



**FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

RELATÓRIO DE ATIVIDADE CLÍNICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MICRONÚCLEOS DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL COMO
POTENCIAL BIOMARCADOR ONCOLÓGICO**

Anita Raquel dos Santos Novais

Orientador

Professora Doutora Alexandra Sofia Pereira Teixeira

Porto 2014

Índice

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
DESENVOLVIMENTO.....	6
1. FATORES QUE INFLUENCIAM OS NÍVEIS DE MN.....	6
1.1 FATORES GERAIS.....	6
1.1.1. IDADE E SEXO.....	6
1.1.2. FATORES DE ESTILO DE VIDA.....	7
1.1.3. RAIOS X.....	9
1.1.4. RADIOTERAPIA.....	10
1.1.5. QUIMIOTERAPIA.....	10
1.1.6. OUTROS FATORES.....	11
1.2. FATORES ESPECÍFICOS.....	11
1.2.1. HIGIENE ORAL.....	11
1.2.2. DOENÇA PERIODONTAL.....	12
1.2.3. RESTAURAÇÕES DENTÁRIAS.....	13
1.2.4. ARAMES ORTODÔNTICOS.....	14
1.2.5. ACRÍLICO.....	14
1.3 METODOLOGIA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE MN.....	15
2. A FREQUÊNCIA DE MN E O CANCRO.....	15
3. DISCUSSÃO / CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

Resumo

Introdução: A mucosa oral representa uma barreira primária a potenciais agentes carcinogénicos (inalados ou ingeridos). Quando as células basais da mucosa oral são expostas a estes agentes, podem ocorrer danos genéticos, incluindo a formação de micronúcleos. Dada a associação entre instabilidade genética e cancro, a frequência de micronúcleos pode constituir um biomarcador com relevância para a avaliação de risco oncológico. Contudo, é importante estabelecer valores basais de frequência de micronúcleos em indivíduos saudáveis, sendo importante eliminar fatores de confundimento.

Objetivos: Avaliar as principais descobertas, perspectivas e desafios associados ao estudo dos micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral, bem como a sua potencial aplicação como biomarcadores de patologia oncológica.

Material e métodos: Foram analisados 68 artigos selecionados através dos motores de busca “PubMed®” e “SCOPUS®”, escritos em inglês, francês, espanhol ou português, referentes a estudos realizados em humanos, publicados em revistas indexadas com revisão por pares e publicados no intervalo de tempo entre 2004 a 2014.

Desenvolvimento: Existem diversos componentes capazes de influenciar os níveis de micronúcleos. Fatores gerais como: idade, sexo, fatores de estilo de vida, raios X, radioterapia e quimioterapia, e fatores específicos da cavidade oral como os hábitos de higiene oral, a doença periodontal, restaurações dentárias, arames ortodônticos e acrílico. A metodologia utilizada para avaliar a frequência de micronúcleos também pode alterar os seus níveis basais nas células. Apesar dos fatores de confundimento, foram analisados diversos estudos que mostraram uma associação positiva entre o desenvolvimento de cancro e uma frequência mais elevada de micronúcleos.

Conclusão: A frequência de micronúcleos em células da mucosa oral, pode ser utilizada para detetar dano genético, e foi observada uma correlação entre valores elevados desta frequência e a presença de cancro da cabeça e pescoço bem como cancro na zona do tórax e abdómen. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar a associação entre a frequência de micronúcleos na cavidade oral e a carcinogénese.

Palavras chave: micronúcleos, células esfoliadas orais, cancro, medicina dentária, genotoxicidade

Abstract

Introduction: Buccal mucosa represents the first barrier to potential carcinogens (inhaled or ingested). When basal buccal mucosa cells are exposed to these carcinogens, genetic damage may occur, including the formation of micronucleus. Since the correlation between DNA damage and cancer is well established, micronucleus frequency could constitute a good biomarker for cancer risk evaluation. However it is important to establish a baseline value for healthy individuals, by eliminating confounding factors.

Objective: To evaluate the principal discoveries, perspectives and challenges associated to the study of micronucleus in buccal mucosa cells, as well as its potential application as an oncologic biomarker.

Methodology: 68 articles were selected from “PubMed®” and “SCOPUS®” databases, written in English, French, Spanish or Portuguese, referring to human studies published on indexed journals with peer revision, between 2004 and 2014.

Development: There are several factors capable of inducing an increase in micronucleus frequency. These include general factors such as, age, sex, lifestyle factors, X-rays, radiotherapy and chemotherapy. However there are also factors specific to oral cavity including oral hygiene habits, periodontal disease, dental fillings, fixed orthodontic wires and acrylic. The chosen methodology used to evaluate the micronucleus frequency can also change its baseline value. We analysed several studies, which showed a correlation between high micronucleus frequency and cancer development.

Conclusion: Micronucleus frequency in buccal mucosa cells can be used as a marker for genetic damage, and increased values of its frequency has been associated to head and neck cancer, as well as thoracic and abdominal cancer. Nevertheless, further studies are necessary to confirm the correlation between micronucleus frequency in oral cavity and carcinogenesis.

Keywords: micronucleus, buccal mucosa cells, cancer, dentistry, genotoxicity

Introdução

Os biomarcadores oncológicos são marcadores de alterações celulares, bioquímicas ou moleculares, mensuráveis biologicamente e associados a processos de carcinogénese, que ocorrem antes da transformação maligna¹. Devem ser minimamente invasivos, fidedignos e relevantes para melhorar a monitorização, o diagnóstico e o tratamento de doença oncológica².

A mucosa oral é constituída por 4 camadas: a camada córnea (ou camada das células queratinizadas), que está em contacto com a cavidade oral, a camada granulosa, a camada espinhosa, que contém as populações de células diferenciadas, apoptóticas e necrosadas, e a camada basal, a mais interna, que contém as células estaminais basais, que se reproduzem e mantêm este perfil, estrutura e integridade³. Este epitélio possui um sistema de renovação contínuo, em que novas células são produzidas por mitose na camada basal e migram para a superfície substituindo as que são esfoliadas, permitindo assim que a população celular se mantenha constante^{2,3}. O tempo de migração celular desde a camada basal até à superfície queratinizada é de 7 a 21 dias⁴.

Tendo em consideração que aproximadamente 90% dos cancros possuem uma origem epitelial, a mucosa oral representa um alvo preferencial para eventos precoces de genotoxicidade induzidos por carcinogénicos que se introduzem no organismo via inalação e ingestão, e por este motivo pode ser usada para monitorização destes eventos³. A exposição ambiental a carcinogénicos, pode resultar em lesão no Ácido Desoxirribonucleico (ADN) e em instabilidade genómica, porém estas alterações moleculares podem igualmente ser geradas por procedimentos médicos (radiação e químicos), deficiências em micronutrientes (folato), fatores do estilo de vida (álcool, tabaco, drogas e stress), e fatores genéticos como defeitos hereditários no metabolismo ou reparação do ADN⁵. A observação de que todos estes fatores levam a uma alteração celular mensurável (aumento do número de pequenos núcleos, separados do núcleo principal da célula - os Micronúcleos (MN)⁴) veio demonstrar, pela primeira vez, que a frequência de MN podia ser usada como um indicador para o efeito destes agentes genotóxicos, neste caso, no epitélio da mucosa oral⁶.

A formação de MN ocorre em células em divisão e é resultado de uma quebra cromossómica devido à não-reparação ou má-reparação de lesões de ADN ou a cromossomas mal-segregados devido a mau funcionamento mitótico³. Esta perda de material genético pode ocorrer por exposição a substâncias clastogénicas, que causam quebra cromossómica, ou a substâncias aneugénicas, que afetam o fuso mitótico^{1,7}. No epitélio oral, os MN observados em células esfoliadas de tecido epitelial, formam-se

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

durante a mitose na camada basal do epitélio. Estas migram até à superfície pelo que a monitorização de populações neste tecido pode refletir os danos decorrentes durante o tempo de migração³.

O teste MN em Células Esfoliadas Oraís (CEO) é um dos métodos menos invasivos para medir lesões no ADN em humanos⁸, tendo como vantagens: rapidez, fácil contagem, especialmente em comparação com estudos de amostras sanguíneas para linfócitos, ou biopsia tecidual³, baixos custos e sensibilidade elevada. No entanto, para validar a monitorização dos níveis de MN como biomarcadores oncológicos é essencial estabelecer valores basais da frequência de MN para sujeitos controlo saudáveis que não tenham sido expostos a doses anormais de genotoxinas e citotoxinas, avaliando também outros fatores de confundimento (idade, género, tabaco, consume de álcool, dieta)⁴.

Este trabalho tem como objetivo avaliar as principais descobertas, perspectivas e desafios associados ao estudo dos MN em células esfoliadas da mucosa oral, e a sua potencial aplicação como biomarcadores de patologia oncológica.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi elaborado com base numa pesquisa de artigos científicos escritos em inglês, francês, espanhol e português, referentes a estudos realizados em humanos, publicados em revistas indexadas com revisão por pares, no intervalo de tempo entre 2004 a 2014.

Uma pesquisa bibliográfica extensa foi realizada no motor de busca “PubMed®”, usando as palavras-chave: “buccal micronucleus” e “cancer”. Das 100 referências encontradas, foram selecionadas 54 de acordo com os critérios de inclusão.

Foi realizada uma segunda pesquisa nos motores de busca “PubMed®” e “SCOPUS®”, utilizando como palavras-chave “buccal micronucleus” e “dentistry”, com o objetivo de completar o conjunto de artigos recolhidos. Nesta pesquisa obteve-se um total de 39 referências, selecionadas de acordo com os critérios de inclusão.

As pesquisas foram comparadas, para eliminar artigos repetidos. Após leitura, foram excluídos os artigos considerados pouco relevantes para esta revisão bibliográfica.

Foram ainda incluídos dois artigos de revisão sobre micronúcleos para contextualização do tema.

No final obteve-se um total de 68 artigos, que serviram de base à realização deste trabalho.

Desenvolvimento

O teste MN em células da mucosa oral é um dos métodos menos invasivos para medir lesões no ADN em humanos. Apesar das vantagens deste método, na cavidade oral existem vários fatores que provocam alterações celulares e moleculares que podem levar ao aumento do número de MN, alterando desta forma a frequência basal. Assim, é essencial conhecer que fatores são capazes de interferir com a frequência basal de MN, e se tal ocorre é importante também determinar o seu grau de influência. Neste trabalho, vamos considerar os fatores gerais (como por exemplo a idade, o sexo, fatores do estilo de vida, quimioterapia e radioterapia), e os fatores específicos da cavidade oral (nomeadamente a higiene oral, a doença periodontal, restaurações dentárias, os arames ortodônticos, o raio X, o acrílico e os colutórios). Todos estes fatores vão ser apresentados e no fim discutida a sua influência na frequência basal dos MN nas CEO.

1. Fatores que influenciam os níveis de MN

1.1 Fatores Gerais

1.1.1. Idade e Sexo

Relativamente à idade, apesar de existirem resultados contraditórios, o consenso é que há uma relação entre o aumento da idade de um indivíduo e o aumento da frequência de MN em CEO^{1,9-11}, tendo sido estabelecido que a frequência basal de MN em crianças e recém-nascidos era relativamente mais baixa em comparação com os adultos¹². Esta observação pode ser explicada pela senescência celular, uma vez que o aumento dos MN com a idade é provavelmente devido à combinação de efeitos que incluem: a acumulação de mutações adquiridas em genes envolvidos na reparação de ADN, segregação de cromossomas e *checkpoints* do ciclo celular e aberrações numéricas e estruturais em cromossomas causado por exposição a genotoxinas endógenas e exógenas¹³. Este efeito foi igualmente observado em estudos em que foi avaliada a relação da idade com os níveis de MN em linfócitos periféricos¹⁴.

Em relação ao fator sexo, não existe consenso geral. Alguns estudos^{11,15,16} referem que as mulheres têm um índice de MN mais elevado do que os homens. Uma possível explicação pode ser o facto das mulheres terem duas cópias do cromossoma X, que tem mais tendência a ser perdido como MN relativamente aos outros cromossomas¹³. Já Bloching e colaboradores¹ chegaram a um resultado

contrário, em que a frequência de MN era mais elevada nos homens, enquanto que outros estudos realizados não encontram diferenças estatisticamente significativas entre os géneros, no que respeita às frequências de MN¹⁷⁻²¹.

Num trabalho conduzido por Bonassi e colaboradores¹⁴, com o objetivo de avaliar o impacto dos diversos fatores que poderiam influenciar a frequência basal de MN na mucosa oral, concluiu-se que o efeito da idade era consistente na indução da formação de MN, não tendo sido conclusivo em relação ao género.

Desta forma, a idade parece constituir uma influência da frequência de MN mais fiável em comparação com o género.

1.1.2. Fatores de estilo de vida

Os fatores de estilo de vida que podem influenciar a frequência dos MN na cavidade oral incluem o tabaco, consumo de álcool e a dieta (como por exemplo as deficiências vitamínicas)².

Tabaco

O tabaco contém vários químicos no seu fumo, sendo alguns genotóxicos, como é o caso da nicotina, do alcatrão e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), precursores de químicos que aumentam o risco para o cancro²⁰. O tabaco está associado à diminuição do nível de folato, alteração da sua forma de distribuição e aumento dos danos genéticos nas células da mucosa oral²², levando ao aumento do risco para o aparecimento de cancro oral²³. Devido à sua influência, vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar se efetivamente o tabaco aumenta a frequência de MN, se o número de cigarros por dia e o número de anos de fumador são relevantes, e se as diferentes formas de tabaco têm entre si diferenças na indução de MN.

Um estudo realizado por Naderi e colaboradores²⁴, encontrou diferenças estatisticamente significativas no número de MN entre um grupo de não fumadores (0,94%) e dois grupos de fumadores (fumadores há menos de 10 anos (1,89%) e fumadores há mais de 10 anos (2,01%)). Conclui-se neste estudo que a média do número de MN em CEO nos indivíduos não-fumadores é estatisticamente mais baixa em comparação com os fumadores, não sendo importante o número de anos de exposição ativa ao tabaco. Um outro estudo desenvolvido por Bloching e colaboradores¹, também verificou uma relação estatisticamente significativa entre o tabaco e a frequência de MN. No caso do trabalho de Bonassi e colaboradores¹⁴, o padrão de danos genéticos associados ao número de cigarros por dia, mostra que

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

apenas indivíduos que fumam um maior número de cigarros (mais de 40 cigarros por dia) têm um aumento estatisticamente significativo de MN comparativamente com os não fumadores.

Em relação a diferentes tipos de tabaco foram realizados vários estudos com o intuito de comparar o tabaco de fumar com o de mascar. Num estudo com indivíduos saudáveis foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de tabaco (1,90% para os que mascavam tabaco, 2,00% para os que mascavam e fumavam tabaco e 0,81% para os que só fumavam)²⁵. Foi realizado um outro estudo que pretendia estimar as lesões citogenéticas nas diferentes regiões da mucosa oral em pessoas que normalmente fumam cigarros bidi (cigarros artesanais muito consumidos na Índia). A diferença nos níveis de MN foi estatisticamente significativa entre os casos e os controlos para a mucosa oral (1,28 e 0,76) e para o palato (0,88 e 0,52), mas não para a língua (0,52 e 0,72)²².

Relativamente à associação entre o tabaco de mascar e a frequência de MN, Bonassi e colaboradores¹⁴, não encontraram diferenças estatisticamente significativas.

Álcool

O acetaldeído, o primeiro metabolito do etanol, é responsável pelo grande potencial carcinogénico do etanol²⁶. Estudos realizados em linfócitos demonstram a existência de uma associação entre o consumo de álcool e a frequência de MN nestas células¹³. Na medida em que as células orais são as primeiras a entrarem em contacto com o álcool ingerido, o seu consumo é um dos fatores avaliados para determinar se tem influência na frequência de MN em CEO. No entanto, o efeito do álcool na frequência de MN, é controverso. Apesar de se conhecer qual a ação do álcool nas células, vários estudos demonstraram não existirem diferenças estatisticamente significativas entre células expostas e células controlo^{1,14,18,20}. No entanto, outros vão de encontro aos resultados observados para os linfócitos. Reis e colaboradores²⁶, avaliaram a frequência de MN em indivíduos alcoólicos não-fumadores, tendo sido este grupo comparado com um grupo de controlo: indivíduos não-fumadores e não-alcoólicos. Neste estudo foram avaliadas a mucosa jugal e o bordo lateral da língua. O grupo dos alcoólicos teve um aumento estatisticamente significativo na frequência de MN nas células do bordo lateral da língua (0,2%), em comparação com o grupo controlo (0,0%), sendo que na mucosa jugal não foram encontradas diferenças (0,1%). Ainda assim a exposição crónica ao etanol, poderá estar associada a alterações citológicas nalgumas regiões da cavidade oral.

Dieta

Os micronutrientes desempenham uma ação importante na proteção do ADN, na medida em que constituem co-fatores de enzimas que estão envolvidas na reparação e manutenção genómica. Portanto a

presença destes micronutrientes nas quantidades ideais pode diminuir a frequência de MN, na medida em que favorecem um melhor funcionamento dos sistemas de reparação e manutenção do ADN.

A suplementação com antioxidantes e certas vitaminas do complexo B podem causar uma redução substancial da frequência de MN. Thomas e colaboradores¹⁵ afirmaram que a combinação de múltiplos nutrientes parece ser mais eficaz na redução da frequência de MN, quando folato e vitamina B12 estão normais, se comparados com efeitos individuais dos micronutrientes.

Nos primeiros estudos realizados nos anos 80 foi dada uma suplementação de folato, observando-se uma diminuição dos níveis basais de MN². Contudo, este autor refere também que num estudo efetuado na China (áreas com elevada incidência de cancro esofágico) alguns micronutrientes como o retinol, riboflavina, zinco e selénio falharam na redução da frequência de MN.

Um outro estudo quis avaliar o impacto de uma dieta saudável em pacientes não-fumadores. Neste estudo todos os participantes receberam informação sobre a importância de uma dieta equilibrada. Posteriormente, um grupo aleatório incluiu na sua dieta diária 300g de vegetais e 25ml de óleo vegetal com ácidos gordos polinsaturados, durante 8 dias. No fim desse tempo, foi avaliada a frequência de MN concluindo-se que a intervenção dietética durante um período de tempo curto não tem qualquer efeito sobre os níveis de MN (grupo controlo (0,44‰), e o grupo que alterou a dieta (0,56‰))²⁷.

Num trabalho realizado para avaliar o impacto dos diversos fatores que poderiam influenciar a frequência basal de MN na mucosa oral, verificou-se que indivíduos com consumo diário de fruta e vegetais verdes, têm uma frequência de MN mais baixa em comparação com aqueles que não consomem esse tipo de alimentos¹⁴.

Estes resultados parecem indicar que uma dieta que contenha fatores vitamínicos essenciais para uma boa regulação do ADN e antioxidantes, pode influenciar a frequência basal de MN, diminuindo-a.

1.1.3. Raios X

A radiografia é uma das ferramentas mais valiosas como meio auxiliar de diagnóstico em medicina dentária²⁸. Realizaram-se vários estudos que tentaram avaliar a possível existência de efeitos citotóxicos e genotóxicos da radiação X nas CEO, já que se sabe que a radiação pode ser mutagénica e carcinogénica.

Diversas variáveis foram testadas, em estudos que pretendiam avaliar os efeitos genotóxicos dos raios-X. Alguns estudos não associaram os raios-X à frequência de MN²⁹⁻³⁴. Contudo, um estudo que realizou a monitorização de pacientes fumadores e não-fumadores após uma ortopantomografia,

comparando a mucosa oral com o bordo lateral da língua, encontrou resultados estatisticamente significativos de genotoxicidade⁵. Também Sheikh e colaboradores³⁵ avaliaram os efeitos do raio-X na gengiva e no epitélio oral de pacientes não-fumadores, tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas nas células da gengiva, no que respeita à frequência de MN antes e após exposição ao raio-X (frequência de MN aumentou de 1,08 para 1,60 após exposição).

Um outro estudo que comparou os raios-X à tomografia computadorizada não encontrou efeitos genotóxicos associados à realização destes exames³⁶.

Assim, são necessários mais estudos para se poder determinar qual a influência dos exames radiográficos nos níveis basais de MN.

1.1.4. Radioterapia

Vários estudos indicam que a radiação ionizante danifica o ADN. Esta tem sido referida como causadora do aumento de células MN na mucosa oral em pacientes com cancro que estão a ser submetidos a radioterapia¹⁰.

Um estudo mostrou diferenças estatisticamente significativas na frequência de MN nas CEO a meio do tratamento de radioterapia em comparação com a sua fase inicial, 2,29‰ e 0,79‰, respetivamente, sendo que o tratamento durou de 5 a 7 semanas. O resultado pós-tratamento (avaliado 30-140 dias após a intervenção) mostra que a frequência de MN diminuiu para valores semelhantes aos níveis basais de MN (1,67‰)¹⁰.

Outro estudo, com pacientes de cancro da cabeça e pescoço, demonstrou resultados semelhantes. A frequência basal de células com MN na amostra aumentou de 4‰ para 51,1‰ após as 6 semanas de radioterapia, e desceu para os valores normais ao fim de 3-6 semanas após o fim da terapia¹¹.

Esta redução é atribuída ao efeito citotóxico da radiação que leva à perda de células altamente danificadas na camada basal celular, e ao aumento da morte celular na camada superficial, que é acompanhada de renovação celular.

1.1.5. Quimioterapia

Apesar dos fármacos anti-neoplásicos atuarem preferencialmente em células com níveis de proliferação mais elevados, como é o caso das células cancerígenas, estes produzem efeitos genotóxicos em células saudáveis⁷.

Num estudo elaborado por Minicucci e colaboradores, o efeito da quimioterapia foi avaliado em crianças com patologia oncológica, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de MN antes (0,45‰), e durante o tratamento (0,85‰), apesar de ter verificado um ligeiro aumento dos níveis de MN, por ação do tratamento⁷.

Como alguns destes fármacos afetam o ADN, avaliou-se a frequência de MN em enfermeiras que fazem a preparação e administração de medicamentos antineoplásicos, bem como o manuseamento de fluidos corporais de pacientes submetidos a quimioterapia. Neste estudo foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo (enfermeiras sem história de exposição ocupacional (1,86‰)), e o grupo de enfermeiras expostas a fármacos antineoplásicos (2,66‰)⁹.

Apesar dos resultados não serem ainda conclusivos, nos estudos analisados verificou-se um aumento da frequência basal de MN nos indivíduos expostos a estes agentes.

1.1.6. Outros fatores

O teste de MN tem sido amplamente usado para avaliar os danos genómicos para monitorização biológica em populações humanas expostas a vários químicos mutagénicos e carcinogénicos ou agentes físicos que estão relacionados com instabilidade genómica, por exemplo: arsénio e boro presentes na água^{37,38}, poluentes aéreos³⁹, exposição ocupacional ao cobre⁴⁰, formaldeído⁴¹⁻⁴³, chumbo^{44,45}, pesticidas⁴⁶, ozono⁴⁷, adesivos com base de solvente⁴⁸, alcatrão⁴⁹, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e gasolina¹⁴, exposição ocupacional ao pó da madeira^{50,51} e à soldagem manual a arco eléctrico⁵², entre outros.

1.2. Fatores Específicos

Existem poucos estudos sobre o papel da saúde oral nos níveis de MN nas CEO, especificamente fatores individuais como a cárie dentária, doença periodontal ou próteses⁵³.

1.2.1. Higiene Oral

Acredita-se que os hábitos da higiene oral possam influenciar o nível basal de MN nas CEO. Neste sentido, foi realizado um estudo com o objetivo de investigar uma possível associação entre o estado de saúde oral e os danos citogenéticos observados nas CEO. Foram avaliadas variáveis como o

índice de sangramento papilar, o índice de placa, a presença de bactérias (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*), o índice de CPOD (dentes Cariados, dentes Perdidos e dentes Obturados), o tipo de material de restauração e o estado periodontal e protético. As diferenças das frequências de MN dependentes da qualidade de higiene oral individual não foram estatisticamente significativas, contudo em algumas variáveis avaliadas foi encontrado um aumento da média de MN, nomeadamente no índice de sangramento papilar, no número de dentes perdidos, no tipo de material em restaurações diretas e estado periodontal. Nas variáveis índice de placa, presença de bactérias, achados protéticos, dentes cariados e dentes restaurados nenhum aumento da frequência de MN foi verificado. Apesar de não se verificar uma correlação com o estado protético, a prótese combinada (fixa e removível) apresentava uma frequência de MN mais elevada (2,83) em comparação com os pacientes portadores de prótese fixa (1,94) e com os pacientes que não tinham qualquer tipo de reabilitação oral (1,80)¹. Assim, são necessários mais estudos para avaliar a influência dos hábitos de higiene oral nos níveis de MN²¹. Os colutórios são muito utilizados como meio auxiliar de higiene oral⁵⁴, e contêm alguns componentes que podem ser citotóxicos e genotóxicos. Para detetar alterações citológicas após o uso de colutório com álcool, realizou-se um estudo em que 30 indivíduos utilizaram diariamente colutório com 26,9% de álcool durante um período de 6 meses. Como grupo controlo, foram estudados 30 indivíduos que usaram diariamente um colutório sem álcool, durante o mesmo período. No final do estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos⁵⁵. Um outro estudo avaliou o efeito da clorhexidina, do triclosan e de óleos essenciais em solução de etanol, durante 15 dias. Neste estudo não foi observado qualquer tipo de genotoxicidade⁵⁴.

1.2.2. Doença Periodontal

A doença periodontal crónica é uma condição inflamatória prevalente na população mundial. Esta doença é caracterizada por uma infeção bacteriana que resulta numa inflamação gengival que progressivamente leva a destruição gradual dos tecidos periodontais e do osso alveolar⁵⁶. Sendo inflamatória, está associada a uma produção de espécies reativas de oxigénio, que podem provocar danos no ADN, e processos carcinogénicos⁵⁷. Portanto é de grande interesse avaliar se esta condição interfere com os níveis basais de MN na mucosa oral⁵⁷.

Foi realizado um estudo por Bastos-Aires e colaboradores⁵⁷ com o objetivo de analisar as CEO com diferentes graus de saúde periodontal. Neste estudo os participantes foram divididos em controlos (periodonto saudável/periodontite leve) e casos (periodontite moderada/ grave), no final da observação, verificou-se que os pacientes com doença periodontal possuíam uma maior frequência de células com

MN (3,20), em comparação com o grupo de controlo (1,20). Este grupo de investigação realizou ainda outro estudo⁵³, para caracterizar a frequência de MN, de acordo com o estado periodontal. Foram utilizados os mesmos critérios para os indivíduos do grupo de controlo e grupo de casos. De acordo com os resultados obtidos, as diferenças entre o grupo de controlo (1,33) e o grupo dos casos (3,00) foram estatisticamente significativas.

Tal como no estudo anterior, Bloching e colaboradores encontraram também uma associação entre a doença periodontal e a frequência de MN. Neste estudo, a periodontite leve apresentou uma frequência de MN de 1,50, a periodontite moderada de 1,91 e a periodontite grave de 2,16. Estes resultados, apesar de não serem estatisticamente significativos quando comparados com a frequência de MN média neste grupo (1,91), permitem-nos suspeitar que existe uma correlação entre elas¹.

1.2.3. Restaurações dentárias

Atualmente uma grande parte da população possui restaurações dentárias quer em amálgama que contém mercúrio, quer a resinas compostas que contêm metacrilatos. Estes materiais libertam componentes na cavidade oral que se disseminam sistemicamente e podem induzir alterações citóticas e genotóxicas. Visalli e colaboradores⁵⁸ verificaram que tanto a amálgama como as resinas compostas conseguem induzir danos genotóxicos na mucosa oral. Comparando a frequência de MN em pacientes com restaurações (0,25%) com pacientes sem restaurações (0,12%) foram observadas diferenças estatisticamente significativas. A frequência é mais elevada no caso de terem restaurações em amálgama (0,50%) ou resinas compostas (0,45%) ou no caso de terem ambas (0,42%). Os efeitos genotóxicos, neste estudo foram relacionados com o número de restaurações, tendo sido confirmada esta associação, após a eliminação dos fatores de confundimento. No estudo realizado por Bloching e colaboradores¹, foi avaliado também o efeito dos tipos de materiais de restauração nas células da mucosa oral. Estes autores verificaram que as restaurações a resina composta mostraram um efeito superior à amálgama, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, quando em comparação com a frequência de MN média dos indivíduos.

A presença de restaurações de amálgama foi um dos fatores avaliados, numa investigação realizada por Khlifi e colaboradores, que observaram resultados semelhantes aos descritos¹⁶.

As coroas de níquel constituem um outro tipo de reabilitação oral para restauração de dentes em crianças. Este metal, na cavidade oral pode sofrer corrosão e deste modo causar genotoxicidade. Um estudo avaliou o efeito destas coroas em crianças no dia da colocação, 15 dias e 45 dias depois do

procedimento clínico. Os resultados demonstraram um aumento da frequência de MN ao fim de 45 dias⁵⁹.

Deste modo, a presença de restaurações dentárias pode alterar a frequência basal de MN, embora não exista consenso sobre o tipo de material mais genotóxico.

1.2.4. Arames Ortodônticos

Para a execução dos aparelhos de ortodontia, usam-se metais como níquel, cromo e ferro⁶⁰. Westphalen e colaboradores citaram que as propriedades da boca (térmicas, microbiológicas e enzimáticas), oferecem um ambiente ideal para a biodegradação de aparelhos ortodônticos, que quando presentes, ficam sujeitos a processos de corrosão, levando à libertação dos metais, que se sabe possuírem um potencial carcinogénico e mutagénico. A quantidade de metais libertados do aparelho para a saliva ou sangue são significativamente inferiores à média diária ingerida através da dieta, não chegando a concentrações tóxicas. Contudo, não pode ser excluído que mesmo em baixa concentração não possam ser suficientes para induzir efeitos biológicos em células da mucosa oral⁶⁰.

Num estudo para determinar a genotoxicidade associada a aparelhos ortodônticos fixos, em pacientes jovens (média de idade: 16 anos), verificou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de MN após 30 dias⁶⁰.

Um outro estudo avaliou os danos de ADN e também a morte celular nas CEO, em adultos que estavam a fazer tratamento ortodôntico. Neste caso não se verificou alteração na frequência de MN ao longo do tratamento⁶¹.

1.2.5. Acrílico

Os biomateriais como metilmetacrilato, um monómero de resina acrílica, têm uma variedade de aplicações dentárias, e podem causar citotoxicidade, nomeadamente quebra das cadeias de ADN, dermatite e neuropatia. Estes efeitos tóxicos são mais frequentes quando o contato ou inalação são regulares⁶².

Azhar e colaboradores realizaram um estudo para verificar a incidência de MN em CEO de técnicos dentários que estão diariamente expostos a este composto. No entanto não encontraram diferenças estatisticamente significativas na frequência de MN entre o grupo de risco (6,23) e o grupo de controlo (5,21)⁶².

1.3 Metodologia utilizada na avaliação das frequências de MN

Os procedimentos realizados e os protocolos seguidos para determinação dos níveis de MN, também têm uma influência indireta na frequência basal. No protocolo de recolha e análise de MN várias etapas são importantes: a altura em que a recolha é feita, a uniformidade da amostra, o transporte e armazenamento, a filtração celular, a fixação celular e a coloração nuclear e os critérios para identificação e contagem dos MN⁴. O facto de nem todos os estudos serem executados com o mesmo protocolo, leva a que indiretamente a frequência basal tenha um intervalo mais alargado. E deste modo é importante uma padronização do protocolo, como já foi sugerido por outros autores⁶³.

2. A frequência de MN e o cancro

Desde que se verifique um bom controlo das variáveis acima referidas, a utilização da técnica dos MN para averiguação de instabilidade genética é uma mais-valia para a deteção do risco de cancro. Para avaliarmos este risco, antes de mais, é importante conhecer o valor basal, ou seja, a frequência de MN considerada normal. Na tabela I estão representadas as frequências basais referenciadas nos artigos analisados neste trabalho.

Tabela I. Frequências basais de MN		
Autor	N	Frequência de MN/1000
Bloching et al ¹	100	1,90±0,99
Mullner et al. ²⁷	21	0,28±0,29
Minicucci et al ⁷	21	0,10±0,20
Rekhavedi et al. ⁹	60	1,86±0,62
Hintzsche et al. ¹¹	10	1,10-2,20
Minicucci et al ¹⁰	17	0,50±0,61
Sellappa et al ²⁵	15	0,81±0,66
Naderi et al. ²⁴	23	0,94±0,94
Reis et al. ²⁶	18	0,00
Bastos-aires et al ⁵³	15	1,33±0,23
Bastos-Aires et al ⁵⁷	5	1,20±0,20
D'Agostini et al. ⁵⁶	43	0,54±0,18

Depois de se definir um intervalo para a frequência basal de MN é possível comparar com a frequência de MN de pacientes com cancro, ou com lesões pré-cancerígenas, e saber determinar se o valor obtido é estatisticamente diferente ou não.

Na maioria dos estudos desenvolvidos para verificar a relação que existe entre a frequência de MN nas CEO e a presença de cancro, são analisados tumores da cavidade oral ou tecidos próximos, ou seja na zona da cabeça e do pescoço. Contudo, já existem estudos em que utilizando as CEO, se avalia a

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

relação com câncros localizados no trato digestivo e na zona do tórax, nomeadamente o cancro da mama e o cancro do pulmão.

Os resultados dos estudos que analisaram a relação da frequência dos MN em CEO com diferentes tipos de cancro estão sumarizados na tabela II.

Tabela II. Relação entre tipos de câncros e a frequência de MN em células orais esfoliadas											
Autor do estudo	Tipo de cancro	aumentamento	p	Frequência de MN		N		Nº células			
				controles	casos	Controles	casos				
Yildirin ^a	Pulmão	2,48	<0,0001	6,77±0,59	16,79±2,59	31 H; idade 57,00	14 H; Idade 60,15	1000 (%)			
	Estômago	1,49			10,08±1,43		13 H; idade 54,54				
	Colorectal	1,64			11,13±0,93		8 H; idade 54,75				
		1,77		6,54±0,69	11,60±1,48	10 M; idade 64,30					
Burgaz ^b	Carcinoma escamoso na faringe	2,33	<0,01	1,23 ± 0,93	1,38 ± 0,85 Parentes diretos	2,87 ± 1,16	31 saudáveis (27 H, 4 M); idade 45,00	34 Parentes diretos (26 M, 8 M); idade 41,20	32	59 (52 H, 7 M); idade 54,10	1500 (%)
	Carcinoma escamoso na nasofaringe								14		
	Carcinoma escamoso na cavidade oral								10		
	Carcinoma escamoso nos seios paranasais								3		
Dey ^c	Carcinoma ductal da mama	4,38	<0,0001	0,5014±0,45768		2,19±1,09	49 lesões benignas (M)		32 M	1000 (%)	
Saran ^d	Carcinoma oral	2,29	<0,05	0,21 ±0,18	0,31 ±0,24	0,48 ±0,33	176 saudáveis (141 H, 35 M) idade 30,80	138 lesões pré-canc. (118 H, 20 M) idade 29,55	129 (79 H, 50 M); idade 50,42		2000 (%)
Chatterjee ^e	Carcinoma orofaríngeo oral	Escamoso	4,00	0,01	6,12±7,64	23,7±13,09	24,5±17,93	100 saudáveis (75% H, 25% M) idade 52,24	42 lesões não malignas (73,52% H, 26,48% M) idade 53,83	63 (74,6% H, 25,4% M); idade 53,65	5000 (%)
		verrugoso									
Dórea ^f	Cancro oral	Leucoplasia	4,93	<0,0001	0,42±0,14	2,07±0,39	40 (13 H, 27 M) idade 55,53	20 (11 H, 9 M) idade 63,25	1000 (%)		
		Lesão Área normal				0,61±0,25					
Khelifi ^g	Carcinoma de células escamosas	2,34	<0,001	2,36±2,11		5,53±3,09	57(30 H, 27 M), idade 53,19		45(34 H, 11 M), idade 59,42	1000 (%)	
Bonassi ^h	Cancros oro-faríngeos					1,72					
	Cancros respiratórios					1,40					
	Outros tumores					1,94					
	Leucoplasias					1,69					

Notas: H:Homens, M: Mulheres, Idade referenciada é a idade média

^a Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de cancro e o grupo de controlo (tendo sido as variáveis sexo, idade e tabaco controladas). O cancro de pulmão foi o que mostrou uma frequência de MN mais elevada.

^b A frequência do grupo de cancro é estatisticamente significativa superior em comparação com o grupo dos parentes diretos e com o grupo de controlo. Apesar de o grupo dos parentes ter uma frequência de MN mais elevada que o grupo dos saudáveis, a diferença entre eles não é estatisticamente significativa, e portanto afirma-se que parentes diretos destes pacientes não possuem um risco aumentado de cancro. Também se pode afirmar que carcinomas escamosos da cabeça e do pescoço induzem um aumento de MN estatisticamente significativo.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

^c Neste estudo encontraram-se diferenças estatisticamente significativas na contagem de MN em CEO entre lesões da mama malignas e benignas.

^d Foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa na frequência de MN do grupo de saudáveis para o grupo de lesões pré-cancerígenas, e deste para o grupo de cancro.

^e Neste estudo, os resultados encontrados entre os grupos caso e controlo não foram significativamente diferentes. Contudo, o carcinoma de células escamosas mostrou danos ligeiramente mais elevados na mucosa em comparação com o carcinoma verrugoso. Verifica-se um aumento estatisticamente significativo de MN consoante o aumento do estadio histológico dos carcinomas I(20,3), para o II (27,9), para o III (30,1) e para o IV (30,6), sendo que do III para o IV as diferenças não são estatisticamente significativas.

Dentro das lesões não-neoplásicas, o líquen plano foi o que teve uma maior frequência de MN seguido de placas brancas benignas, fibrose e úlceras traumáticas.

^f A frequência de MN era estatisticamente mais elevada em células das áreas com lesão no grupo dos caso quando comparadas com células de áreas normais. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as células do grupo de controlo e as células de áreas normais do grupo do cancro.

^g A frequência de MN era estatisticamente mais alta no grupo de caso do que no grupo de controlo após controlo das variáveis.

^h Neste estudo Bonassi e colaboradores analisaram os dados para MN orais e outras anomalias de mais de 5000 indivíduos. Cerca de 30 laboratórios de todo o mundo participaram no estudo utilizando o mesmo protocolo para recolha e análise de MN orais. Os cancros integrantes da tabela II, são aqueles em que no fim da análise de Bonassi e colaboradores, se encontraram diferenças estatisticamente significativas relativamente com o controlo.

3. Discussão / Conclusão

As CEO permitem o estudo de efeitos genotóxicos, que poderão estar implicados no desenvolvimento de patologia oncológica, através da análise de MN⁶⁴. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos diferentes fatores de confundimento na frequência basal de MN, podendo assim ajudar a clarificar o seu papel como potencial biomarcador oncológico.

Existem falhas na padronização do protocolo para averiguação da frequência de MN. Segundo Bonassi e colaboradores¹⁴, que avaliaram diversos estudos utilizando o teste de MN em CEO, verificou-se uma variação de 38% devido à heterogeneidade na metodologia. Apesar disto, existe uma coincidência entre as frequências basais de MN apresentadas na tabela I. A frequência basal de MN apresentada nos estudos avaliados, apontam para a existência de um consenso em que a frequência basal é, aproximadamente, 1MN/1000células.

Observando a tabela II, pode-se afirmar que as frequência de MN se encontram aumentadas em pacientes com cancro, quando comparadas com os valores do grupo de controlo, inferindo desta forma que, a frequência de MN reflete uma instabilidade genética em células somáticas, associada ao desenvolvimento desta patologia¹⁷.

Embora a maioria dos estudos representados na tabela II tenham sido realizados em pacientes com cancro na cabeça e no pescoço, existem resultados com outros tipos de cancro, como é o caso do estudo realizado por Yildirim e colaboradores¹⁷ em pacientes com cancro do pulmão, estômago e colo-rectal. Neste estudo observaram-se diferenças entre os grupos avaliados sugerindo que os níveis de MN das células da cavidade oral podem servir como biomarcadores para cancro. De referir que os valores de frequência basal do grupo de controlo estavam muito elevados, no entanto, esta observação pode ser explicada pelo facto de um grande número de participantes no estudo serem fumadores. A diferença entre o valor dos casos e dos controlos per fez um aumento de 2 vezes na frequência de MN.

Um outro estudo, realizado por Dey e colaboradores⁶⁵ avaliou os níveis de MN em pacientes com cancro da mama. Neste estudo obteve-se um aumento nos níveis de MN de 4 vezes nos pacientes oncológicos em comparação com o grupo controlo, constituído por mulheres com lesões mamárias benignas. O facto de se verificar uma diferença tão elevada entre lesões malignas e benignas, sugere que os MN podem ser usados como biomarcadores oncológicos de cancros localizados fora da cavidade

oral. Os autores deste estudo referem ainda a existência de maior dano cromossómico nas células orais dos pacientes com cancro⁶⁵.

Relativamente aos estudos realizados em pacientes com cancro da cabeça e do pescoço, Burgaz e colaboradores¹⁸ observaram um aumento da frequência de MN de 2 vezes, relativamente aos valores encontrados em indivíduos saudáveis. Estes resultados corroboram as observações de um outro estudo, onde se verificou que a taxa de MN nas CEO era também 2 vezes mais elevada em pacientes com carcinoma escamoso da faringe, quando comparados com pacientes sem doença oncológica¹⁸. Saran e colaboradores¹⁹ obtiveram resultados semelhantes em termos de diferença de aumento da frequência de MN, em pacientes com carcinoma oral, apesar dos valores dos controlos e dos casos ser muito baixa. Uma explicação plausível pode estar no facto da idade do grupo de controlo ser muito mais baixa (30,80 anos) em comparação com o grupo caso (50,42 anos). O estudo de Khelifi e colaboradores¹⁶ verificou também um aumento aproximado de 2 vezes nos níveis de MN em carcinomas de células escamosas, estando aqui os valores basais ligeiramente aumentados. Neste estudo variáveis como o tabaco, o álcool, exposição ocupacional e a presença de restaurações de amálgama poderão ter contribuído para este aumento da frequência de MN, assim como a idade dos pacientes.

No estudo realizado por Chatterjee e colaboradores²⁰ em carcinomas orofaríngeos orais, verificou-se que o aumento da frequência de MN é de 4 vezes quando se compara casos com controlos, sendo a frequência basal de MN nos controlos superior à observada noutros estudos. Este aumento pode ser explicado pela percentagem de participantes do grupo de controlo que consumiam tabaco e o álcool. Dórea e colaboradores²¹ também observaram uma diferença muito acentuada nos níveis de MN entre pacientes com cancro oral e pacientes saudáveis (frequência de MN cerca de 5 vezes aumentada nos doentes oncológicos). A amplitude da diferença entre controlos e casos, pode ter sido influenciada pelo consumo de tabaco elevado (75% nos casos, e 50% nos controlos), consumo de álcool (40% nos casos e 7,5% nos controlos), consumo destas duas últimas (53,3% nos casos e 15% nos controlos) e a fraca higiene oral (95% nos casos e 89,7% nos controlos). Contudo, os investigadores utilizaram também tecido considerado normal (sem lesão cancerígena) dos próprios indivíduos, como controlo adicional. Comparando os níveis de MN entre o tecido considerado normal, e o tecido cancerígeno, verificou-se um aumento de 3.4 na amostra oncológica o que significa que este aumento da frequência de MN está relacionado com o cancro e não com os fatores de confundimento, já que as amostras foram recolhidas no mesmo indivíduo.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

Relativamente à susceptibilidade genética, sabe-se que existem cancros cuja etiologia pode ter, em parte, uma base genética. No estudo realizado por Burgaz e colaboradores¹⁸, foi avaliada esta componente, como fator de confundimento para o aumento de MN, através da observação de frequências de MN em parentes diretos de indivíduos com carcinoma. O facto de não se verificar uma diferença significativa na frequência de MN comparativamente com o grupo de controlo parece indicar que, o valor aumentado no grupo de casos tem origem na patologia oncológica e não em fatores genéticos¹⁸.

Outro aspeto relevante é o papel dos MN como biomarcador de lesões pré-cancerígenas. Na tabela II, estão descritos dois estudos que avaliaram os níveis de MN em células com este tipo de lesão. Num deles, conduzido por Saran e colaboradores¹⁹, verificou-se um aumento da frequência de MN do grupo controlo, para o grupo de casos (constituído por pacientes com lesões pré-cancerígenas, e para o grupo de pacientes com carcinomas). O mesmo se passou no estudo realizado por Chatterjee e colaboradores²⁰, sendo que neste último a diferença entre o grupo de controlo e os grupos de casos era claramente mais elevada. Isto pode ter sido influenciado pela quantidade de indivíduos que consumiam tabaco e álcool. Em ambos os estudos foi referido que consoante o estadio dos carcinomas aumentava, também a frequência de MN era mais elevada^{19,20}. Estes factos indicam que existe um aumento das lesões genéticas, podendo desta forma correlacionar a frequência de MN com o cancro, reforçando a ideia de que a frequência de MN poderá ser usada como um biomarcador oncológico, apesar da existência de falhas na metodologia e da presença de fatores de confundimento, que podem também alterar a frequência de MN obtida.

Analisando a tabela III, pode-se verificar que muitos dos resultados encontrados constituem uma base para os estudos futuros de modo a continuar a avaliação dos fatores que são importantes ter em conta para obter uma frequência basal de MN real, enquanto outros formam um conjunto de fatores que, comprovadamente, são capazes de alterar a frequência basal de MN.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

Tabela III. Resultados da análise dos fatores gerais e específicos				
Fator	Resultados de Estudos		Prospetivas futuras	Controlo
Idade	Diferenças estatisticamente significativas	A frequência de MN aumenta com a idade		Sim
Género	Controverso	Alguns estudos afirmam que as mulheres têm frequências maiores, enquanto que outros afirmam que são os homens com maior frequência de MN.	São necessários resultados mais concretos sobre a influência do sexo na frequência de MN.	Sim
Tabaco	Diferenças estatisticamente significativas	Os indivíduos fumadores apresentam frequências de MN maiores do que indivíduos não fumadores. Tanto o tabaco de fumar como de mascar apresentam resultados estatisticamente significativos.	É preciso avaliar influência de: número de cigarros e de número de anos de fumador, e comparar se as diferentes formas de tabaco têm influência diferente na frequência de MN	Sim
Álcool	Controverso	O consenso geral é de que o álcool é um factor muito importante a analisar, mas muitos estudos falham na apresentação de resultados estatisticamente significativos.	São necessários mais estudos que eliminem o fator tabaco, para assim conseguir o efeito isolados do álcool.	Sim
Dieta	Diferenças mas estatisticamente não significativas	Uma dieta rica em antioxidantes diminui a frequência de MN	Dever-se-á realizar mais estudos para averiguar o grau de influência da dieta, e que alimentos mais influência têm.	Sim
Radioterapia	Diferenças estatisticamente significativas	Induz uma frequência mais elevada de MN, sendo que após o tratamento a frequência basal volta para valores semelhantes ao inicial.		Sim
Quimioterapia	Inconclusivo	Apesar de os resultados não serem significativos, verifica-se um aumento com a quimioterapia, tanto em pacientes com cancro como em pessoal hospitalar envolvido nestes tratamentos	É necessário realizar mais estudos para encontrar resultados estatisticamente significativos e mais concretos, e avaliar se tal como na radioterapia, os efeitos após término de tratamento findam.	Sim
Raio-X	Inconclusivo	Na maioria, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas após a exposição a este fator	Mais estudos são precisos para que se determine se o raio-X tem efeito ou não sobre a frequência de MN	?
Hábitos de Higiene Oral	Diferenças estatisticamente não significativas	Apesar de em algumas sub-variáveis como o índice de sangramento, números de dentes perdidos se verificar um aumento estatisticamente não significativo da frequência de MN	É importante realizar mais estudos dirigidos para esta variável, para averiguar a possível relação deste fator com a frequência de MN, tentando eliminar os fatores acima.	?
Doença Periodontal	Diferenças estatisticamente significativas	A presença de doença periodontal induz um aumento na frequência de MN		Sim
Restaurações dentárias	Diferenças estatisticamente não significativas	Encontraram-se resultados onde se verificava aumento da frequência de MN	Mais estudos são essenciais para compreender o grau de envolvimento desta variável, sendo importante saber se diferentes materiais têm efeitos diferentes na frequência de MN ou não	Sim
Arames ortodónticos	Diferenças estatisticamente não significativas	Encontrou-se um aumento da frequência de MN, apesar desta não ser estatisticamente significativa.		?
Acrílico	Diferenças estatisticamente significativas		Deve-se realizar mais estudos neste sentido para avaliar a sua influência	?

A idade e o género constituem variáveis demográficas muito importantes¹⁵ que são tidas em conta na maioria dos protocolos de avaliação dos MN, e devem continuar a ser controladas, mesmo se os resultados sobre o género são inconclusivos.

Em relação ao tabaco é possível afirmar que este provoca danos genotóxicos nas células da mucosa oral e tanto os químicos presentes no fumo, como o tabaco de mascar, são capazes de provocar genotoxicidade^{20,66}. É importante ter sempre o tabaco em conta, para que seja possível avaliar corretamente diversas variáveis sem a sua influência.

Relativamente ao álcool, Bloching e colaboradores¹ considera-o como fator de relevância genotóxica. Relativamente ao seu efeito nas CEO os resultados não são conclusivos, mas explicam-se em parte pela natureza das amostras dos estudos que foram efetuados até à data, já que restringem indivíduos com consumo diário de álcool muito elevado, não permitindo avaliar corretamente o efeito deste fator^{20,67}. Outro aspecto importante a ter em conta é o contexto internacional, em que se verifica uma heterogeneidade entre culturas, nomeadamente no tipo de bebidas e os hábitos de consumo de álcool, que induzem uma elevada alteração na intensidade da exposição¹⁴. Na maioria dos estudos verifica-se que os indivíduos que consomem álcool, também são fumadores de tabaco, sendo portanto complicado isolar a influência individual do álcool⁶⁸. A associação destas duas variáveis possui um efeito sinérgico aumentando significativamente o número de MN^{61,68}. Tendo sido o álcool associado a alterações citológicas carcinogénicas²⁶, e estando o seu efeito comprovado sobre a frequência de MN em linfócitos, pode-se considerar um factor importante a ter em conta.

O fator dieta é difícil de analisar, já que a interpretação dos estudos de componentes isolados da dieta devem ter em conta a heterogeneidade da dieta em si, e da informação fornecida¹⁴. Num estudo referido anteriormente²⁷, o efeito deste teste foi avaliado no espaço de 8 dias, o que se pode considerar pouco na medida em que é espectável que o efeito da dieta na estabilidade genómica possa ocorrer mais a longo prazo. Contudo é de consenso geral que os efeitos antioxidantes derivados do consumo de fruta e legumes verdes estão associados a uma diminuição da frequência de MN, sendo portanto um fator a controlar.

É do conhecimento geral que os raios X provocam alterações celulares, sendo o seu uso controlado. Nos estudos avaliados, não se observou alterações nos níveis de MN em células expostas a esta radiação. No entanto, o tempo médio entre a exposição das células aos raios X e a recolha da amostra para análise de MN, foi de 10 dias. Segundo Thomas e colaboradores⁴, o tempo de migração celular desde a camada basal até à superfície queratinizada da mucosa oral é de 7 a 21 dias. Deste modo, para avaliar o efeito dos raios X em CEO, deveriam ser feitas recolhas e análises nas células durante este período, para assim obter resultados mais fidedignos.

Já a radioterapia é capaz de alterar a frequência basal de MN, mas no fim do tratamento os valores diminuem para valores próximos dos basais. Nos estudos que abordaram este fator, o valor basal considera-se elevado (2,29¹⁰ e 4,00¹¹), o que se pode explicar pela presença de doença oncológica.

Quanto à quimioterapia, os efeitos lesivos dos fármacos utilizados são observados tanto em células somáticas como em células germinativas, aumentando a incidência de tumores secundários,

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

assim como a incidência do tumor primário na descendência (quando a quimioterapia é administrada em idades reprodutivas). Este efeito pode justificar o aumento do número de tumores secundários, em sobreviventes de cancro pediátrico⁷. É também interessante observar que o simples manuseamento destes fármacos induz, por si só, um aumento da frequência de MN.

Apesar de não se encontrarem resultados conclusivos em relação à higiene oral, deve-se apostar em estudos dirigidos para esta variável. Isto porque as células recolhidas da mucosa oral estão sujeitas a todos os fatores envolventes da cavidade oral, incluindo o índice de CPO e o uso de meios auxiliares de higiene como o colutório. Portanto, um melhor conhecimento sobre o efeito destas variáveis sobre a frequência de MN é uma mais-valia para a caracterização deste biomarcador.

A doença periodontal, sendo bastante prevalente, e atendendo a que parece aumentar os níveis basais de MN de forma estatisticamente significativa, deve ser controlada sempre que se pretender utilizar os níveis de MN nas CEO, como biomarcador oncológico.

Relativamente a materiais utilizados na Medicina Dentária, verificou-se que tanto as restaurações de amálgama, como as de compósito demonstraram potencial genotóxicos^{1,16,58}, mas é necessária a realização de mais estudos para confirmar o grau de influência de cada um dos tipos individualmente. Já os metais que constituem os arames ortodônticos (níquel, titânio, cobre) não mostraram qualquer efeito sobre a frequência de MN⁶⁰. Sabe-se que a corrosão de metais é um processo biológico, e portanto este pode ocorrer na boca quando estes metais são lá colocados. O acrílico não provocou alterações na frequência de MN nas CEO, não havendo dados sobre o seu efeito na mucosa oral⁶². Desta forma, é importante a realização de mais estudos no sentido de analisar se a corrosão que se verificar é ou não significativa de forma a conseguir alterar a frequência de MN.

Apesar de serem ainda necessários mais estudos para validar o teste dos MN nas células esfoliadas orais como biomarcador oncológico, podemos concluir que este pode ser usado como detetor de instabilidade genómica nas células somáticas do organismo. Existem diversos fatores suspeitos de alterar a frequência de MN, pelo que devem efetivamente ser controlados de forma a permitir a padronização dos valores de frequência basal.

Ainda assim, pode considerar-se que o teste dos MN constitui um biomarcador oncológico muito promissor para cancro da cabeça e do pescoço, e para cancro da zona do tórax e abdómen (mama, pulmão, estômago). Sendo que pode igualmente ser utilizado em lesões pré-cancerígenas na cavidade oral.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

Estudos adicionais com tipos de cancros específicos, nomeadamente cancro oral, pulmões, estômago devem ser realizados com o intuito de confirmar a ligação entre a presença de MN e a carcinogénese.

Referências Bibliográficas

1. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.* 2008;44(3):220–6. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.02.002.
2. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):184–91. doi:10.4103/0973-1482.98968.
3. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, 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. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2008;659:93–108. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007.
4. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825–37. doi:10.1038/nprot.2009.53.
5. Angelieri F, de Cássia Gonçalves Moleirinho T, Carlin V, Oshima CTF, Ribeiro DA. Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clin Oral Investig.* 2010;14(6):669–74. doi:10.1007/s00784-009-0345-6.
6. Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML. Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *Int J Morphol.* 2013;31(2):650–657. doi:10.4067/S0717-95022013000200050.
7. Minicucci EM, Ribeiro DA, de Camargo B, Costa MC, Ribeiro LR, Favero Salvadori DM. DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumours undergoing chemotherapy. *Clin Exp Med.* 2008;8(2):79–85. doi:10.1007/s10238-008-0161-3.
8. Bolognesi C, Fenech M. *Genotoxicity Assessment.* (Dhawan A, Bajpayee M, eds.). Totowa, NJ: Humana Press; 2013:191–207. doi:10.1007/978-1-62703-529-3.
9. Rekhadevi P V, Sailaja N, Chandrasekhar M, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis.* 2007;22(6):395–401. doi:10.1093/mutage/gem032.
10. MINICUCCI EM, KOWALSKI LP, MAIA MAC, et al. Cytogenetic Damage in Circulating Lymphocytes and Buccal Mucosa Cells of Head-and-neck Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *J Radiat Res.* 2005;46(2):135–142. doi:10.1269/jrr.46.135.
11. Hintzsche H, Polat B, Schewe V, et al. Micronucleus formation kinetics in buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Toxicol Lett.* 2012;212(1):33–7. doi:10.1016/j.toxlet.2012.04.020.
12. Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis.* 2011;26(1):51–6. doi:10.1093/mutage/geq064.
13. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26:43–49. doi:10.1093/mutage/geq050.
14. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, et al. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3):88–97. doi:10.1016/j.mrrev.2011.06.005.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

15. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):69–76. doi:10.1093/mutage/geq072.
16. Khelifi R, Trabelsi-Ksibi F, Chakroun A, Rebai A, Hamza-Chaffai A. Cytogenetic abnormality in exfoliated cells of buccal mucosa in head and neck cancer patients in the Tunisian population: impact of different exposure sources. *Biomed Res Int*. 2013;2013:905252. doi:10.1155/2013/905252.
17. Yildirim IH, Yesilada E, Yologlu S. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Russ J Genet*. 2006;42(5):573–577. doi:10.1134/S1022795406050152.
18. Burgaz S, Coskun E, Demircigil GC, et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. *Mutagenesis*. 2011;26(2):351–60. doi:10.1093/mutage/geq101.
19. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol*. 2008;44(4):354–60. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.002.
20. Chatterjee S, Dhar S, Sengupta B, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol Mech Methods*. 2009;19(6-7):427–33. doi:10.1080/15376510903127530.
21. Dórea LTM, Meireles JRC, Lessa JPR, et al. Chromosomal damage and apoptosis in exfoliated buccal cells from individuals with oral cancer. *Int J Dent*. 2012;2012:457054. doi:10.1155/2012/457054. foliated buccal cells . *Int J Dent*. 2012;2012:457054. doi:10.1155/2012/457054.
22. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res*. 2004;561(1-2):15–21. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.03.001.
23. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(4):835–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600936>.
24. Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012;55(4):433–8. doi:10.4103/0377-4929.107774.
25. Sellappa S, Balakrishnan M, Raman S, Palanisamy S. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. *J Oral Sci*. 2009;51(2):289–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550099>.
26. Reis S, Santo AE. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Brazilian oral ...* 2006;20(2):97–102. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/bor/v20n2/a02v20n2.pdf>. Accessed May 11, 2014.
27. Müllner E, Brath H, Nersesyan A, et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. *Mutagenesis*. 2014;29(1):1–6. doi:10.1093/mutage/get056.
28. Gonçalves FA. Comparison of cephalometric measurements from three radiological clinics. 2006;20(2):162–166.
29. Angelieri F, de Oliveira GR, Sannomiya EK, Ribeiro D a. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. *Pediatr Radiol*. 2007;37(6):561–5. doi:10.1007/s00247-007-0478-1.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

30. Popova L, Kishkilova D, Hadjidekova VB, et al. Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2007;36(3):168–71. doi:10.1259/dmfr/29193561.
31. Lorenzoni DC, Cuzzuol Fracalossi AC, Carlin V, Araki Ribeiro D, Sant' Anna EF. Cytogenetic biomonitoring in children submitting to a complete set of radiographs for orthodontic planning. *Angle Orthod.* 2012;82(4):585–90. doi:10.2319/072311-468.1.
32. Ribeiro D a, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. *Radiat Med.* 2008;26(6):325–30. doi:10.1007/s11604-008-0232-0.
33. Angelieri F, Carlin V, Saez DM, Pozzi R, Ribeiro D a. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010;39(7):437–40. doi:10.1259/dmfr/24791952.
34. Ribeiro D a, de Oliveira G, de Castro G, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008;37(7):404–7. doi:10.1259/dmfr/58548698.
35. Sheikh S, Pallagatti S, Grewal H, Kalucha A, Kaur H. Genotoxicity of digital panoramic radiography on oral epithelial tissues. *Quintessence Int.* 2012;43(8):719–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034425>.
36. Lorenzoni DC, Fracalossi ACC, Carlin V, Ribeiro DA, Sant'anna EF. Mutagenicity and cytotoxicity in patients submitted to ionizing radiation. *Angle Orthod.* 2013;83(1):104–9. doi:10.2319/013112-88.1.
37. Bartolotta SA, Pacskowski MG, Hick A, Carballo MA. Micronuclei assay in exfoliated buccal cells from individuals exposed to arsenic in Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011;61(2):337–43. doi:10.1007/s00244-010-9607-1.
38. Korkmaz M, Uzgören E, Bakirdere S, Aydin F, Ataman OY. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ Toxicol.* 2007;22(1):17–25. doi:10.1002/tox.20229.
39. Mondal NK, Mukherjee B, Das D, Ray MR. Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutat Res.* 2010;697(1-2):47–54. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.02.006.
40. Lewińska D, Palus J, Stepnik M, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2007;80(5):371–80. doi:10.1007/s00420-006-0130-7.
41. Ladeira C, Viegas S, Carolino E, Prista J, Gomes MC, Brito M. Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde--the case of histopathology laboratories. *Mutat Res.* 2011;721(1):15–20. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.11.015.
42. Nielsen GD, Larsen ST, Wolkoff P. Recent trend in risk assessment of formaldehyde exposures from indoor air. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):73–98. doi:10.1007/s00204-012-0975-3.
43. Ladeira C, Viegas S, Carolino E, Gomes MC, Brito M. The influence of genetic polymorphisms in XRCC3 and ADH5 genes on the frequency of genotoxicity biomarkers in workers exposed to formaldehyde. *Environ Mol Mutagen.* 2013;54(3):213–21. doi:10.1002/em.21755.
44. Khan MI, Ahmad I, Mahdi AA, et al. Elevated blood lead levels and cytogenetic markers in buccal epithelial cells of painters in India: genotoxicity in painters exposed to lead containing paints. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2010;17(7):1347–54. doi:10.1007/s11356-010-0319-x.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

45. Grover P, Rekhadevi P V, Danadevi K, Vuyyuri SB, Mahboob M, Rahman MF. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213(2):99–106. doi:10.1016/j.ijheh.2010.01.005.
46. Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*. 2011;26(1):19–26. doi:10.1093/mutage/geq070.
47. Chen C, Arjomandi M, Qin H, Balmes J, Tager I, Holland N. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*. 2006;21(2):131–7. doi:10.1093/mutage/gel007.
48. Heuser VD, de Andrade VM, da Silva J, Erdtmann B. Comparison of genetic damage in Brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. *Mutat Res*. 2005;583(1):85–94. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.03.002.
49. Giri SK, Yadav A, Kumar A, et al. CYP1A1 gene polymorphisms: modulator of genetic damage in coal-tar workers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3409–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994769>.
50. Rekhadevi P V, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis*. 2009;24(1):59–65. doi:10.1093/mutage/gen053.
51. Celik A, Kanik A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ Mol Mutagen*. 2006;47(9):693–8. doi:10.1002/em.20257.
52. Sudha S, Kripa SK, Shibily P, Joseph S, Balachandar V. Biomonitoring of genotoxic effects among shielded manual metal arc welders. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(4):1041–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21790248>.
53. Bastos-Aires D, Azevedo Á, de Lurdes Pereira M, Pérez-Mongiovi D, Teixeira A. Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *J Dent Sci*. 2013;8(2):200–204. doi:10.1016/j.jds.2012.12.007.
54. Ros-Llor I, Lopez-Jornet P. Cytogenetic analysis of oral mucosa cells, induced by chlorhexidine, essential oils in ethanolic solution and triclosan mouthwashes. *Environ Res*. 2014;132C:140–145. doi:10.1016/j.envres.2014.03.032.
55. Bagan J, Vera-Sempere F, Marzal C, Pellin-Carcelen A, Marti-Bonmati E, Bagan L. Cytological changes in the oral mucosa after use of a mouth rinse with alcohol. A prospective double blind control study. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2012;17(6):e956–e961. doi:10.4317/medoral.18843.
56. D'Agostini F, Calcagno E, Micale RT, La Maestra S, De Flora S, Cingano L. Cytogenetic analysis of gingival epithelial cells, as related to smoking habits and occurrence of periodontal disease. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(1):71–5. doi:10.1016/j.ijheh.2012.01.005.
57. Bastos-Aires D, Azevedo Á, Pereira MDL, Perez-Mongiovi D, Teixeira A. Estudo preliminar dos tipos celulares da mucosa oral em pacientes com doença periodontal. *Rev Port Estomatol Med Dentária e Cir Maxilofac*. 2012;53(2):99–102. doi:10.1016/j.rpemd.2012.01.002.
58. Visalli G, Baluce B, La Maestra S, et al. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. *Arch Toxicol*. 2013;87(1):179–87. doi:10.1007/s00204-012-0915-2.
59. Morán-Martínez J, Monreal-de Luna KD, Betancourt-Martínez ND, et al. Genotoxicity in oral epithelial cells in children caused by nickel in metal crowns. *Genet Mol Res*. 2013;12(3):3178–85. doi:10.4238/2013.August.29.1.

Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico

60. Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res*. 2008;7(4):1259–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065761>.
61. Angelieri F, Carlin V, Martins R a, Ribeiro D a. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(4 Suppl):e399–404. doi:10.1016/j.ajodo.2009.06.029.
62. AZHAR DA, SYED S, LUQMAN M, ALI AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dent Mater J*. 2013;32(3):519–521. doi:10.4012/dmj.2012-322.
63. Fenech M, Holland N, Zeiger E, et al. The HUMN and HUMN_xL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis*. 2011;26(1):239–45. doi:10.1093/mutage/geq051.
64. Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*. 2009;24(4):295–302. doi:10.1093/mutage/geb019.
65. Dey P, Samanta S, Susheilia S. Micronucleus assay in buccal smears of breast carcinoma patients. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(8):664–6. doi:10.1002/dc.21589.
66. Chandirasekar R, Suresh K, Sasikala K, et al. Genotoxicity assessment in smokeless tobacco users: a case-control study. *Toxicol Ind Health*. 2013;29(2):216–23. doi:10.1177/0748233711432571.
67. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(4):835–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600936>.
68. Ribeiro D a, Sannomiya EK, Pozzi R, Miranda SR, Angelieri F. Cellular death but not genetic damage in oral mucosa cells after exposure to digital lateral radiography. *Clin Oral Investig*. 2011;15(3):357–60. doi:10.1007/s00784-010-0402-1.

Anexos