

GENOTOXICIDADE RELACIONADA AO CONSUMO DE CHIMARRÃO¹

GENOTOXICITY RELATED TO THE CONSUMPTION OF MATE

Paola Cristine Ferigolo² e Michele Rorato Sagrillo³

RESUMO

É crescente a preocupação com os efeitos mutagênicos e carcinogênicos de agentes genotóxicos em populações expostas a um estilo de vida. O hábito tradicional do consumo de chimarrão em altas temperaturas tem sido considerado um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de esôfago no Sul do Brasil. Desta forma, os efeitos da injúria térmica causada pelo mate foram avaliados em 100 indivíduos que consomem chimarrão de chimarrão que não possuem o hábito de fumar ou ingerir bebida alcoólica mais de três vezes na semana. Neste estudo, foi utilizada a técnica de micronúcleo para identificação precoce de efeitos da genotoxicidade. Micronúcleos são corpos extranucleares constituídos por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que, durante a mitose, não foram incorporados ao núcleo principal, sendo detectados nas células esfoliadas do tecido epitelial da mucosa oral. A presença de micronúcleos não mostrou alta significância, mas revelou-se maior frequência em voluntários que ingerem em maiores temperaturas e quantidades. Assim, os Micronúcleos (MNs) atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e foram utilizados para avaliar o grau de comprometimento da mucosa bucal.

Palavras-chave: danos do DNA, teste do micronúcleo, mucosa bucal, mate.

ABSTRACT

There is a growing concern about the mutagenic and carcinogenic effects of genotoxic agents in populations exposed to a specific lifestyle. The traditional habit of consuming mate at high temperatures has been considered a risk factor for the development of esophageal epidermis carcinoma in southern Brazil. Thus, the effects of the thermal injury caused by mate were evaluated in 100 mate drinkers who do not have the habit of smoking or drinking alcohol more than three times a week. In this study it is used the micronucleus technique for early identification of genotoxic effects. Micronucleus are bodies consisting of fragments of chromosomes or chromosomes that, during mitosis, were not incorporated into the main nucleus and were detected in exfoliated cells of the epithelial tissue of the oral mucosa. The presence of micronucleus showed no great significance, but showed up more frequently in volunteers who ingest mate in greater quantities and temperature. Thus, micronucleus act as biological markers of genetic damage and were used to evaluate the degree of oral mucosa injure.

Keywords: DNA damage, micronucleus, mouth mucosa, mate.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmica do Curso de Biomedicina - UNIFRA. E-mail: paolaferigolo@bol.com.br

³ Orientadora - UNIFRA. E-mail: sagrillomr@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O câncer esofágico está entre as neoplasias mais frequentes e acomete mais homens do que mulheres. O tipo de câncer de esôfago mais comum é o carcinoma epidermóide escamoso, responsável por 96% dos casos. Outro tipo, o adenocarcinoma, vem aumentando significativamente (INCA, 2010). Como o câncer oral apresenta maiores taxas de mortalidade no segmento cabeça e pescoço no Rio Grande do Sul, torna-se de grande importância pesquisas nessa região que possibilitem o conhecimento sobre técnicas de prevenção e diagnóstico precoce (DIETZ et al., 1998; BARROS et al., 2000; DIETZ et al., 2000; SEWRAM et al., 2003; SILVA, 2008; INCA, 2010).

O câncer ou neoplasia é uma doença multifatorial, no entanto está sempre associado a doença genética, pois inicia com danos no DNA. Isso significa que genes tumorais podem ser transmitidos para uma célula normal. Então, esses genes normais que sofreram alterações passam a ser genes tumorais. Quando estes genes tumorais são transcritos, provocam a síntese de proteínas que resultam em perda ou ganho de uma função biológica ocorrendo a neoplasia (MENDES, 2000; QUEIROGA; PERNAMBUCO, 2006; MONTEIRO et al., 2009).

As mutações nos genes podem ser causadas por agentes físicos ou químicos do meio ambiente ou por fatores internos. Como fatores internos estão principalmente, predisposições genéticas, exposição hormonal e idade. Fator do ambiente é entendido como o meio em geral (água, terra, ar e sol), o ambiente ocupacional (indústrias químicas, radiação e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos, tabagismo, alcoolismo) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Esses agentes vão atuar no DNA da célula causando alterações irreversíveis (MENDES, 2000; QUEIROGA; PERNAMBUCO, 2006; MONTEIRO et al., 2009).

A formação da carcinogênese pode demorar muitos anos, pois durante seus três estágios (iniciação, promoção e progressão) ocorre um acúmulo de mutações no DNA celular. Quando essa célula mãe que recebeu mutações se replica, ela origina a uma célula filha com mutações também. Na próxima replicação, a célula filha já vai acumular duas mutações e assim por diante (MENDES, 2000).

Os genes que recebem essas mutações normalmente são os que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, nos que consertam eventuais erros na replicação do material genético ou nos que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular. Existem, basicamente, duas categorias de genes envolvidos nas formações neoplásicas: os oncogenes e os genes supressores tumorais. O controle das atividades celulares normais é feito por muitos tipos de genes, entre eles os proto-oncogenes. Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras, ou seja, que passaram a ter ganho de função ou hiperexpressão. Os oncogenes são responsáveis por aumentar a proliferação celular ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que podem dar início a uma neoplasia (BELIZÁRIO, 2002).

Os genes supressores tumorais são genes que expressam produtos que regulam negativamente

o ciclo celular, ou seja, é um gene regulador de proliferação celular. Quando mutados deixam de exercer seus papéis através de processos específicos para cada gene, ocorrendo proliferação descontrolada. Dessa forma, o câncer se desenvolve com a ativação de oncogenes e da inativação de genes supressores de tumor, permitindo o crescimento de células alteradas (BELIZÁRIO, 2002).

Muitos autores têm realizado estudos para analisar possíveis associações de fatores de estilo de vida com o câncer oral (RONCO et al., 2004), como no Sul do Brasil que apresenta acentuadas taxas de mortalidade por câncer esofágico em relação aos outros estados do país (DIETZ et al., 1998; BARROS et al., 2000; DIETZ et al., 2000; SEWRAM et al., 2003; SILVA, 2008; INCA, 2010). Esta variação sugere a ação de fatores de riscos externos na etiologia desta doença (DIETZ et al., 1998).

O consumo de chimarrão, ingerido por indivíduos nessas regiões, normalmente em grandes volumes (ao redor de 1,8L/dia) e em altas temperaturas (entre 65°C a 71°C), é considerado fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de esôfago (DIETZ et al., 1998; BARROS et al., 2000; SEWRAM et al., 2003; SILVA, 2008). Porém, há experimentos com animais que sugerem que a água com temperatura superior a 60°C somente potencializa o efeito de carcinógenos. (BARROS et al., 2000; SILVA, 2008).

O efeito cancerígeno do mate sempre foi relacionado às altas temperaturas em que ele é consumido. Essa hipótese eleva o risco para que a injúria térmica da mucosa esofágica possa desencadear a liberação de mediadores inflamatórios que seriam importantes para o desenvolvimento do processo carcinogênico nesse órgão (BARROS et al., 2000; JOTZ et al., 2006; SILVA, 2008).

Neste estudo, foi utilizada a técnica de micronúcleo (MN) para identificação precoce de efeitos da genotoxicidade e assim prevenção de câncer oral em pacientes expostos a água quente do chimarrão. Micronúcleos são corpos extra nucleares constituídos por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que, durante a mitose, não foram incorporados ao núcleo principal. O aumento da frequência de células micronucleadas tem sido relacionado à exposição a diferentes carcinógenos (CARVALHO et al., 2002; VILANOVA et al., 2004; ANDRADE et al., 2005; MATEUCA et al., 2006; CARRARD et al., 2007; CORRÊA et al., 2009; SOUTO et al., 2008).

Mais detalhadamente, os micronúcleos consistem em pequenas quantidades de DNA que surgem no citoplasma quando fragmentos de cromossomos ou cromátides ou cromossomos inteiros não são incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a mitose, frequentemente, por que estes fragmentos não possuem um centrômero. Fragmentos acêntricos não migram e permanecem atrasados na anáfase, enquanto que os elementos cromossômicos com centrômero são orientados em direção aos polos do fuso (FENECH, 2000; CORRÊA et al., 2009).

Durante a telófase, um envoltório nuclear forma-se em torno dos cromossomos perdidos e/ou dos fragmentos dos cromossomos, os quais se desespiralizam e gradualmente assumem a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, sendo esse menor que o núcleo principal da célula, surgindo, assim, o nome de micronúcleos. (DIETZ et al., 2000; FENECH, 2000; CORRÊA et al., 2009). Portanto, os

MN fornecem um índice confiável de quebra cromossômica e perda de cromossomos (FENECH, 2000).

A presença de MN nas células esfoliadas serve para medir a extensão em que determinado agente externo está associado ao dano ao DNA dos tecidos e, de certa forma, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer, acrescentam ainda, que o MN pode contribuir em programas de detecção de grupos de alto risco e prevenção de câncer bucal e esofágico (CARVALHO et al., 2002; ANDRADE et al., 2005; CARRARD et al., 2007; CORRÊA et al., 2009; FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidos 100 indivíduos aleatoriamente do sexo feminino e masculino, na faixa etária entre 20 e 60 anos de idade, da cidade de Santa Maria, RS. Na sede deste município, realizaram-se visitas domiciliares por uma dupla de alunos treinados do curso de biomedicina que inquiriram, utilizando um questionário estruturado, sobre o consumo de chimarrão. Foram excluídos da amostra indivíduos que possuem os hábitos de ingerir bebida alcoólica mais de três vezes por semana e fumar.

O questionário foi aplicado a todos os indivíduos, em cada residência visitada, sobre a frequência do hábito de ingerir chimarrão, a quantidade usualmente bebida e a percepção da temperatura do chimarrão – se frio, morno, quente ou muito quente.

Durante a entrevista foi solicitado o consentimento para medir a temperatura da água utilizada no recipiente (cuia), imediatamente antes da sua ingestão. A temperatura foi aferida por termômetros de precisão (marca Incoterm®, fabricação nacional, modelo 1017A) e a leitura foi efetuada independentemente por cada pesquisador da dupla e, em seguida, os dados foram confrontados para evitar possíveis erros de aferição. Padronizou-se a aferição pela imersão da porção termo-sensível do instrumento até que o nível da água atinja a marca de 0°C no termômetro, o que corresponde a uma profundidade aproximada de cerca de 2,5 cm abaixo da superfície, sem que a ponteira do termômetro atinja a erva ou o fundo da cuia, permanecendo totalmente em contato com a água quente.

Foi utilizado o tempo de 20 segundos após a imersão para a leitura como tempo padrão para todos os casos sendo este o tempo suficiente para a estabilização da leitura. Esta pesquisa constituiu-se de um estudo observacional transversal de modo que testes estatísticos foram utilizados para comparar os resultados com o hábito de consumo.

A coleta do material foi realizada após a autorização do indivíduo, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de linguagem acessível, com as informações necessárias para o conhecimento do voluntário. Ressaltamos também que foi preservado o sigilo e a privacidade dos sujeitos cujos dados foram analisados para a execução do projeto em questão e que os resultados da pesquisa foram divulgados de forma anônima.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cultura de Células do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) e realizada as coletas somente após aprovação pelo Comitê de

Ética em Pesquisa desta instituição. Para a obtenção de informações quanto aos hábitos e frequência de ingestão e temperatura da água os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Também foi informado aos voluntários que a coleta do material necessário para a realização do trabalho seria indolor e não traria é indolor e não traz nenhum dano a pessoa.

O material necessário para análise de instabilidade no DNA pela técnica de Micronúcleos foi obtido a partir da coleta de células da mucosa oral. Tal coleta foram realizadas com o auxílio de swabs e antecedente à coleta, foi solicitado aos indivíduos que retirassem as próteses dentárias, quando fizesse uso, e também fizessem bochecho com água para eliminar possíveis restos alimentares que poderiam interferir na coleta e/ou análise.

Após a raspagem com o *swabb* para a retirada de células da mucosa bucal, a amostra foi levada ao laboratório da instituição em caixas de isopor, previamente refrigerada quando foi transferida para tubos de centrifuga e os mesmos foram centrifugados, durante dez minutos, a 1.000 rpm, retirando-se o sobrenadante e deixando-se 0,5 ml de sedimento e solução. Em seguida, foram colocados 2 ml de fixador (metanol; ácido acético 3:1) centrifugando-o novamente.

Ao retirar o sobrenadante, foi deixado 0,5 ml, adicionando-se mais uma vez 2 ml de fixador. Após, a solução foi centrifugada, retirando o sobrenadante para deixar o mínimo de solução (0,3 ml). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a solução foi ressuspensa, pingando três gotas na lâmina, deixando secar totalmente. Após realizou-se coloração com Giemsa® por três minutos.

A análise das células foi realizada em microscópio óptico, binocular, da marca Olympus® com objetiva de 40X. A frequência de MN e outras anomalias nucleares foram registradas em ficha específica e fotografadas com câmera digital da marca PixelView®. Foram analisadas 1000 células por indivíduo, considerando-se somente as células não fragmentadas e não sobrepostas. Os critérios utilizados para a identificação de um micronúcleo foram os estabelecidos por Picker e Fox em 1986:

- (a) os micronúcleos contêm um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma de uma célula;
- (b) o micronúcleo é de intensidade igual ou menor, a mesma textura e refração do núcleo principal;
- (c) o micronúcleo é menor, isto é, diâmetro de 1/3 do núcleo principal;
- (d) deve estar no mesmo plano de foco; e
- (e) o micronúcleo estar claramente separado do núcleo principal.

Os valores obtidos para cada variável foram registrados e tabulados em planilhas do *software* Excel for Windows e as análises estatísticas foram realizadas quantificando média e desvio padrão.

RESULTADOS

No período analisado, foram selecionados 100 voluntários, sendo 36% do sexo masculino e 64% do sexo feminino. A idade variou de 20 anos a 61 anos, com idade média geral de 27,23 anos.

Todas as amostras tiveram material suficiente para executar a contagem de 1000 células/ indivíduo.

Podemos verificar a partir dos questionários que 84% dos indivíduos possuem o hábito de consumir o chimarrão no mínimo 3 vezes por semana (representado na Figura 1).

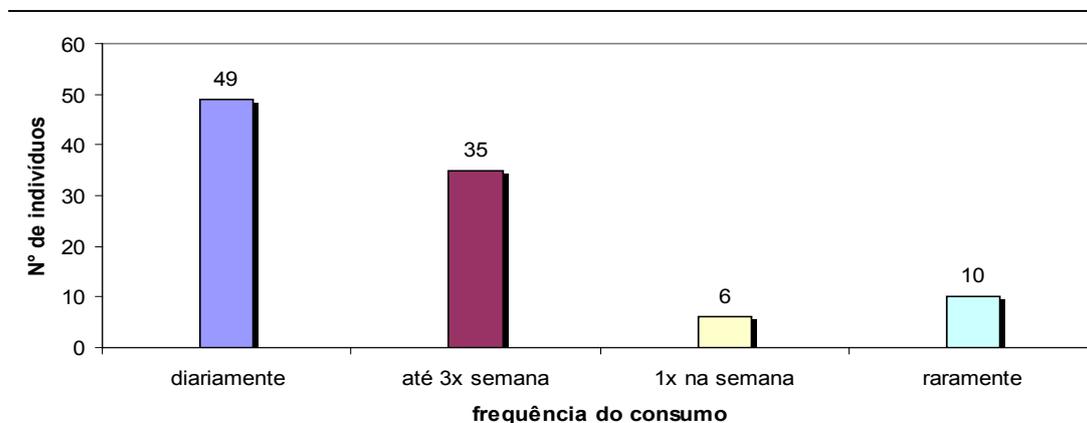


Figura 1 - Representa a frequência com que o chimarrão é consumido.

Ao analisar a quantidade de chimarrão ingerido obtivemos um consumo per capita média de 1307 mL/dia com desvio padrão 1434,73. O consumo mínimo foi de 200 mL/dia e o máximo de 9000 mL/dia. Na figura 2, tem-se a proporção do consumo diário por número de indivíduo.

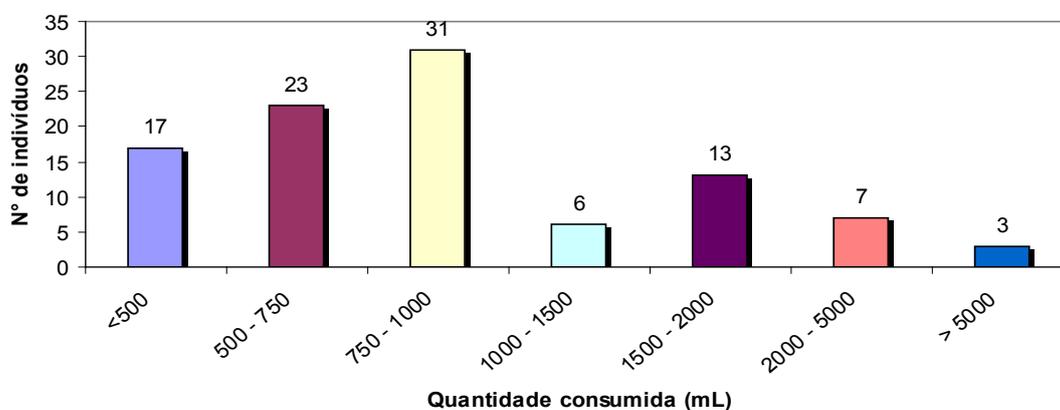


Figura 2 - Relação do número de indivíduos por quantidade ingerida da bebida.

A temperatura medida teve as seguintes características: média de 76,39°C; mediana de 75°C; moda de 75°C; o valor mínimo foi 55°C e o máximo foi 90°C. Em temperatura superior a 70°C, estavam 87% das aferições, como representado na figura 3.

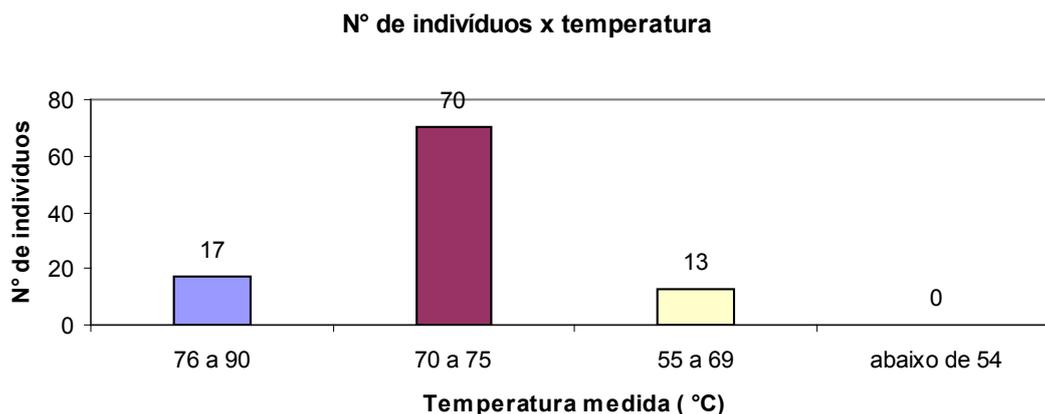


Figura 3 - Relação do número de voluntários por temperatura medida.

A relação da presença de micronúcleos nas células esfoliadas da mucosa bucal com a temperatura em que a água é ingerida, frequência do hábito de chimarrão é representada na tabela 1.

As respostas quanto à percepção da temperatura da água pelos voluntários bebedores de mate foram: 70% para “quente”; 17% para “muito quente”; 13% para “morno”; e ninguém relatou tomar a bebida fria. A relação entre a temperatura medida e a percepção da temperatura pelos próprios voluntários está representada na tabela 2.

Tabela 1 - Relação da presença de micronúcleos com a temperatura medida e frequência dos hábitos de beber chimarrão. Observação: 88% das pessoas que apresentam microconídios (MN) ingerem a bebida acima de 70°C.

Nº	MN	55°C – 69°C		70°C – 75°C		76°C - 90°C	
		diariamente	até 3x/sem	diariamente	até 3x/sem	diariamente	até 3x/sem
56	0 - 5	9 pessoas (16,1%)	3 pessoas (5,4%)	11 pessoas (19,6%)	11 pessoas (19,6%)	10 pessoas (17,9%)	12 pessoas (21,4%)
27	6 - 11	-	-	7 pessoas (25,9%)	9 pessoas (33,4%)	7 pessoas (25,9%)	4 pessoas (14,8%)
8	12 - 17	-	-	2 pessoas (25%)	1 pessoa (12,5%)	2 pessoas (25%)	3 pessoas (5,4%)
9	18 - 23	1 pessoa (11,11%)	-	-	1 pessoa (12,5%)	3 pessoas (5,4%)	4 pessoas (14,8%)

Tabela 2 - Relação entre a temperatura medida e a percepção da temperatura pelos próprios voluntários.

Temperatura medida	76°- 90°	70°- 75°	55°- 69°	<54°C
Muito Quente (17 pessoas)	14 pessoas	3 pessoas		
Quente (70 pessoas)	30 pessoas	37 pessoas	3 pessoas	
Morno (13 pessoas)		2 pessoas	11 pessoas	

Observação: A temperatura correta para percepção de “muito quente” está entre 76°C e 90°C; a temperatura para “quente”

está entre 70°C e 75°C; e para “morno” entre 55°C e 69°C.

Então é possível concluir que 62% dos voluntários percebem a temperatura correta que estão ingerindo e 38% tiveram percepção alterada. Como pode constatar-se, de 17 voluntários que relataram beber a água “muito quente” 82,4% (14/17) realmente estavam ingerindo muito quente; de 70 pessoas que relataram ingerir água “quente” 52,9%(37/70), ou seja, a maioria, perceberam que ingeriam a temperatura certa, porém teve 42,8% (30/70) que tinham a percepção de quente, ou seja, bastante significativo, estavam ingerindo muito quente e 4,3% (3/70) percebendo quente enquanto bebiam morno. E o mesmo aconteceu com o grupo que relatou ingerir “morno”, onde 84,7% (11/13) tiveram percepção correta. Ninguém relatou beber água fria.

Também foi avaliada a quantidade de MN em cada faixa etária e relacionada com observações relatadas pelos próprios voluntários. Está representada na tabela 3.

Tabela 3 - Relação da idade e observações relatadas pelos voluntários com a presença de microconídios (MN).

Faixa etária	N indivíduos	MN	Clareamento dental		Consumo de carne		Uso de bebida alcoólica	
			Sim	Não	Diário	até 3x/sem	Não	até 3x/sem
20 - 30	74	444	14,8%	85,2%	91,9%	8,1%	50%	50%
31 - 40	12	73	16,7%	83,3%	100%	0%	75%	25%
41 - 50	10	56	10%	90%	90%	10%	70%	30%
51 - 61	4	36	0%	100%	100%	0%	50%	50%

Observação: Foram coletadas somente de pessoas que já haviam feito clareamento dental a mais de seis meses, tempo para reparação do núcleo, caso o seu uso cause alterações nucleares.

Foi feito um cálculo de proporção da quantidade de micronúcleos pela quantidade de indivíduos, o qual mostrou que na faixa etária de 51 a 61 anos se seguisse a mesma proporção, deveria aparecer na média de 24 MNs. No entanto o aumento foi de 50% pois o resultado foi de 36 MNs.

Pessoas que fizeram clareamento dental apresentaram de 3 a 20 MN, ou seja, não houve um padrão. Sendo confirmado pela proporção de que 87 pessoas que não fizeram o clareamento, apresentaram 559 MNs e 13 pessoas que fizeram, apresentaram 86 MNs. O mesmo aconteceu com o consumo de carne e bebida alcoólica.

Observou-se que 56,3% dos MN, ou seja, 363 MNs foram encontrados em pessoas que relataram ter recorrência de história de câncer na família, independente do tipo de câncer. E das nove pessoas que apresentaram quantidade significativa de MNs (18 - 23) 55,5% apresentam recorrência da doença na família.

Durante a análise de MNs também foi observado outras anomalias nucleares. A presença de alterações metanucleares está representada na figura 4.

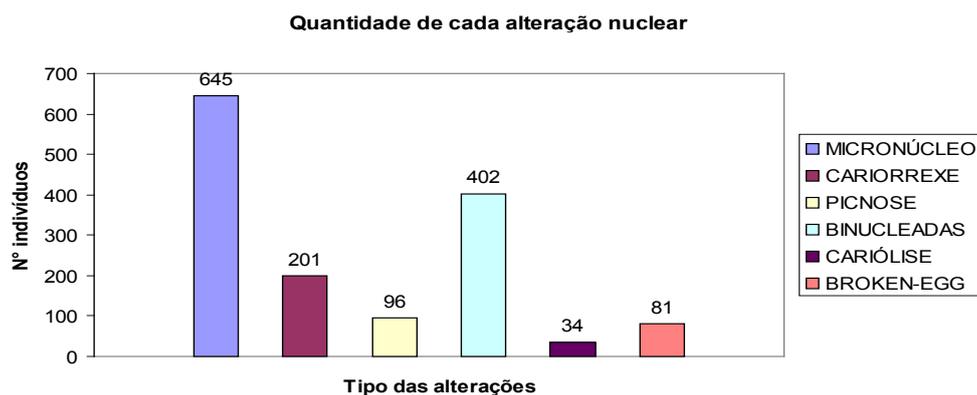


Figura 4 - Presença de metanucleares.

Foram encontrados 28% de células binucleadas, são as que possuem dois núcleos de tamanhos normais e iguais; 14% de cariorréxe caracterizada pela presença de um núcleo em decomposição; 2% de cariólise significando dissolução do núcleo celular visualizada pela ausência de sua coloração; 6% de *broken egg*, formação nuclear onde o núcleo aparece unido a um fragmento arredondado, eventualmente maior que o micronúcleo; e 7 % de picnose, núcleo bem menor que o normal, ou seja, uma condensação do núcleo. E em maior quantidade o MN com 43% de incidência.

Essas anomalias nucleares, presentes em células de escamação da mucosa oral, estão relacionadas à injúria, à morte celular ou ainda aos erros que ocorrem durante a divisão celular. Devido a própria natureza do epitélio escamoso, ocorrem constantemente na mucosa oral (RAMIREZ, 2000).

DISCUSSÃO

O MN vem sendo reconhecido como indicador de danos genotóxicos desde a década de 30 com a publicação das investigações sobre radiação meristemas da raiz de cebola e grãos de pólen de *Tradescantia*, após irradiação X (RAMIREZ, 2000).

Segundo Bloching et al. (2000), as principais vantagens do teste do Mnsão a simplicidade e rapidez com boa sensibilidade. Além disso, pode ser visualizado durante a interfase quando um número ilimitado de células podem ser contadas. Os MNs formados durante uma divisão celular persistem pelo menos, até a interfase seguinte. O MN é facilmente reconhecido e permite avaliar tanto a quebra quanto a perda cromossômica, sendo assim, essa técnica sensível para monitoramento de dano genético, tornando-se prioritário em análise epidemiológica de mutagenicidade (FENECH et al., 1999).

A capacidade de identificar células com defeito cromossômico confere ao micronúcleo a propriedade de ser utilizado como marcador biológico da exposição a carcinógenos e neste caso, um indicativo de biomonitoramento da injúria celular. Pois, através de sua expressão, pode-se avaliar o grau de comprometimento da mucosa bucal (DIETZ et al., 1998).

Os dados obtidos a partir da análise de 100 voluntários, não representam alto grau de comprometimento da mucosa oral pelo uso contínuo do chimarrão, porém revelou que ingerido em

temperaturas acima de 70°C aparece maior quantidade de MN, pois 88% dos MNs encontrados eram nas amostras de voluntários que consumiam o chimarrão com temperatura acima de 70°C. A partir dos resultados também se observou que quanto menor o consumo, maior é a temperatura da água para a ocorrência de micronúcleos. O que mostra coerência com outros estudos na literatura, como Dietz e colaboradores (1998), Barros et al. (2000), Sewram et al. (2003) e Silva (2008).

Além disso, observamos que 87% da amostra estudada ingerem o mate em temperatura superior a 70°C, o que foi experimentalmente considerado como um fator promotor de alteração nuclear. Também cabe ressaltar, que 42,8% dos consumidores que relataram ingerir a bebida em temperatura quente estavam, de fato, consumindo mate em temperatura superior a 75°C, provavelmente pelo fato do epitélio já estar adaptado com a temperatura elevada da bebida. E 15,4% (2/13) dos voluntários que relataram como bebida morna, estavam ingerindo a uma temperatura acima de 70°C.

Considerando o número de voluntários de cada faixa etária, percebemos que a idade entre 20 e 50 anos não influenciou para o aparecimento de danos, no entanto, na faixa etária a partir de 50 anos houve um significativo aumento de 50% de micronúcleos seguindo a proporção da quantidade de MN por número de voluntários. À medida que envelhecemos, os mecanismos biológicos de correção do DNA lesionado começam a falhar, por isso a prevalência de micronúcleos aumentam com a idade, assim como o comum aparecimento de alterações nas células (MATEUCA et al., 2006).

É possível, ainda, haver uma correlação entre fatores antioxidantes encontrados na erva mate e no organismo com a ausência de MNs em amostras de pessoas que ingerem chimarrão já por um longo período, devido ao sistema de reparo. Ou seja, enquanto a água quente do mate causa a injúria térmica, a erva repara estes danos através dos subprodutos antioxidantes. O que pode explicar a ausência ou pequena presença de micronúcleos nessas amostras também seriam os genes da superóxido dismutase (SOD2). A SOD2 é um dos principais antioxidantes celulares, podendo atuar positivamente sobre todos os processos degenerativos (PINTO et al., 2007).

Evidências epidemiológicas associam um polimorfismo do nucleotídeo da SOD2, que aumenta a atividade da enzima quando há o risco de desenvolver qualquer tipo de câncer. Este polimorfismo ocorre devido a uma única substituição de um nucleotídeo, alterando o aminoácido codificado da Alanina (GCT) a Valina (GTT), que é conhecido como polimorfismo Ala16Val. O polimorfismo Ala16Val resulta em três genótipos de importante relevância: **AA**: metabolismo antioxidante rápido; **Av**: metabolismo antioxidante intermediário; **vv**: metabolismo antioxidante lento (SHIMODA-MATSUBAYASGI et al., 1996; MILLIKAN et al., 2004). Este fato pode ser relacionado com a maior frequência de MNs em amostras de voluntários que relataram haver recorrência de histórico de câncer na família.

Assim, indivíduos que possuem genótipo para vv teriam um metabolismo mais lento para proteção do organismo, apresentando maiores quantidades de MNs. Pessoas com genótipo AA, apresentam rápido metabolismo antioxidante para proteção da mucosa bucal contra a injúria térmica, explicando a ausência de MNs até mesmo em bebedores de mate com temperatura da água muito quente.

Ainda com o auxílio do microscópio óptico, foi possível observar a transição do núcleo que se torna menor e mais denso (picnose), mais tarde se rompe (cariorréxe) e, finalmente, desaparece (cariólise), durante o processo degenerativo, denominados anomalias metanucleares. Segundo Ramirez (2000) a cariólise acompanha o processo que precede a queratinização, representando uma resposta adaptativa às injúrias celulares em epitélios normalmente não queratinizados, pois a cariólise foi encontrada, mas não de forma significativa.

Já a formação das células binucleadas ocorre antes do processo de diferenciação celular do epitélio estratificado escamoso, sendo, portanto, quando encontradas significado de atraso de divisão mitótica. A observação de binucleação significativa com os MNs na mesma amostra torna-se de grande relevância.

Portanto, se percebe que o estilo de vida é responsável pela exposição a agentes que produzem 80% das neoplasias e demonstraram haver uma relação direta entre aumento da ocorrência de MNs (CARRARD et al., 2007; PINTO, 2007). Uma técnica que se mostrou de grande importância para identificar os riscos de desenvolvimento de carcinogênese em uma população mais suscetível ao desenvolvimento de tumor oral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a crescente incidência de câncer oral, especialmente no Rio Grande do Sul, a pesquisa de micronúcleos, nessa região tradicional de consumo de chimarrão, é importante para detectar fatores de risco precocemente.

Concluímos que a grande maioria dos usuários estava exposta ao uso crônico diário de mate quente, em temperatura geralmente superior a 70°C e em grandes volumes, o que pode ser um contribuinte à carcinogênese oral nessa população. Assim, 87 voluntários ingerem água em temperatura de 70°C a 90°, desses 58,7% apresentam números maiores de MN.

Assim, os MNs atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitoração. Este teste reveste-se, portanto, de grande importância clínica, pois a quantificação de células micronucleadas obtidas a partir de citologia esfoliativa poderá ser um indicativo para a remoção de hábitos e subsidiar terapias antioxidantes em indivíduos expostos aos fatores de risco do câncer de boca, mas que ainda não apresentaram sinais clínicos de alterações celulares.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. G. S. et al. Micronúcleo: Um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 20, n. 48, p. 137-141, 2005.

BARROS, S. G. S et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2000.

- BELIZÁRIO, J. O próximo desafio: reverter o câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, 2002.
- BLOCHING, M. et al. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncology**, v. 36, p. 550 – 555, 2000.
- CARRARD, V. C. et al. Teste dos Micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Porto Alegre, v. 48, n 1/3, p. 77-81, 2007.
- CARVALHO, M. B. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n. 4, p 317-322, 2002.
- CORRÊA, N. S. et al. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos. **Revista de ciência e saúde coletiva**, Pelotas, n.14, p. 2251-2260, 2009.
- DIETZ, J. et al. Fatores de risco relacionados ao câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 269-272, 1998.
- DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Revista de Associação Médica Brasileira**, Porto Alegre, RS, v. 46, n.3, p. 207-211, 2000.
- FENECH, M. et al. The Human MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999.
- FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FLORES, Mônica; YAMAGUCHI, Mirian Ueda. Teste de micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Câncer de Esôfago**. 2010. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010>>. Acesso em: 02 abr. 2010.
- JOTZ, G. P. et al. Estudo experimental da erva mate (*Ilex Paraguariensis*) como agente etiológico de neoplasia do trato aéreo-digestivo. **Arquivos Internacionais Otorrinolaringologia**. São Paulo, v.10, n.4, p. 306-311, 2006.
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **ScienceDirect**, Bruxelas, v. 88, n. 11, p 1515–1531, 2006.

MENDES, A. M. S. **Câncer de boca**: Um campo a ser explorado pela fonoaudiologia. 2000. 72f. Monografia de conclusão do curso de especialização em Motricidade Oral - centro de especialização em fonoaudiologia clínica, Rio de Janeiro, 2000.

MILLIKAN, R.C. et al. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African American and whites. **Breast Cancer Res.**, v. 6, p. 264–274, 2004.

MONTEIRO, N. M. L. et al. Câncer de esôfago: Perfil das manifestações clínicas, histologia, localização e comportamento metastático em pacientes submetidos a tratamento oncológico em um centro de referência em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Minas Gerais, v. 55, n. 1, p. 27-32. 2009.

PINTO, Luis Felipe Ribeiro. Suscetibilidade ao cancer ligada a genes de baixa penetrância: desafios na busca de uma prevenção individualizada. **Revista de Oncologia**, Rio de Janeiro, n. 51, p. 86-90, 2007.

QUEIROGA, Ricardo; PERNAMBUCO, Ana Paula. Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, RJ, v. 52, n. 2, p. 173-178, 2006.

RAMIREZ, Andréa. **Análises de células metanucleadas de Alcoólicos Portadores de Carcinomas Oraís**. 2000. 147 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade de São Paulo. 2000.

RONCO, A. et al. Fatores de risco para o câncer esofágico em não usuários de tabaco e bebida alcoólica: um estudo caso-controle no Uruguai. **Revista Brasileira de epidemiologia**, Uruguai, v. 7, n. 4, p. 383-391, 2004.

SEWRAM, V. et al. Maté Consumption and the Risk of Squamous Cell Esophageal Cancer in Uruguay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Montevideo, Uruguai, v. 12, p. 508-513, 2003.

SHIMODA-MATSUBAYASGI, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 226, p. 561-565, 1996.

SILVA, Juliana Ferreira da. **Efeitos da temperatura e do mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o processo de carcinogênese de esôfago em ratos wistar machos**. 2008. 67 f. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 2008.

SOUTO, R. et al. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Revista Estudos**, Goiás, v. 35, n. 1, p.171-178, 2008.

VILANOVA, L. B. et al. **Comparação de técnicas de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em células humanas**. 3f. Dissertação (curso de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2004.