmail.com'

2 Acadêmica do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE.
E-mail: 'isah.k.souza@hotmail.com'

3 Tecnólogo em Radiologia e Biólogo; Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares, docente do Curso de Radiologia da Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE. E-mail: carlos_eduardo@facipe.edu.br