

AValiação da Incidência de Micronúcleos na Mucosa Oral de Usuários de Narguilé

EVALUATION OF MICRONUCLEUS INCIDENCE IN THE ORAL MUCOSA OF NARGUILÉ USERS

Dayeli Silveira PISSINATI¹, Wesley Joventino PRATI^{1*} Francisco Carlos da SILVA²

1 - Acadêmicos do curso de graduação em Ciências Biológicas do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

2 - Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicado a Saúde, Docente do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

Autor correspondente: wesleyprati.jov@gmail.com

RESUMO

A micronucleação é um tipo de alteração que ocorre devido à exposição das células a agentes mutagênicos, sendo um marcador biológico, indicativo, para o surgimento de câncer e outras doenças. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil dos usuários de narguilé quanto a faixa etária, frequência e tempo de uso e ainda a incidência de micronúcleos na mucosa oral desses indivíduos. O estudo possui caráter exploratório descritivo do tipo transversal, executado por meio da aplicação de um questionário e coleta de material biológico dos participantes. Os resultados foram tabelados e submetidos à análise estatística pelo Teste Tukey (ANOVA), utilizando-se $P < 0,05$ como grau de significância. Os resultados obtidos demonstraram que indivíduos com idade entre 18 a 40 anos são os mais adeptos ao narguilé. No entanto, a frequência do uso entre esses indivíduos é diferente entre os níveis etários, de forma que 76% dos usuários com faixa etária entre 18 a 25 anos fazem o uso de maneira frequente e 24% usam raramente. Já entre indivíduos com idade entre 26 a 40 anos, 64% usam frequentemente e 36% usam raramente. O ensaio citogenético demonstrou um aumento da frequência de micronúcleos presentes em células de mucosa oral dos indivíduos usuários em relação aos indivíduos não usuários, além disso, foi possível relacionar aumento significativo dos micronúcleos com o tempo de exposição. Dessa maneira, conclui-se que as substâncias presentes na fumaça do narguilé são responsáveis por alterações nas células do organismo, causando efeitos prejudiciais à saúde, servindo de alerta aos usuários do narguilé dos riscos recorrentes ao uso do mesmo.

Palavras-chave: Uso de tabaco. Alteração citogenética. Biomarcadores.

ABSTRACT

Micronucleation is a type of alteration that occurs due to the exposure of cells to mutagenic agents, being a biological marker indicative for the onset of cancer and other diseases. The objective of this study was to characterize the profile of hookah users regarding age, frequency and duration of use and also the incidence of micronuclei in the oral mucosa of these individuals. The study has a descriptive cross-sectional exploratory character, performed by applying a questionnaire and collecting biological material from the participants. The results were tabulated and subjected to statistical analysis by the Tukey Test (ANOVA), using $P < 0.05$ as a degree of significance. The results showed that individuals aged 18 to 40 years are the most adept for hookah. However, the frequency of use among these individuals differs between age levels, so that 76% of users aged 18-25 make frequent use and 24% use rarely. Among individuals aged 26 to 40 years, 64% use frequently and 36% use rarely. The cytogenetic assay showed an increase in the frequency of micronuclei present in oral mucosa cells of users compared to nonusers, and it was possible to relate significant increase of micronuclei with exposure time. Thus, it is concluded that the substances present in hookah smoke are responsible for changes in the body's cells, causing harmful effects on health, serving as a warning to users of the hookah of the recurrent risks of using it.

Keywords: Tobacco use. Cytogenetic alteration. Biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

Entre as diferentes formas de se consumir o tabaco, a utilização do narguilé ou cachimbo de água como também é conhecido, caracteriza-se atualmente como a forma mais comum e

utilizada pelos dependentes químicos jovens [1]. De certa forma, o tabaco é o composto mais utilizado e consumido através desse equipamento, sendo o mesmo derivado da planta *Nicotiana tabacum*, pertencente à família Solanaceae, que por vez, tem sido consumida a mais de 4 mil anos por persas e indianos, apesar do alto consumo, seu processo de industrialização só teve início no continente americano, se expandindo posteriormente para os demais continentes devido seu alto valor econômico [2].

Conforme explica o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva – INCA (2017) [3], o narguilé é constituído por um forninho no qual o tabaco é colocado acima do carvão aquecido, estando separados por uma lâmina com furos e de um corpo que fica submerso pela água de um vaso, resultando em uma fumaça que chega ao usuário pelo bocal. Com isso, o usuário do narguilé ao ingerir a fumaça produzida pela combustão do carvão e tabaco aquecido, se expõe a muitas substâncias perigosas, cerca de 4.720 substâncias tóxicas diferentes, das quais muitas são consideradas cancerígenas, como a nicotina, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aldeídos voláteis, monóxido de carbono (CO), óxidos nitrosos (NO), alcatrão, nanopartículas e metais pesados, todos sendo potenciais mediadores no desenvolvimento de câncer de pulmão, boca, bexiga e estômago [2,4,5].

De forma rápida o tabaco tornou-se um problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mortes precoces e incapacidade em todo o mundo [2,6]. Apesar do assunto ser muito discutido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) [7], inúmeros casos de doenças relacionadas ao tabaco são notificados todos os anos, principalmente no continente americano, onde se concentra o maior número de usuários.

Segundo a Organização Mundial de Saúde [7], o Brasil é o oitavo país com o maior número de fumantes, com 7,1 milhões de mulheres e 11,1 milhões de homens. O ministério da saúde desde 1980 vem incluindo ações ao Programa Nacional de Controle ao Tabagismo (PNCT), buscando reduzir o número de fumantes e conseqüentemente a mortalidade por causa do seu consumo [7]. Outro mecanismo importante é a Legislação através da Lei 9.294/96, no Art. 2º, que proíbe o consumo de qualquer forma de derivados do tabaco em lugares coletivos [8]. Além disso, estudos demonstram a necessidade de uma abordagem mais eficaz quanto aos efeitos do narguilé no organismo, de forma a reduzir o número de usuários regulares, afim de minimizar os problemas causados pelo alto consumo de produtos oriundos do tabaco [4,9].

Estudo realizado por Pisciotta *et al* (2018) [10], esclarece que o uso frequente de narguilé ocasiona inúmeros resultados negativos para a saúde, a exemplo temos o aumento dos batimentos cardíaco, pressão arterial elevada, câncer de pulmão e intoxicação por monóxido de

carbono. Além disso, de acordo com estudos, o tabagismo é responsável por 45% das mortes por infarto, 85% das mortes por doenças relacionadas aos pulmões, 25% das mortes por acidente vascular cerebral, e 30% das mortes por câncer, atingindo um número de 4,9 milhões de mortes por ano, todas essas estimativas servem para atribuir os impactos causados pelo consumo de tabaco [7,11].

Para Faria & Braga *et al* (2015) [12] o uso de narguilé também se relaciona a mudanças epigenéticas e modificações transcricionais. Todavia, os principais fatores que atuam no surgimento do câncer são os fatores genéticos e os fatores relacionados aos hábitos das pessoas[1,2,12]. Com isso, compreender essas alterações celulares, torna-se importante para acompanhar o grau de exposição a substâncias tóxicas e a progressão do tratamento de indivíduos com câncer [12]. Através de estudos voltados para a detecção de alterações celulares, o teste de micronúcleos tem se demonstrado um importante indicador de doenças [12]. Dessa forma o objetivo deste estudo foi caracterizar os perfis dos usuários de narguilé quanto à faixa etária, frequência relativa do uso, tempo de uso e a incidência de micronúcleos na mucosa oral.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa desenvolvida teve caráter exploratório descritivo do tipo transversal por meio da aplicação de um questionário semiestruturado à uma população usuário de narguilé (grupo exposto) e não usuário (grupo controle) no município de Ji-Paraná do estado de Rondônia.

2.1 População de estudo

A abordagem dos voluntários usuários ou não que participaram desta pesquisa foi feita aleatoriamente por conveniência, ou seja, com esta técnica os participantes foram selecionados de acordo com a acessibilidade dos mesmos e os demonstraram estar prontamente disponíveis a responder o questionário e participar de todo o estudo, compondo um grupo de 141 indivíduos, sendo 81 indivíduos usuários (G1 e G2) e 60 indivíduos do grupo controle (GC).

Os indivíduos foram abordados através de questionários contendo indagações a respeito da idade, sexo, e hábito de fumar, sendo esclarecidos sobre os objetivos do estudo por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e teve a garantia do pesquisador sobre o sigilo total de qualquer tipo de informações pessoais. A pesquisa foi realizada de acordo com

a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que institui justiça e ética. O projeto da pesquisa foi enviado para análise Comitê de Ética em pesquisa do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA) e foi aprovado sob o número: 85983818.3.0000.5297.

2.2 Coleta da amostra biológica

A coleta das células da mucosa oral, a fixação do material e a coloração seguiu o protocolo descrito por Thomas *et al.* (2009) [13], com modificações. O material biológico foi coletado com auxílio de escovas de *cytobrush* retirando-se a amostra do epitélio jugal direito e esquerdo e bordas na língua, após um enxágue bucal realizado com água com a função de retirar material bruto que pudesse constituir um artefato no momento da análise microscópica.

As amostras coletadas foram depositadas e transportadas em tubos Falcon de 15mL contendo a solução tampão Tris-HCl pH 6,8 (0,01 M Tris-HCl (Merck), 0,1 M EDTA tetrassódico (Vetec), 0,02 M cloreto de sódio (Merck) e enviadas para o laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná (*UniSL*), onde foram então processadas.

2.3 Preparação das amostras

Os tubos contendo as amostras foram levados ao vórtex a 1000 RPM por 1 minuto para homogeneização da amostra e retirada à escova de *Cytobrush*, após, o tubo foi levado a centrifuga a 1000 RPM por 10 minutos, desprezado o sobrenadante e adicionado mais 4ml de solução tampão, esse processo foi repetido 2 vezes. O procedimento auxilia na remoção de bactérias e restos alimentares que podem prejudicar a contagem. Logo após foi adicionado a amostra contida no tubo, a solução fixadora de Metanol e Ácido acético 3:1 e deixado a 10°C na geladeira por 16 horas. Após esse período foi levada mais uma vez para a centrifuga e desprezado o sobrenadante formando o *pellet* da amostra. O *pellet* foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta graduada, e então cerca de 40µl da solução contendo as amostras foram transferidas para lâminas, secas ao ar livre por 30 min. ou mais, e posteriormente, fixadas em metanol a 80% e coradas com Kit Panótico Rápido LB [14]

2.4 Indicadores de genotoxicidade da célula

As lâminas foram feitas em duplicata para cada indivíduo e analisadas sobre objetiva de imersão, avaliou-se as células e os micronúcleos de acordo com os seguintes critérios sugeridos por Thomas (2009) e colaboradores [13]: perímetro redondo que sugere uma membrana; ter

menos que um terço do diâmetro do núcleo principal, sendo grande o suficiente para discernir a forma e a cor; coloração rosa em um campo iluminado; intensidade de coloração similar ao do núcleo; textura similar ao do núcleo; mesmo plano focal que o núcleo; ausência de sobreposição, ou ligação com o núcleo. A análise consistiu de uma avaliação de 1000 células de cada duplicata da amostra.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 7.01 por meio da análise de variância (*Oneway* ANOVA), seguida do teste de Tukey considerando os resultados significativos para $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram que indivíduos com idade entre 18 a 40 anos são os mais adeptos ao narguilê. No entanto, a frequência do uso entre esses indivíduos é diferente entre os níveis etários, de forma que 76% dos usuários com faixa etária entre 18 a 25 anos fazem o uso de maneira frequente e 24% usam raramente. Já entre indivíduos com idade entre 26 a 40 anos, 64% usam frequentemente e 36% usam raramente. O ensaio citogenético demonstrou um aumento significativo da frequência de micronúcleos presentes em células de mucosa oral dos indivíduos usuários em relação aos indivíduos não usuários, além disso, foi possível relacionar aumento significativo dos micronúcleos com o tempo de exposição (Figura 1).

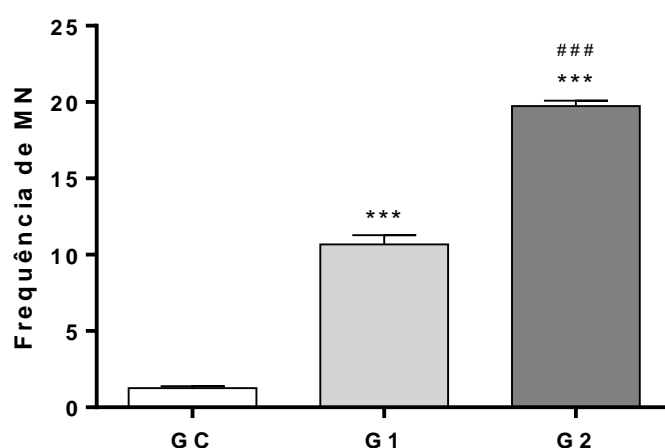


Figura 1: Frequência de micronúcleos (MN) em células de mucosa oral (para cada 2000 células analisadas) em G1 (fumantes de narguilê até um ano), G2 (fumantes de narguilê por mais de um ano) e GC (grupo controle não

fumantes). Diferença estatisticamente significativa em comparação com ao grupo controle, *** $p < 0,001$ e em relação ao grupo de fumantes até um ano ### $p < 0,001$ (teste ANOVA, Tukey).

4. DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras consequências, o uso do narguilé é comum entre jovens e adolescentes, doenças como o câncer poderá futuramente ter seu índice elevado visto a frequência do consumo de tabaco e outras substâncias químicas consumidas através do narguilé [9]. Os estudos semelhantes voltados a esse tema têm demonstrado resultados importantes que devem ser considerados. A frequência do uso de narguilé tem elevado a frequência de micronúcleos em células da mucosa oral dos jovens usuários, com uma ocorrência ainda maior, quando o uso é frequente e por tempo prolongado [15]. Souza *et al.*, (2014) [14] corrobora com o nosso estudo, quando demonstra que houve positividade elevada de micronúcleos na mucosa oral de indivíduos que faziam o uso de tabaco, já no grupo controle, ou seja, nos indivíduos que não faziam o uso a frequência foi considerada normal.

É evidente as consequências do consumo de tabaco e outras drogas contendo substâncias genotóxicas ao organismo, apontando na maioria dos estudos a frequência de micronúcleos significativa nos indivíduos usuários [9,15]. Tais estudos revelam que indivíduos expostos a essas substâncias estão mais suscetíveis a alterações nas células da mucosa do que indivíduos que não estão expostos [1,2,9,15].

O narguilé é tanto prejudicial quanto às outras formas de ingestão, e pode causar riscos ainda maiores à saúde. Um fato importante sobre de produtos contendo a nicotina, é que o seu uso frequente gera tolerância, fazendo com que o indivíduo usuário consuma cada vez mais e em quantidades maiores buscando obter os mesmos efeitos da substância [2].

Além disso, a nicotina oriunda do tabaco presente na fumaça do narguilé e nas outras formas de consumo do tabaco, causa dependência, e seu consumo frequente provoca o surgimento de leucoplaquia, doença periodontal, perda óssea, abrasão dos dentes, e outras diversas doenças [1,2]. Além disso, essa substância causa efeitos diversos no organismo, causando alterações no humor, perda de apetite, e relaxamento da musculatura, levando o usuário a ter o desejo de continuar o uso [16].

Segundo Malta *et al.*, (2018) [2] o principal fator que contribui para o câncer de boca é o consumo do tabaco, isso deve-se à enorme quantidade de substâncias tóxicas presente nesse produto. O surgimento de outros tipos de doenças e neoplasias também estão associados ao tabaco, como por exemplo o câncer de pulmão, de cabeça, pâncreas, intestino, doenças como

osteoporose e diabetes, tudo isso leva a necessidade de estudos que identifiquem essas doenças no estado inicial, e as alterações nas células causadas por essas substâncias [3,6].

Frente a todos os efeitos no organismo causados em função do tabagismo, é de grande importância que haja controle do seu uso, objetivando tardar a iniciação do consumo e diminuir assim o número de usuários, principalmente os adolescentes, que sofrem mais pressão e influências da mídia e dos grupos sociais [17]. Os adolescentes representam uma faixa de maior vulnerabilidade a inicialização do uso do tabaco, pois sofrem influência da promoção da indústria do tabaco, do acesso fácil e principalmente dos baixos preços [17]. No entanto, indivíduos com idades mais avançadas também são propensos ao tabagismo, devido ao envelhecimento, solidão e isolamento, tornando-os suscetíveis a hábitos não saudáveis, conseqüentemente esses maus hábitos podem ainda estarem associados ao nível socioeconômico influenciando o consumo abusivo de substâncias prejudiciais à saúde [18].

CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que os perfis do grupo estudado são de 18 a 40 anos, sendo que na população com faixa etária entre 18 a 25 anos, 76% fazem uso frequentemente, já os da faixa etária entre 26 a 40 anos 64% usam frequentemente.

A incidência de micronúcleos na mucosa oral de indivíduos que faziam o uso do narguilé foi maior do que em indivíduos do grupo controle, apontando os efeitos das substâncias presentes na fumaça do narguilé, tornando evidente que elas são responsáveis por alterações citogenéticas neste tecido.

Através desse estudo foi possível observar ainda um aumento na frequência de micronúcleos nos indivíduos usuários de narguilé por mais de um ano quando comparado aos indivíduos que fazem uso até um ano, demonstrando que a incidência de micronúcleos aumenta com o aumento do tempo de exposição. Todavia é necessário a realização de mais estudos, que conseqüentemente serão úteis no esclarecimento dos perigos do consumo de tabaco em suas diversas formas de uso, e os efeitos que causam no organismo.

REFERÊNCIAS

[1] MENEZES, A.M.B; WEHRMEISTER, F.C; HORTAL, B.L. Frequency of the use of hookah among adults and its distribution according to sociodemographic characteristics, urban or rural area and federative units: National Health Survey, 2013. **Rev Bras Epidemiol**, v.18,

n.2, p.57-67, 2015.

[2] MALTA, D.C; HALLAL, A.L.C; MACHADO, I.E; PRADO, R.R; OLIVEIRA, P.P.V; CAMPOS, M.O; SOUZA, M.F.M. Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. **Rev Bras Epidemiol**, v.21, n.1, p.1-15, 2018.

[3] INCA. **Nota Técnica: Uso de narguilé: efeitos sobre a saúde, necessidades de pesquisa e ações recomendadas para legisladores. Grupo de Estudo da OMS sobre a Regulação de Produtos de Tabaco (TobReg)**.2. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2017.

[4] MARTINS, S. R. Experimentação de e conhecimento sobre narguilé entre estudantes de medicina de uma importante universidade do Brasil. **J Bras Pneumol**, São Paulo, v.40, n.2, p.102-110, 2014.

[5] PAULA, G. M. Males Causados Narguilé no Sistema Respiratório Humano. **Rev Conex Eletrôn**, Três Lagoas, vol.13, n.1, 11p, 2016.

[6] WALTERS MS, SALIT J. JU JH et al. (2017). Fumar narguilé induz alterações epigenéticas no epitélio das pequenas vias aéreas. **PLoS One** 12: e0171112.

[7] INCA. **Programa Nacional de Controle do Tabagismo**. 2017. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa-nacional-controle-tabagismo>Acesso em 26 set. 2017.

[8] BRASIL. Constituição. **Constituição Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Planalto. 1996. Disponível em <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/03/leis/L9294.htm>>Acesso em 19 out. 2017.

[9] RASTAM S, Li FM, FM FOUAD, KAMAL HM, AKIL N, MOUSTAFA AE. Fumar cachimbo de água e cânceres bucais humanos. **Med Hypotheses**, v.74, n.3, p.457-459, 2010.

[10] PISCIOTTA, A.B.S; SILVA, S.M.L.A; FRÓES, S.R; MOUSSA, L. Efeitos nocivos do tabagismo no sistema respiratório: uma revisão atualizada da literatura. **Pesquisa e Ação**, v.4, n.2, 2018.

[11] CORRÊA, P. C. R. P. et al. Métodos de estimativa da mortalidade atribuível ao tabagismo: uma revisão da literatura. **Epidemiol Serv Saúde**. Brasília, v.17, n.1, p.43-57, 2008.

[12] FARIA, L. E. M.; BRAGA, J. R. M. Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de potencial genotóxico em epitélio oral de estudantes universitários. **Rev Eletrôn Atualiz Saúde**, v. 1, n. 1, p.35-41, 2015.

[13] THOMAS, Philip et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, v. 4, n. 6, p. 825, 2009.

[14] MENEGUETTI, D. U. et al. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. *J Environment Analytic Toxicol*, v. 2, n. 127, p. 2161-0525.1000127, 2012.

[15] SOUZA, A. M. D.; SILVA, A. M. D.; RAMOS, L. J.; ZAN, R. A.; MENEGUETTI, D. U. D. O. Análise do Efeito Mutagênico em Células Epiteliais Esfoliadas da Mucosa oral de Fumantes, Ex-Fumantes e Não- Fumantes. **SaBios: Rev Saúde e Biol**. v.9, n.3, p.43-52, 2014.

[16] NOGUEIRA, K. T.; FUMO, C. M.; SILVA, M. D. Tabagismo em adolescentes numa escola da rede pública do estado do Rio de Janeiro. **Adoles e saúde**. v. 1, n. 4, p.6-10, 2004.

[17] MESQUITA, A. A. Avaliação de um programa de tratamento do tabagismo. **Rev bras de terapia comport cognitiva**. v.15, n.2, p.35-44, 2013.

[18] COSTA, J. S. D.; SILVEIRA, M. F.; GAZELLE, F. K.; OLIVEIRA, S. S.; HALLAL, P. C.; MENEZES, A. M. B.; GIGANTE, D. P.; OLINTO, M. T. A.; MACEDO, S. Consumo abusivo de álcool e fatores associados: estudo de base populacional. **Rev Saúde Pública**. v.32, n.2, p.284-291, 2004.