2 - OBJETIVOS

Esta investigação representa parte de um projeto mais amplo sobre “Recorrência familial, condicionantes genéticos e mutagenicidade no alcoolismo crônico”, em que os condicionantes genéticos do alcoolismo podem ser avaliados através de efeitos pleiotrópicos determinados pela constelação genética multifatorial (poligênica) responsável por sua predisposição hereditária; e a mutagenicidade pelo estudo do uso abusivo e crônico do álcool e outros agentes toxicogênicos que atuam sinergisticamente ao álcool.

Dentro deste contexto a presente pesquisa propõe a investigar as alterações citogenéticas e de outros marcadores genéticos em associação com a ingestão do álcool incluindo sua responsabilidade na carcinogênese humana. Faz parte específica do objetivo da dissertação não somente associar álcool com alterações citogenéticas ou álcool com neoplasias orais, ou ainda alterações citogenéticas com neoplasias orais, mas a associação simultânea de álcool com alterações citogenéticas e neoplasias orais, visando suas implicações clínico-genéticas, diagnóstico, prognóstico pré-clínico e acompanhamento clínico da carcinogênese oral, contribuindo com subsídios para o conhecimento de sua etiopatogenia e Medicina Preventiva.

Por conseguinte, a presente investigação de análise citogenética de alcoólicos crônicos com neoplasias orais inclui duas fases. A primeira representada pela presente dissertação de mestrado inclui o teste do micronúcleo que seria ampliada pela análise das aberrações cromossômicas e marcadores biomoleculares que expandiriam as conclusões atingidas nessa dissertação.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Casuística

A amostra do presente estudo é composta por pacientes alcoólicos portadores de carcinomas orais não recidivantes, diagnosticados pelo Serviço de Cirurgia da Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis.

A entrevista para o preenchimento das fichas de registro anamnéstico do alcoolismo (apêndice I) e de avaliação do alcoolismo (apêndice II), assim como a coleta das células de escamação da mucosa oral dos pacientes foram realizadas no Hospital Heliópolis, concomitantemente à sua internação pré-cirúrgica. A participação foi voluntária de modo que os pacientes ou seus responsáveis assinaram um consentimento informado para participar da pesquisa.

Estudaram-se 30 sujeitos que foram comparados à 30 indivíduos controles cujas células foram analisadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP.

3.1.1 - Caracterização da amostra dos sujeitos

A participação dos pacientes na presente investigação teve como pré-requisitos o consumo crônico de álcool, a manifestação clínica da doença e o sexo masculino. Dados adicionais a respeito da amostra foram obtidos através de informações anamnésticas.

Todos os pacientes são brasileiros com idades entre 37 e 76 anos, com idade média de cerca de 53 anos, dos quais 21 são brancos, oito são pardos e apenas um é negro. Quanto ao grau de escolaridade, 50% cursaram o primário e 28% não foram alfabetizados enquanto o restante cursou o ginásio ou colégio.

Em relação ao estado civil, 60% são casados, 23% são solteiros e os demais separados, desquitados ou viúvos. Exceto sete pacientes que não tiveram filhos, os demais possuem de um a 10 filhos (média de quatro filhos). Do total de pacientes, quatro relataram que as respectivas esposas perderam seus filhos por aborto espontâneo. Dois pacientes são filhos de pais consangüíneos.

Quanto à profissão, 46% são prestadores de serviços e 20% exercem atividades relacionadas à construção, enquanto o restante está ligado às atividades comerciais, industriais, militares e agrícolas.

O inicio do consumo de álcool ocorreu entre sete e 43 anos (média de 18 anos) e o tempo de consumo do álcool variou de quatro a 59 anos (média de 32 anos). Dos 30 pacientes, 20 abstiveram-se do consumo de álcool por um período anterior à internação que durou de um mês a 17 anos. A maioria (50%) dos pacientes fez uso tanto de bebidas destiladas como fermentadas, enquanto 43% consumiram somente bebidas destiladas.

Do total de pacientes, 73% foram classificados como quatro, na escala de um a quatro para a intensidade do consumo de álcool, onde cada unidade corresponde a uma garrafa de cerveja ou uma dose de bebida destilada. Apenas dois pacientes foram filiados à Associação dos Alcoólatras Anônimos, porém a abandonaram. O questionário de avaliação do alcoolismo revelou que 80% dos pacientes são alcoólicos crônicos segundo o *CAGE*[49].

A recorrência familial de alcoolismo foi indicada em 30 parentes de primeiro grau. Além disso, 24 pacientes relataram a existência de pelo menos um parente alcoólico em sua família (Apêndices III, IV e V).

Todos os pacientes foram tabagistas no passado, sendo que a maioria ainda faz uso do cigarro com filtro. O início do consumo de tabaco ocorreu entre sete e 37 anos (média 15 anos) e o tempo médio de consumo de cigarros foi de 37 anos, sendo que 60% dos pacientes fumaram mais que 30 cigarros diariamente.

Em relação aos sítios anatômicos das lesões, 17 (57%) são de língua e soalho da boca, seis (20%) são da gengiva e área retromolar, cinco (16%) são da região tonsilar-amigdalina e dois (7%) de base de língua. O tempo de evolução do tumor após o diagnóstico pelo próprio paciente foi extremamente variado com valor modal de seis meses à dois anos. A recorrência familial de neoplasias entre parentes de primeiro grau (pai, mãe, irmãos, F=1/2)[50] foi relatada em 36% dos pacientes.

No ato da internação todos os pacientes submeteram-se a raios-X no tórax dos quais 20 fizeram em média, três raios-X extras nos últimos seis meses anteriores à pesquisa. Ainda, dez pacientes relataram o uso constante de medicamentos, principalmente de analgésicos também nos últimos seis meses.

[49] questionário psicológico de avaliação do alcoolismo, incluindo perguntas de quatro tipos (*Cut-down, Annoyed, Guilty, Eye-opener*).
[50] F = coeficiente de parentesco (*relationship*)

3.1.2 - Caracterização da amostra dos controles

Os indivíduos que compõem o grupo controle são membros da Igreja Assembléia de Deus que por convicção religiosa não fazem uso de bebidas alcoólicas ou cigarros. A participação desses indivíduos também foi voluntária, de modo que os pacientes ou seus respectivos responsáveis, também assinaram o consentimento informado ao responder o questionário para participar da pesquisa (Apêndice VI).

Como todos esses indivíduos, com exceção de um paulistano, moram na cidade de Vinhedo (SP), região de localização da Igreja, dois indivíduos são parentes em segundo grau. Entretanto a amostra é bastante semelhante do ponto de vista étnico, cultural e sócio-econômico ao grupo de pacientes (Apêndice VII).

A idade dos 30 indivíduos controles variou de 28 a 64 anos com idade média de 38 anos. Entre esses indivíduos 17 são brancos, 11 são pardos e apenas dois são negros. Quanto ao grau de escolaridade, 40% completou o primário e apenas um possui nível superior enquanto o restante atingiu o ginásio ou o colégio.

Apenas um indivíduo é solteiro enquanto os demais são casados com número de filhos variando de um a 13 (média de três filhos). Um caso de aborto espontâneo da esposa foi relatado por somente um indivíduo. Quanto à profissão, 43% são prestadores de serviço, 20% trabalham em indústria e o restante no comércio ou construção. Um indivíduo é ministro evangélico e outro, com nível superior, é engenheiro eletrônico.

Nenhum indivíduo desse grupo mencionou consumo de álcool no presente, porém 50% o consumiram no passado, revelando o uso de bebidas destiladas e fermentadas. O tempo de abstinência do álcool foi de quatro anos em média com variação de três meses a 11 anos. A

intensidade do consumo de álcool, de acordo com a mesma classificação dos pacientes, foi na classe um para todos os indivíduos, com exceção apenas de um indivíduo que foi classificado na classe quatro.

Embora nenhum dos indivíduos seja fumante, 12 disseram ter fumado no passado. A maioria desses ex-fumantes fumava de um a dois cigarros diariamente e o tempo de abstinência desses indivíduos variou de três a sete anos (média de 4,5 anos). Apenas quatro desses indivíduos fumavam cigarros de corda ou palha.

Nos seis meses antecedentes à pesquisa, oito indivíduos disseram ter realizado raios-X e cinco apontaram o uso de medicamentos como antibiótico, corticóide, calmante, diurético e antigripal.

Ainda, 26 indivíduos responderam positivamente quanto ao consumo diário de café, dos quais 30% referiram consumo intenso diariamente. Quanto ao chá, 40% responderam negativamente, enquanto o restante admitiu consumo diário baixo ou esporádico.

3.1.3 – Diferenças entre sujeitos e controles

A principal diferença entre os sujeitos e controles deve-se à abstinência alcoólica. Embora 20 sujeitos estivessem abstinentes no momento da pesquisa, o grupo relevou uma média de 32 anos de consumo crônico de bebidas alcoólicas. No grupo controle, apesar de 50% dos indivíduos terem revelado consumo no passado, todos os indivíduos declararam abstinência alcoólica no momento da pesquisa. Em relação à intensidade do consumo do álcool, os sujeitos revelaram, em média, consumo três vezes maior do que a dose consumida pelos controles no passado.

Sujeitos e controles também diferem quanto ao tabagismo. Enquanto todos os sujeitos foram fumantes ativos (média de 37 anos) no passado, a maioria ainda fumava mais do que 30 cigarros diariamente no momento dessa investigação. Os indivíduos do grupo controle não mencionaram consumo de cigarros no momento da pesquisa, e quanto aos que haviam fumado no passado, a intensidade foi quase insignificante, especialmente considerando que estes estavam abstinentes por 4,5 anos em média, no momento da pesquisa.

A homogeneidade entre esses dois grupos deve-se principalmente às condições sociais, étnicas, culturais e sócio-econômicas conforme descritas anteriormente. Entretanto, observou-se, ainda, heterogeneidade entre pacientes e controles com relação à idade. A diferença entre as idades dos grupos de pacientes e controles é extremamente significante, como observa-se na Tabela I. A distribuição individual absoluta da idade em ambos grupos pode ser observada nas Tabelas II e III que aparecem nos resultados.

Tabela I - Intervalos e idades médias, em anos, de 30 pacientes e 30 controles comparados através do teste t.

Grupo	Intervalo	média ± ep	t (gl)	P
Pacientes	37 - 76	52,90 ± 1,63	6,464 (58)	<0,0001
Controles	28 - 64	38,37 ± 1,55		

3.2 - Análise citogenética das figuras interfásicas

Para a análise de micronúcleos e das anomalias metanucleares, realizou-se a coleta das células de escamação de três regiões distintas da boca de cada paciente. Da região ao redor da lesão tumoral, da região correspondente oposta à lesão, e de uma terceira região denominada fundo de saco gengivo-labial superior (Fig 3), onde raramente são diagnosticadas neoplasias. Consequentemente, tanto a região oposta ao tumor como a fundo de saco gengivo-labial superior foram previamente consideradas controles intra-individuais. Nos indivíduos controles, a coleta também foi realizada na região fundo de saco gengivo-labial superior e na região interna das bochechas direita e esquerda de cada indivíduo.

As células de cada região foram colhidas separadamente com auxílio de escovinha

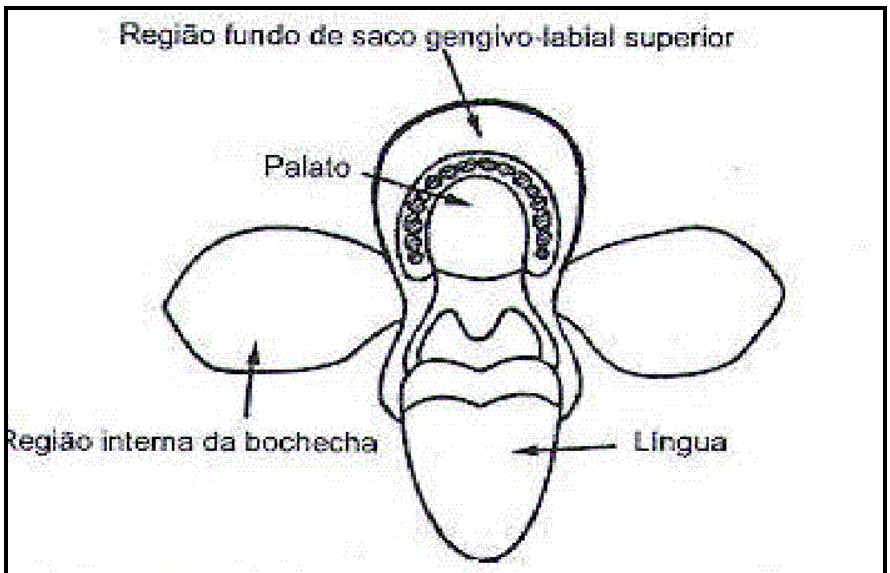


Figura 3 - Esquema representativo das regiões orais (adapta de Stich & Rosin, 1984).

(*cytobrush*[51]) e acondicionadas em frascos contendo 5 ml de solução fisiológica conforme sugestão de Gattás e col. (1992). No laboratório, realizou-se a fixação e a coloração por técnica de Sarto e col., (1987) modificada de acordo com o procedimento a seguir.

[51] Escova flexível com cerdas macias normalmente utilizada para coleta de células do cérvice uterino.

Após a coleta, o material foi transferido para tubos cônicos e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante desprezado. Em seguida, acrescentou-se 4 ml de fixador *Carnoy* (metanol/ácido acético na proporção 3:1) e realizou-se nova centrifugação a 1500 rpm por mais 5 minutos. Esse processo de fixação foi repetido e o sobrenadante retirado. O material foi ressuspendido em aproximadamente 2 ml de fixador, pingaram-se de 2 a 3 gotas em uma lâmina previamente lavada, gelada e úmida, e o restante foi congelado.

As lâminas foram coradas imediatamente após secarem à temperatura ambiente. Para a coloração utilizou-se o corante *Feulgen* de modo que as lâminas foram hidrolizadas por HCl 5 N durante 5 minutos, imersas em reativo de *Schiff* por 90 minutos à 4°C, e lavadas em três recipientes contendo água destilada. Em seguida foram mergulhadas em uma solução a 0,5% de *Fast-Green* por 1 minuto e lavadas por três vezes em etanol absoluto. O preparo desses corantes modificado de Stich e col. (1985) e Ribeiro (1991), encontra-se no apêndice VIII.

Após a coloração, realizou-se a montagem das lâminas permanentes com lamínulas e bálsamo do Canadá (*Entelan*). A análise em teste cego foi realizada em microscópio *Nikon Optiphot* com iluminação simples em objetiva de 40x. A confirmação das alterações nucleares realizou-se com aumento de 100x. No presente trabalho, utilizaram-se os critérios de classificação dos micronúcleos e das anomalias metanucleares estabelecidos por Tolbert e col. (1992) com as seguintes modificações:

a) Contagem das células: Foram incluídas na contagem as células que tinham os núcleos normais e intactos, com perímetro nuclear liso e distinto, que apresentavam o citoplasma também intacto, com exceção às que tinham pequenas dobras e pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes. As células que não continham esses critérios foram descartadas da análise.

b) Contagem de micronúcleos: Registrou-se o micronúcleo (Fig 4a, b, c), sob dois aspectos: quanto ao número de células com micronúcleos e quanto ao total de micronúcleos, uma vez que uma única célula apresentou, em alguns casos, mais de um micronúcleo (Fig 4d,e). Consideraram-se micronúcleos as alterações citoplasmáticas *Feulgen*-positivas, menor que 1/3 do tamanho do núcleo principal, arredondadas, que estavam no mesmo plano focal do núcleo, com coloração e textura similar à do núcleo e ausência de sobreposição ou pontes com o núcleo. Os micronúcleos dispostos lateralmente ao núcleo assim como os encontrados em células binucleadas (Fig 4f) também foram incluídos na contagem.

c) Contagem das anomalias metanucleares: Contaram-se ainda, como anomalias metanucleares, as células binucleadas, cariorréxis, cariólises e *broken-eggs* (Fig 5). As células com picnose e cromatina condensada foram excluídas da análise devido à dificuldade e subjetividade de classificação. Para a contagem dessas anomalias utilizaram-se os critérios estabelecidos por alguns autores conforme a descrição no item 1.2 – Aberrações cromossômicas e figuras interfásicas anômalas, dessa dissertação.

Concomitantemente à coleta de células de escamação da mucosa oral, colheu-se sangue dos mesmos pacientes para a análise de aberrações cromossômicas. Após a cultura de linfócitos através da técnica modificada de Moorhead e col. (1960), o material fixado foi estocado em frascos (*eppendorf*) e congelados para a segunda fase da pesquisa a ser realizada no programa de doutorado. Além disso, o sangue extra forneceu amostras de DNA que também foram congeladas para eventuais pesquisas futuras.

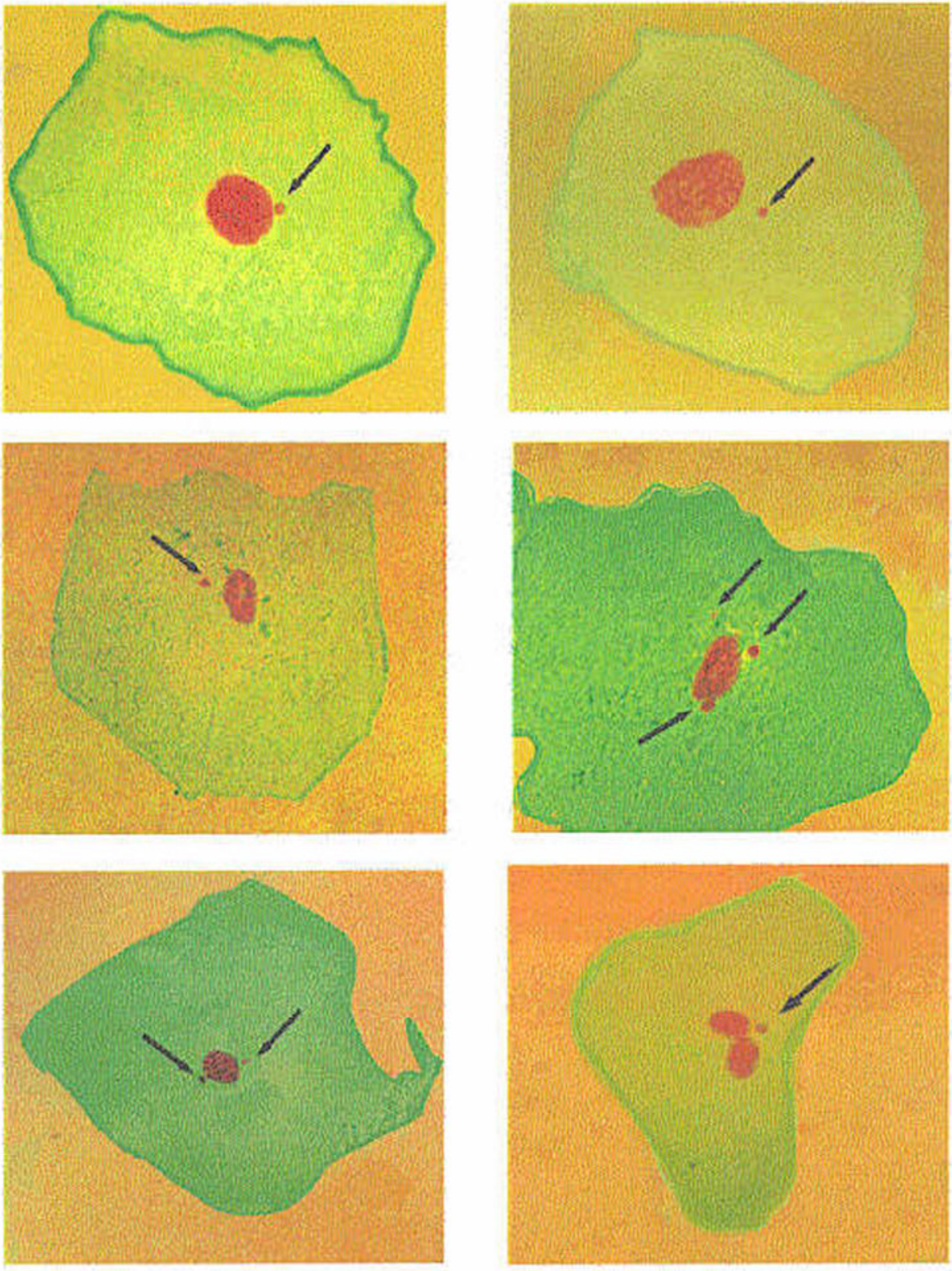


Figura 4 - Células de escamação da mucosa oral de pacientes e controles da presente investigação.
a), b) e c) com um micronúcleo, d) e e) contendo mais de um micronúcleo, f) binucleada com micronúcleo.

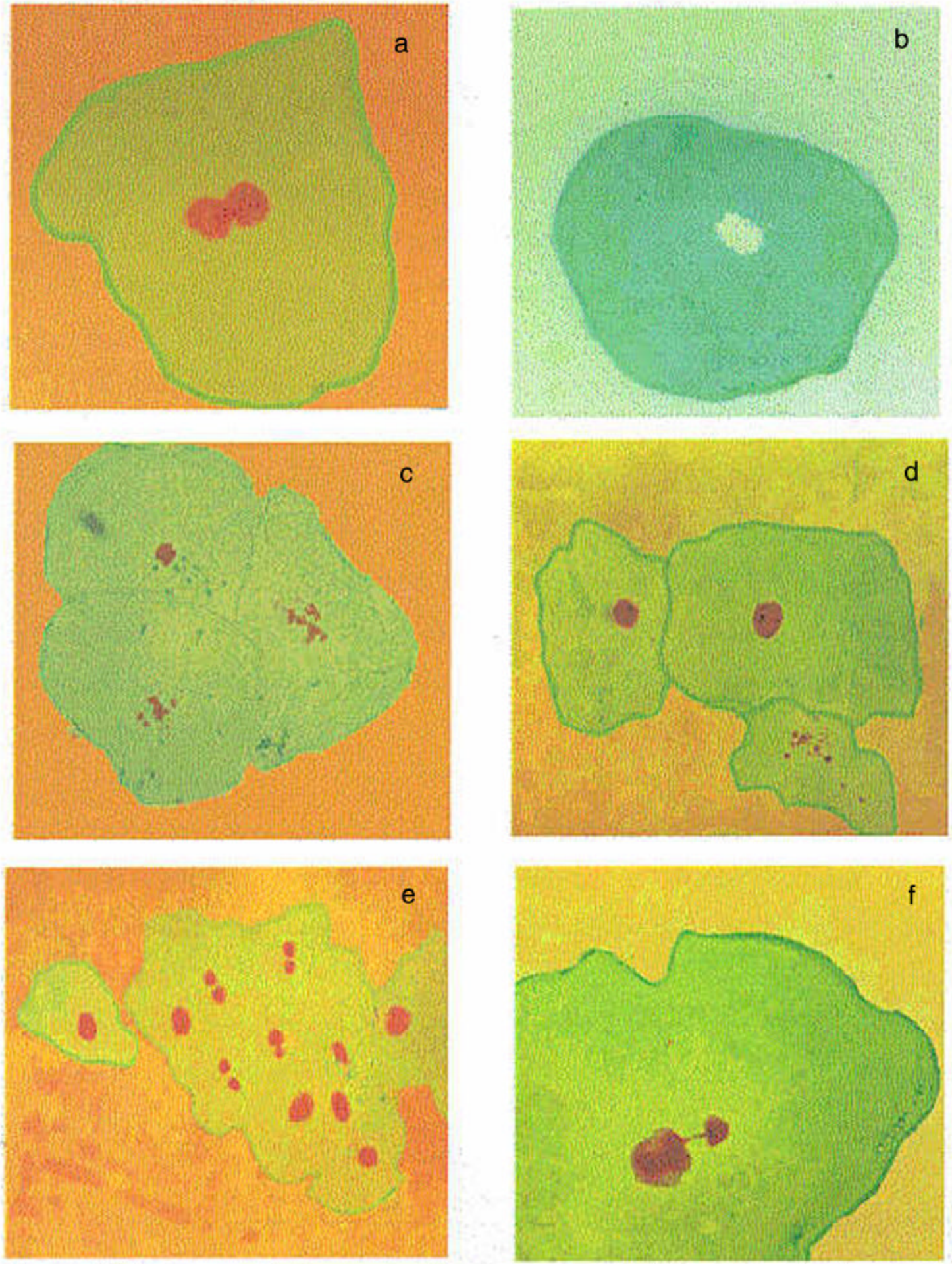


Figura 5 - Células de escamação da mucosa oral de pacientes e controles da presente investigação. a) binucleada (BI), b) cariólise (CL), c) e d) cariorréxe (CR), e) e f) *broken egg* (BE).

3.3 - Análise estatística

Na ausência de agentes mutagênicos, a ocorrência de células com micronúcleos (CMN) ou total de micronúcleos (TMN) e das anomalias metanucleares (BI = células binucleadas; CR = cariorréxes; CL = cariólises; e BE = *broken egg*), por indivíduo, pode ser considerada um evento aleatório que exibe distribuição de *Poisson* ou binominal positivamente assimétrica (média superior a moda).

Variáveis de ocorrência rara (<1/100) como o número de células sangüíneas por campo microscópico (câmara de *Neubauer*), número de ninhos por área florestal, desmoronamentos por ano, produtos defeituosos por mês em uma fábrica, etc., que correspondem à ocorrência de eventos em relação a amostragens arbitrárias de universos espaciais ou temporais, segue uma distribuição aleatória conhecida por *Poisson,* em que a média é teoricamente igual à variância ($\overline{X} = s^2$), podendo simular uma distribuição binomial positivamente assimétrica quando N é grande e p, a probabilidade do evento, é muito pequena. Todavia, sua variância seria teoricamente maior que a média ($\overline{X} < s^2$).

A ocorrência de MN por célula (N) ou por indivíduo (n) é reconhecidamente um evento raro (mutação espontânea) que exibe também distribuição aleatória com freqüência inferior a 1/1000. Consequentemente p/N mede a diversidade intra-individual e p/n expressa a diferença inter-individual cuja distribuição por classes de indivíduos agrupado por número de MN (0,1,2, etc.) apresenta, aleatoriamente, moda na classe de zero MN por indivíduo. Sob a ação de agentes mutagênicos a moda (e logo a média) aumenta e a variância torna-se maior que a média ($s^2 > \overline{X}$), aproximando-se de uma distribuição binomial positivamente assimétrica.

Como a avaliação da freqüência natural (espontânea) de micronúcleos (MN) nas populações humanas, dependendo dos critérios citológicos e estatísticos, pode estar em torno de 1‰ por indivíduo, a contagem mínima de células que possa incluir a totalidade do intervalo de distri-

buição intra-individual seria, no mínimo, de 2000 células. Contagens menores, obviamente, produzem distribuições truncadas, gerando viéses estatísticos nos resultados.

As anomalias metanucleares, com exceção de BE, com freqüência média de 0,4 por mil, exibem, a julgar pela presente investigação, ocorrência várias vezes superiores a do MN (BI = 10 vezes, CR = 9,5 vezes e CL = 15 vezes). Consequentemente, as freqüências naturais de MN e BE seguem aparentemente a distribuição de *Poisson* com moda ou classe mais freqüente igual a zero e as demais anomalias metanucleares (BI - CR - CL) mostram dispersão de acordo com uma binominal positivamente assimétrica. O ajuste da distribuição de MN da região oral oposta à lesão neoplásica e das regiões orais dos indivíduos controles, aos valores esperados de acordo com a distribuição de *Poisson*, foi estimado através do teste do χ^2, confirmando a expectativa estatística.

Estimou-se a significância estatística dos resultados através de testes paramétricos (teste *t* de *Student*, análise de regressão múltipla, ANOVA[52]) e testes não paramétricos (testes de *Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Dunn*), tabelas de contingência do χ^2 e exato de *Fisher*), bem como a estatística descritiva das amostras e grupos, através dos programas de computação *Primer*, *Microstat* e *Instat*.

Efetuou-se a comparação das médias etárias entre pacientes ($\overline{X}_1$) e controles ($\overline{X}_2$) através do teste *t* de *Student.* Obteve-se a significância estatística da diferença entre as duas amostras com variáveis paramétricas de distribuição normal, pela razão da diferença entre as médias e seu erro padrão através do valor de $t = d/s_{\overline{X}1 - \overline{X}2}$, de modo que

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}},$$

onde n_1 e n_2 são os respectivos tamanhos das amostras, com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

[52] Análise de variância

Estimou-se a associação da freqüência de MN com fatores intervenientes quantitativos, avaliados por questionários anamnésticos, através do modelo de regressão múltipla escalonada (*stepwise*). Os valores absolutos das freqüências de CMN e TMN (y), considerados como variáveis dependentes, foram aproximadamente normalizados através da transformação da raiz quadrada multiplicada por mil ($\sqrt{y+0,5}x1000$) e submetidos à análise de regressão sobre algumas variáveis quantitativas (x_i), consideradas independentes e discriminadas na Tab XVII, conforme a equação $y = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + ... + b_n x_n$, formalmente representada por:

$$y = a + \sum_{i=1}^{n} b_i x_{i+} e ,$$

em que, x_i é a i-ésima variável independente considerada na análise; n, o número de variáveis independentes; b_i, o i-ésimo valor dos coeficientes parciais da regressão; e e, o erro residual não explicado pela equação. Testou-se a significância da regressão através do teste *t* de *Student* e pela análise da variância (*Fisher*), considerando a distribuição unimodal com a significância unicaudal. Estimou-se o valor de *t* pela relação entre o coeficiente de regressão parcial da variável considerada e seu erro padrão ($t = b/s_b$) e o valor de *F*, isto é, análise da variância dos conjuntos das regressões parciais pela relação entre os quadrados médios da regressão (s^2_r) e o quadrado médio do resíduo (s^2_e).

Uma vez que as variáveis dependentes CMN e TMN bem como as metanucleares (BI, CR, CL e BE) não apresentam distribuição normal e suas variâncias são heterogêneas, na comparação entre as amostras para a estimativa das diferenças entre as médias, consideraram-se as distribuições dos parâmetros como patamares (*ranks*) de acordo com sua magnitude, através do teste de *Mann-Whitney*, entre duas amostras, e seu equivalente, teste de *Kruskal-Wallis* entre três ou mais amostras. Obteve-se significância das diferenças entre as freqüências médias no primeiro teste (*MW*) pelo valor *U* e no segundo (*KW*) através do valor de *H* (razão entre a soma

dos quadrados e o quadrado médio). O valor de *U* segue aproximadamente a distribuição normal (*Z*) quando o tamanho da amostra menor não excede a 20 e o tamanho da amostra maior não excede a 40. Também, os valores críticos de *U* e *H* se aproximam da distribuição do χ^2 quando o número de patamares é maior do que cinco (*k<5*) com *k-1 gl* (Kruskal & Wallis, 1952). A análise da variância não paramétrica foi, ainda, realizada pelo teste de comparação múltipla de *Dunn*, que testa a significância das diferenças entre pares de amostras. Para tornar mais poderoso os testes de significância analisaram-se as diferenças intra e inter-individuais entre as regiões orais, através do teste de *Dunn* (Tabs X e XI).

Em todos os testes de significância, limitou-se a 5% o nível crítico de rejeição da hipótese nula. Uma discussão detalhada dos testes utilizados na presentes investigação pode ser obtida nos livros Canover (1980) e Zar (1996).

3.4 - Abreviações e notações

3.4.1 – Abreviações

MN = micronúcleo

CMN = célula com micronúcleo

TMN = total de micronúcleo

A = região contra-lateral ao tumor

B = região ao redor do tumor

C = região fundo de saco gengivo-labial superior dos pacientes

D = bochecha direita

E = bochecha esquerda

F = região fundo de saco gengivo-labial superior dos controles

BI = célula binucleada

CR = cariorréxe

CL = cariólise

BE = *broken-egg*

CN = célula normal

id = idade

fa = idade no término do consumo de álcool

tf = tempo de consumo de cigarros (anos)

ta = tempo de consumo de álcool (anos)

ia = idade no início do consumo de álcool

tc = tempo de manifestação do câncer

3.4.2 - Notações estatísticas

N = número de células

n = número de indivíduos

DNT = dados não transformados

TRQ = transformação da raiz quadrada: $\sqrt{y + 0,5}x1000$

x = variável dependente

y = variável independente

m $\pm$ ep = média $\pm$ erro padrão da média

m $\pm$ dp = média $\pm$ desvio padrão da média

t = teste t de significância da diferença das médias entre dois grupos

gl = grau de liberdade

P = probabilidade

χ^2 = qui-quadrado

dn = desvio da normalidade

b $\pm$ s_b = coeficiente de regressão $\pm$ erro padrão

r = coeficiente de correlação

r^2 = coeficiente de determinação

a = intercepto de y

F = razão entre as variáveis entre e dentre os grupos

H = valor do nível de significância do teste de *Kruskal-Wallis* (razão entre a soma dos quadrados e o quadrado médio total). O valor crítico de H se aproxima da distribuição do χ^2 quando o número de *ranks* (k) é maior que cinco, com k -1 gl

U = valor do nível de significância do teste de *Mann-Whitney*

Significância = P>0,05 - não significante;

P<0,05 - significante;

P< 0,01 - altamente significante;

P<0,001 - acentuadamente significante;

P<0,0001 - extremamente significante.

4 - RESULTADOS

Na avaliação da frequência de micronúcleos examinaram-se 2000 células epiteliais escamativas em cada uma das três regiões da mucosa oral de 30 sujeitos e 30 controles. Os micronúcleos (MN) foram consignados por célula com MN (CMN) ou total de MN (TMN) por indivíduo, de modo que analisaram-se 6000 células por indivíduo correspondendo a 180.000 nos sujeitos e também 180.000 nos 30 controles atingindo 360.000 células no cômputo total.

Contagem de micronúcleos superior a um por célula ocorreu quase que restritamente aos pacientes como decorrência (e evidência) da ação de agentes mutagênicos que no presente caso seria o álcool. Somente em dois indivíduos controles observaram-se dois ou mais micronúcleos (Tabs II e III). Além disso, analisaram-se em cada indivíduo de ambos grupos, as anomalias metanucleares (BI, CR, CL e BE).

4.1 - Distribuição das variáveis citogenéticas

4.1.1 - Distribuição da frequência de MN e de CMN nos sujeitos e controles

A Tabela II apresenta a distribuição absoluta dos resultados da análise de CMN e de TMN por 2000 células por indíviduo em cada região oral dos 30 pacientes com suas respectivas idades. Essas variáveis revelaram valores que atingiram extremos de zero até sete micronúcleos, especialmente de TMN na região B. Os valores de CMN e TMN foram idênticos na região A de todos os pacientes. Curiosamente um dos pacientes mais jovens (n°12) apresentou frequência de CMN e TMN maior que o mais idoso (n°27) nas regiões B e C. Também, outro paciente, entre os mais jovens (n°17), revelou frequência de CMN e TMN maior que o mais idoso (n°27), entretanto, nas regiões A e C.

Tabela II - Distribuição da idade, do número de células com MN e do total de MN por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C de 30 pacientes.

Paciente	Idade	CMN			TMN		
(n°)		A	B	C	A	B	C
1	67	3	4	1	3	7	1
2	53	2	4	0	2	5	0
3	47	1	1	0	1	2	0
4	50	2	2	0	2	2	0
5	49	0	1	0	0	1	0
6	52	1	1	0	1	1	0
7	52	0	0	0	0	0	0
8	48	2	2	5	2	4	5
9	47	4	1	1	4	1	1
10	67	2	3	0	2	3	0
11	55	0	0	0	0	0	0
12	37	0	5	1	0	5	1
13	57	0	2	0	0	2	0
14	40	0	4	3	0	6	3
15	48	0	1	0	0	2	0
16	69	1	0	0	1	0	0
17	37	3	0	1	3	0	1
18	55	2	1	1	2	1	1
19	50	1	3	0	1	4	0
20	54	0	0	0	0	0	0
21	52	0	0	0	0	0	0
22	50	0	1	0	0	1	0
23	54	0	0	0	0	0	0
24	54	0	0	2	0	0	4
25	42	0	2	0	0	2	0
26	54	2	1	1	2	1	1
27	76	1	0	0	1	0	0
28	61	0	0	0	0	0	0
29	61	0	3	0	0	3	0
30	49	1	5	0	1	6	0

Tabela III apresenta a frequencia absoluta dos números de CMN e de TMN observada por 2000 células por indivíduo em cada região oral dos 30 indivíduos controles bem como suas respectivas idades. Observa-se nesta tabela que, além das três regiões orais apresentarem os mesmos valores de CMN e TMN por indivíduo, houve apenas três classes de frequência para ambas variáveis com valores entre zero e dois. Semelhantemente ao observado nos pacientes, o indivíduo mais jovem (n°20) apresentou mais micronúcleos nas regiões E e F quando comparado ao mais idoso (n°24).

Tabela III - Distribuição da idade, do número de células com MN e do total de MN por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais D, E e F de 30 controles.

Paciente	Idade	CMN			TMN		
(n°)		D	E	F	D	E	F
1	33	1	0	0	1	0	0
2	40	0	0	1	0	0	1
3	32	1	0	0	1	0	0
4	41	0	0	0	0	0	0
5	38	0	0	0	0	0	0
6	52	1	0	0	1	0	0
7	34	0	0	0	0	0	0
8	50	0	0	0	0	0	0
9	33	0	0	0	0	0	0
10	51	2	2	0	2	2	0
11	42	0	0	1	0	0	1
12	30	0	0	0	0	0	0
13	33	1	0	1	1	0	1
14	32	0	0	1	0	0	1
15	36	0	1	0	0	1	0
16	42	0	0	0	0	0	0
17	35	0	1	0	0	1	0
18	29	0	1	0	0	1	0
19	31	0	1	0	0	1	0
20	28	0	1	1	0	1	1
21	50	0	0	0	0	0	0
22	40	1	1	0	1	1	0
23	33	0	0	0	0	0	0
24	64	0	0	0	0	0	0
25	32	0	0	0	0	0	0
26	30	0	0	2	0	0	2
27	47	0	0	0	0	0	0
28	35	0	0	0	0	0	0
29	36	0	0	0	0	0	0
30	42	1	0	0	1	0	0

A Tabela IV mostra a distribuição por classe de frequência de CMN e TMN por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C dos 30 pacientes e nas regiões D, E e F dos 30 controles. Esses valores permitiram reconhecer a classe zero como modal tanto nos pacientes como nos controles para ambas variáveis. Essas distribuições nas três regiões orais dos pacientes e dos controles aparecem comparativamente nos histogramas da figura 6.

Tabela IV - Distribuição de 30 pacientes e 30 controles por frequência do número de células com MN e total de MN por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B, C e D, E, F, respectivamente.

Pacientes						
Frequência	**CMN**			**TMN**		
(N)	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**
0	15	10	21	15	10	21
1	6	8	6	6	6	6
2	6	4	1	6	5	0
3	2	3	1	2	2	1
4	1	3	0	1	2	1
5	0	2	1	0	2	1
6	0	0	0	0	2	0
7	0	0	0	0	1	0
Controles						
Frequência	**CMN**			**TMN**		
(N)	**D**	**E**	**F**	**D**	**E**	**F**
0	23	23	24	23	23	24
1	6	6	5	6	6	5
2	1	1	1	1	1	1

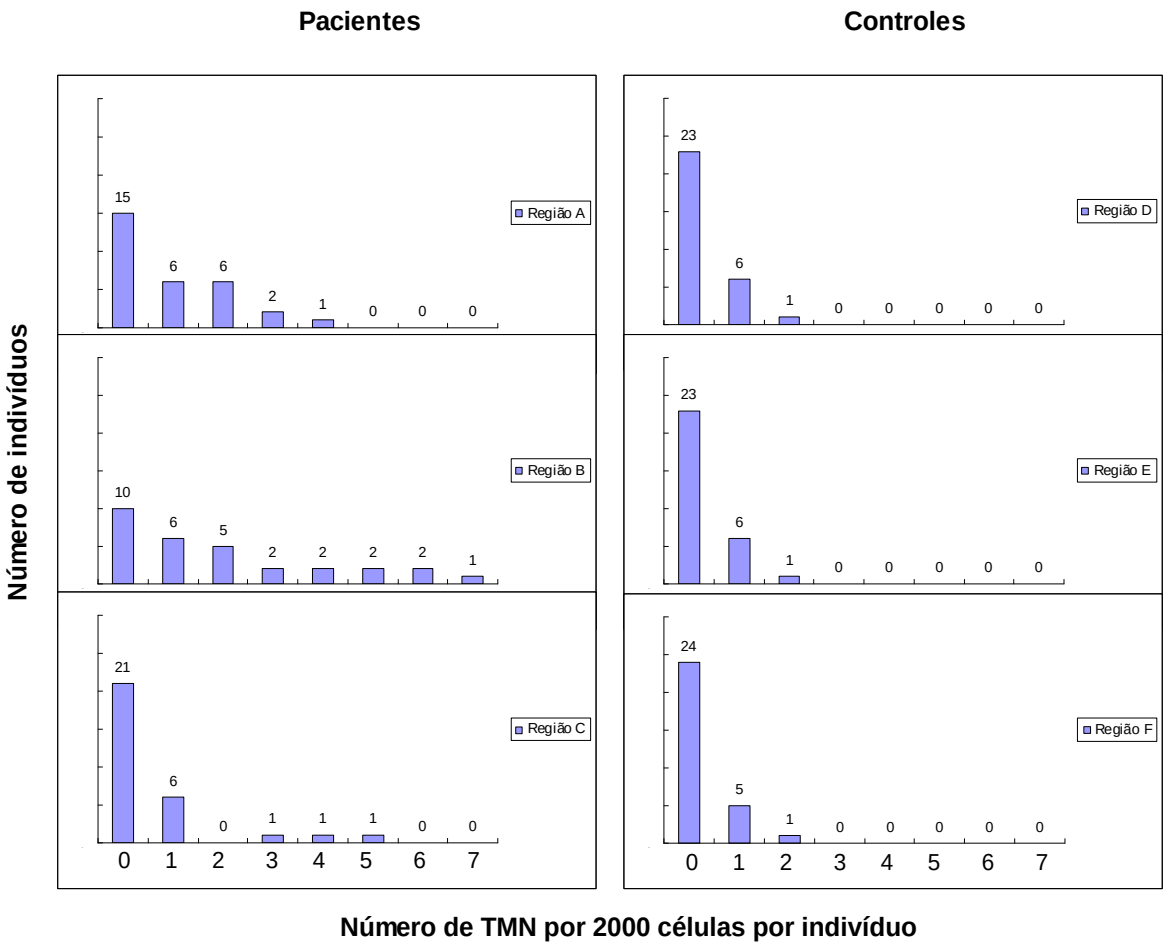


Figura 6 - Distribuição do número total de MN por 2000 células por indivíduo nas regiões orais A, B e C dos 30 pacientes, e nas regiões orais D, E e F dos 30 controles.

Os três histogramas dos pacientes correspondentes às regiões A, B e C (Fig 6) revelam um desvio para a direita na abcissa, isto é, aumento em ordem crescente o número de MN por indivíduo nas três regiões orais, principalmente na B. Entretanto, nos três histogramas dos indivíduos controles nas regiões D, E e F (Fig 6) observa-se igualmente três colunas, não ocorrendo, na ausência de agentes mutagênicos, não ocorra aumento na frequência de classes ou desvios à direita na abcissa.

4.1.2- Distribuição da frequência das anomalias metanucleares nos sujeitos e controles

A tabela V mostra a distribuição absoluta das anomalias metanucleares por 2000 células em cada uma das três regiões orais dos 30 pacientes e dos 30 controles. Nesta tabela observa-se um padrão bastante aleatório de distribuição dessas anomalias tanto nos pacientes como nos controles. Embora a BI e a CL tenham sido, de modo geral, mais frequentes que as demais nos pacientes, a mesma situação não foi observada nos controles. Merece ainda ser destacado que, em ambos os grupos, as anomalias metanucleares, com exceção de BE, apresentaram frequências superiores às de CMN e TMN (cf. Tabs II e III).

Tabela V - Distribuição de anomalias metanucleares (BI, CR, CL, BE) por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C de 30 pacientes e nas regiões orais D, E e F de 30 controles.

N°	Pacientes												Controles											
	Binucleada			Cariorréxe			Cariólise			*Broken-egg*			Binucleada			Cariorréxe			Cariólise			*Broken-egg*		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	D	E	F	D	E	F	D	E	F	D	E	F
1	26	13	15	0	0	2	12	35	7	0	0	0	5	4	0	8	6	7	1	1	0	0	0	0
2	35	31	12	1	1	0	0	49	7	0	0	0	5	8	2	12	17	0	1	0	3	0	0	3
3	27	25	12	0	0	0	27	27	55	0	0	0	2	4	3	2	6	0	1	0	3	0	0	0
4	16	22	4	0	1	0	12	2	15	0	0	0	5	8	8	0	6	3	0	2	0	1	0	1
5	18	12	12	0	0	0	53	27	44	0	0	0	7	4	3	6	5	0	0	0	0	0	0	0
6	10	10	8	5	1	0	44	24	53	0	1	0	3	5	11	1	1	0	0	0	0	1	0	0
7	20	20	11	0	1	0	5	5	4	0	1	0	4	5	5	2	22	1	1	0	5	1	0	4
8	14	10	26	0	0	0	35	4	13	0	0	50	2	1	0	0	2	1	0	1	0	7	6	28
9	15	13	11	2	1	1	2	1	37	0	1	4	4	0	6	8	2	0	0	0	0	0	0	0
10	16	6	12	1	1	0	40	20	91	0	0	1	1	1	1	6	2	1	5	0	1	0	0	1
11	8	20	11	1	1	0	9	68	54	3	0	0	5	3	1	4	8	0	4	3	0	0	0	0
12	16	20	7	0	0	0	30	8	41	1	0	10	3	1	6	5	2	2	8	5	23	0	0	0
13	23	18	14	0	0	0	1	10	12	0	0	6	4	2	5	2	0	1	2	1	3	0	1	0
14	14	11	29	1	1	5	15	60	17	0	0	0	4	0	4	13	18	13	6	0	1	0	0	1
15	13	8	20	0	0	0	1	3	15	0	1	0	7	7	4	2	7	1	1	1	9	0	0	0
16	9	8	12	1	0	0	48	33	10	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	0	0	1	0	0
17	12	14	6	1	0	4	74	32	16	1	0	1	2	1	1	5	4	0	9	1	10	0	0	0
18	11	9	88	12	7	8	8	9	5	0	0	1	2	2	4	2	1	0	31	7	0	0	0	0
19	4	1	0	3	5	0	59	24	31	0	0	1	3	3	3	16	6	0	10	3	1	0	0	0
20	3	2	6	0	0	0	0	11	2	0	0	0	3	1	4	8	8	12	23	5	38	0	0	0
21	3	0	1	0	1	0	3	6	4	1	0	0	1	1	1	22	3	0	1	3	0	0	1	0
22	3	4	0	0	0	0	6	0	7	1	1	0	1	2	4	8	13	0	2	3	3	2	2	0
23	1	3	3	0	2	1	1	19	2	0	0	0	2	0	0	7	7	2	0	0	13	0	0	1
24	0	8	1	0	0	0	40	0	13	1	1	0	2	3	5	2	0	0	0	0	0	0	0	1
25	0	2	0	0	0	1	28	1	25	0	0	0	5	1	3	2	3	3	0	2	2	0	0	0
26	6	3	1	3	0	0	2	8	0	0	0	0	3	1	3	1	2	3	0	0	0	0	0	0
27	4	1	3	2	1	0	2	0	9	0	0	0	2	0	6	7	13	1	5	0	8	0	0	0
28	10	1	4	27	9	28	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	9	0	0	0	2	0	0	0
29	1	1	2	7	4	27	0	9	3	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
30	6	2	0	0	16	0	1	42	25	0	0	0	4	6	0	2	8	3	15	3	0	0	0	0

4.1.3 - Estatística descritiva das variáveis citogenéticas

A Tabela VI mostra o número total de células e de indivíduos examinados bem como a frequência média e o erro padrão de CMN e TMN, por 2000 células por indivíduo, em cada região oral dos 30 pacientes e dos 30 controles.

Nos pacientes a região C, considerada controle intra-individual, apresentou os menores valores cuja média de CMN foi $0,53 \pm 0,20$[53] e de TMN, $0,60 \pm 0,23$. Na região A, contra-lateral, também previamente considerada controle, observou-se o dobro da frequência dessas variáveis ($0,93 \pm 0,21$). E na região B, ao redor do tumor, a frequência de CMN ($1,57 \pm 0,29$) e de TMN ($1,97 \pm 0,40$) atingiram valores três vezes maior que os observados na região C.

No grupo controle, entretanto, não houve diferença entre as regiões D e E ($0,27 \pm 0,10$). A região fundo de saco gengivo-labial superior (F), também analisada por ter sido sua correspondente C considerada controle nos pacientes, apresentou frequência menor ($0,23 \pm 0,09$) que as bochechas.

Apesar das diferenças na frequência das variáveis CMN e TMN nos pacientes, a comparação entre as três regiões orais desse grupo revelou a mesma tendência com maior significância para a variável TMN. Nos controles entretanto, além dos valores serem idênticos para ambas variáveis CMN e TMN, não foram observadas tais diferenças entre as regiões orais. Ainda, todos os desvios da normalidade na distribuição, testados pelo χ^2 foram extremamente significantes.

[53] Média e erro da média por 2000 células no total de 60.000 células dos 30 indivíduos, o que corresponde a 0,265 por 1.000 células, ou ainda, 0,026%.

Tabela VI - Frequência absoluta e relativa, média e erro padrão de células com MN e do total de MN por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C de 30 pacientes e nas regiões orais D, E e F de 30 controles.

Pacientes

Região Oral	Total de células	CMN				TMN			
		N	m ± ep	c^2 (dn)	P	N	m ± ep	c^2 (dn)	P
A	60.000	28	0,933 ± 0,209	51,60	4,480E-07	28	0,933 ± 0,209	51,60	4,480E-07
B	60.000	47	1,567 ± 0,294	27,07	5,491E-05	59	1,967 ± 0,388	21,73	5,879E-04
C	60.000	16	0,533 ± 0,202	99,60	4,486E-07	18	0,600 ± 0,228	99,60	4,486E-07

Controles

Região Oral	Total de células	CMN				TMN			
		N	m ± ep	c^2 (dn)	P	N	m ± ep	c^2 (dn)	P
D	60.000	8	0,267 ± 0,095	124,13	4,486-07	8	0,267 ± 0,095	124,13	4,486-07
E	60.000	8	0,267 ± 0,095	124,13	4,486E-07	8	0,267 ± 0,095	124,13	4,486E-07
F	60.000	7	0,233 ± 0,092	133,20	4,486E-07	7	0,233 ± 0,092	133,20	4,486E-07

Encontram-se na Tabela VII as frequências médias e erros padrões com significância do desvio da normalidade (χ^2) das anomalias metanucleares por 2000 células por indivíduo nas três regiões orais dos pacientes e controles.

As médias mais frequentes das anomalias metanucleares ocorreram mais ou menos aleatoriamente nas três regiões orais. Independentemente de cada região oral, as anomalias mais frequentes nos pacientes foram CL (20,57 $\pm$ 3,93) seguida por BI (11,47 $\pm$ 1,60), CR (2,57 $\pm$ 1,28) e BE (2,50 $\pm$ 1,69). Nos controles entretanto, a anomalia mais frequente foi CR (6,03 $\pm$ 1,04) seguida por CL (4,20 $\pm$ 1,50) e BI (3,23 $\pm$ 0,48) que tiveram frequencias aproximadas, enquanto BE (0,43 $\pm$ 0,24) foi a menos frequente. Quanto ao desvio da normalidade testado pelo teste do χ^2, BE (151,33) apresentou os maiores valores seguida por CR (93,73), CL (26,53) e BI (19,07) respectivamente nos pacientes. Nos controles o maior desvio também foi observado em BE (165,73), seguido entretanto, por CL (64,93), CR (43,07) e BI (15,87). Todos esses desvios foram extremamente significantes com exceção à BI tanto na região A dos pacientes como na região F dos controles que não alcançaram significância estatística.

Com exceção da região C, nos pacientes, e da região F, nos controles, o intervalo das frequências de BE (0,11 a 0,43) foi semelhante ao de CMN (0,23 a 1,57) e de TMN (0,23 a 1,97) nas outras regiões dos pacientes e controles. Entretanto, as anomalias metanucleares alcançaram frequências médias superiores às de MN nos pacientes. No caso de BI, verificou-se aumento de aproximadamente 10 vezes; CR variou entre 2 e 2,5 vezes; e CL de 18 a 20 vezes. Embora inferiores aos valores encontrados nos pacientes, nos controles essas anomalias também revelaram médias superiores às de MN cuja variação aproximada foi de 1 a 4 vezes para CL; de 2 a 6 para CR; e de 2,5 a 3 para BI.

Tabela VII - Média e erro padrão com significância do desvio da normalidade (χ^2) de anomalias metanucleares (BI, CR, CL, BE) por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C de 30 pacientes e nas regiões orais D, E e F de 30 controles.

Anomalias Nucleares	Pacientes				Controles			
	Região Oral	m ± em *	c^2 (dn)	P	Região Oral	m ± em *	c^2 (dn)	P
BI	A	11,467 ± 1,603	1,47	0,9169	D	3,100 ± 0,330	14,80	0,0113
	B	9,933 ± 1,513	18,00	2,946E-03	E	2,533 ± 0,439	15,87	7,35E-03
	C	11,033 ± 2,985	19,07	1,867E-03	F	3,233 ± 0,476	10,53	0,0615
CR	A	2,233 ± 0,976	58,00	4,486E-07	D	5,267 ± 0,934	20,67	9,359E-04
	B	1,767 ± 0,632	52,13	4,481E-07	E	6,033 ± 1,039	23,33	2,910E-04
	C	2,567 ± 1,281	93,73	4,486E-07	F	1,833 ± 0,599	43,07	4,128E-07
CL	A	18,633 ± 3,891	26,53	6,986E-05	D	4,200 ± 1,333	64,93	4,486E-07
	B	17,900 ± 3,405	21,73	5,879E-04	E	1,367 ± 0,341	46,80	4,424E-07
	C	20,567 ± 3,927	16,40	5,790E-03	F	4,200 ± 1,490	60,13	4,486E-07
BE	A	0,267 ± 0,117	130,53	4,486E-07	D	0,433 ± 0,243	128,93	4,486E-07
	B	0,110 ± 0,074	133,20	4,486E-07	E	0,333 ± 0,211	152,40	4,486E-07
	C	2,500 ± 1,685	151,33	4,486E-07	F	1,333 ± 0,935	165,73	4,486E-07

* total de células analisadas = 60.000

4.1.4 - Ajuste à fórmula de *Poisson*

A variabilidade entre as médias e as variâncias de CMN e TMN nos controles e pacientes, sugere que a frequência de MN ajusta-se à equação de *Poisson*. Após a comparação da distribuição observada com aquela esperada, usando-se as médias estimadas a partir dos controles e pacientes, os resultados foram compatíveis com essa distribuição testada através de teste do χ^2, como observa-se na Tabela VIII.

O ajuste da variável TMN, em termos de probabilidade foi maior para a região C (P=0,30), seguida pelas regiões A (P=0,89) e B (P=0,59), nas quais o número de TMN foi mais sensível ao ajuste do que o número de CMN.

No grupo controle, entretanto, as médias e variâncias revelaram-se praticamente iguais de modo que as freqüências observadas para as três regiões ajustaram-se plenamente à equação de *Poisson*, também testadas pelo χ^2 (Tab VIII). Consequentemente, a distribuição no grupo controle sugere que, na ausência de agentes mutagênicos, a frequencia de MN segue uma distribuição de *Poisson* (P=1,00).

As anomalias metanucleares, com exceção à BE que também se ajustou à distribuição de *Poisson* (P=0,92 nos pacientes e P=0,01 nos controles), apresentaram dispersão de acordo com uma binomial positivamente assimétrica.

Tabela VIII - Ajuste (χ^2) da frequência observada do número de células com MN e do total de MN por 2000 células por indivíduo, de 30 controles nas regiões orais A, B e C, e de 30 pacientes nas regiões orais D, E e F, à distribuição de *Poisson*.

Controles						
Variável	**Região Oral**	**Média**	**Variância**	c^2	**gl**	**P**
CMN	D	0,27	0,27	0,15	4	1,00
	E	0,27	0,27	0,15	4	1,00
	F	0,23	0,25	0,22	4	0,99
TMN	D	0,27	0,27	0,15	4	1,00
	E	0,27	0,27	0,15	4	1,00
	F	0,23	0,25	0,22	4	0,99
Pacientes						
Variável	**Região Oral**	**Média**	**Variância**	c^2	**gl**	**P**
CMN	A	0,93	1,30	2,33	6	0,89
	B	1,57	2,60	3,73	8	0,88
	C	0,53	1,22	2,64	5	0,75
TMN	A	0,93	1,30	2,33	6	0,89
	B	1,97	4,52	7,42	9	0,59
	C	0,60	1,56	6,01	5	0,30

4.2 - Comparações intra-individuais

4.2.1 - Variáveis dependentes: CMN e TMN

Uma vez que as frequencias de CMN e TMN desviaram-se significantemente da distribuição normal e se ajustaram à equação de *Poisson* (Tab VIII), a significância de sua heterogeneidade nas três regiões orais foi avaliada através do teste de *Kruskal-Wallis*. A Tabela IX apresenta a análise da variância não paramétrica quanto às variáveis CMN e TMN por 2000 células por indivíduo nas três regiões orais dos pacientes bem como as comparações entre as três regiões, através do teste de comparação múltipla de Dunn. O resultado da análise de 30 pacientes foi significante, porém TMN foi mais sensível em detectar a heterogenidade (P = 0,0053) em comparação com CMN (P = 0,0085).

Tabela IX - Análise da variância não paramétrica (*Kruskal-Wallis*) quanto ao número de células com MN e total de MN por 2000 células por indivíduo entre as regiões orais A, B e C de 30 pacientes, através do teste de comparação múltipla de *Dunn*.

Regiões	**CMN (m ± ep)**	**TMN (m ± ep)**
A	0,933 ± 0,209	0,933 ± 0,209
B	1,566 ± 0,294	1,966 ± 0,388
C	0,533 ± 0,202	0,600 ± 0,228
Significância	H (χ^2) = 9,53 P = 0,0085	H (χ^2) = 10,47 P = 0,0053

Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*

Comparação	**Variável**	**P**
A x B	CMN	>0,05
	TMN	>0,05
A x C	CMN	>0,05
	TMN	>0,05
B x C	CMN	<0,01
	TMN	<0,01

Os resultados indicam ainda que, das diferenças obtidas nos pareamentos entre as regiões A, B e C, somente a diferença entre as regiões B e C revelou-se altamente significante (P<0,01), enquanto as demais comparações não atingiram significância estatística.

A fim de tornar as comparações entre as regiões estatísticamente mais sensíveis, analisaram-se as distribuições das diferenças intra-individuais entre as três regiões orais (A-B); (A-C) e (B-C) dos 30 pacientes. A distribuição absoluta dessas diferenças encontra-se na Tabela X.

Tabela X - Distribuição das diferenças intra-individuais [(A-B), (A-C) e (B-C)] quanto ao número de células com MN e total de MN, por 2000 células por indivíduo entre as regiões orais A, B e C de 30 pacientes.

Paciente	CMN			TMN		
(n°)	(A-B)	(A-C)	(B-C)	(A-B)	(A-C)	(B-C)
1	-1	2	3	-4	2	6
2	-2	2	4	-3	2	5
3	0	1	1	-1	1	2
4	0	2	2	0	2	2
5	-1	0	1	-1	0	1
6	0	1	1	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	-3	-3	-2	-3	-1
9	3	3	0	3	3	0
10	-1	2	3	-1	2	3
11	0	0	0	0	0	0
12	-5	-1	4	-5	-1	4
13	-2	0	2	-2	0	2
14	-4	-3	1	-6	-3	3
15	-1	0	1	-2	0	2
16	1	1	0	1	1	0
17	3	2	-1	3	2	-1
18	1	1	0	1	1	0
19	-2	1	3	-3	1	4
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	-1	0	1	-1	0	1
23	0	0	0	0	0	0
24	0	-2	-2	0	-4	-4
25	-2	0	2	-2	0	2
26	1	1	0	1	1	0
27	1	1	0	1	1	0
28	0	0	0	0	0	0
29	-3	0	3	-3	0	3
30	-4	1	5	-5	1	6

A Tabela XI mostra a análise da variância não paramétrica quanto a distribuição das variáveis CMN e TMN por 2000 células por indivíduo das diferenças intra-individuais [(A-B), (A-C) e (B-C)] entre as regiões orais dos 30 pacientes através do teste de *Kruskal-Wallis* e a comparação entre as regiões através do teste de *Dunn*.

Tabela XI - Análise da variância não paramétrica *(Kruskal-Wallis)* quanto ao número de células com MN e total de MN por 2000 células por indivíduo das diferenças intra-individuais [(A-B), (A-C) e (B-C)] entre as regiões orais de 30 pacientes, através do teste de comparação múltipla de *Dunn.*

Regiões	**CMN (m ± ep)**	**TMN (m ± ep)**
(A-B)	-0,633 ± 0,334	-1,033 ± 0,400
(A-C)	0,400 ± 0,252	0,333 ± 0,281
(B-C)	1,033 ± 0,327	1,366 ± 0,402
Significância	H (χ^2) = 13,03 P = 0,0015	H (χ^2) = 16,50 P = 0,0003

Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*

Comparação	**Variável**	**P**
(A-B) x (A-C)	CMN	<0,05
	TMN	<0,05
(A-B) x (B-C)	CMN	<0,01
	TMN	<0,001
(A-C) x (B-C)	CMN	>0,05
	TMN	>0,05

Comparadas através do teste de *Kruskal-Wallis*, a heterogeneidade das diferenças entre as regiões orais dos pacientes revelou-se acentuadamente significante tanto para CMN (P=0,0015) como para TMN (P=0,0003), reforçando a significância das comparações nas três regiões orais dos pacientes em relação à primeira análise. O teste de *Dunn* mostrou, ainda, resultados altamente significantes na comparação (A-B) x (B-C) quanto a TMN (P<0,001) mas não foi significante na comparação (A-C) x (B-C) tanto para TMN quanto para CMN (P>0,05).

A heterogeneidade da frequência de CMN e TMN nas três regiões orais (D, E e F) também foi efetuada na amostra dos 30 controles através do teste de *Kruskal-Wallis* (Tab XII). Os resultados não revelaram diferenças significantes tanto para a frequência de CMN quanto para a de TMN, cujos valores foram idênticos (P=0,94). Consequentemente, a homogenidade dessas variáveis nas três regiões orais impede a aplicação do teste de *Dunn* nesse grupo. Ainda, a análise das diferenças intra-individuais entre as regiões orais foi estatisticamente prejudicada.

Tabela XII - Análise da variância não paramétrica (*Kruskal-Wallis)* do número de células com MN e do total de MN por 2000 células por indivíduo entre as regiões orais D, E e F de 30 controles.

Regiões	**CMN (m ± ep)**	**TMN (m ± ep)**
D	0,266 ± 0,095	0,266 ± 0,095
E	0,266 ± 0,095	0,266 ± 0,095
F	0,233 ± 0,504	0,233 ± 0,504
Significância	H (χ^2) = 0,12 P = 0,9428	H (χ^2) = 0,12 P = 0,9428

Obs: Sendo as diferenças entre D, E e F não significantes (P>0,05), o teste de *Dunn* não pôde ser aplicado aos dados.

4.2.2 - Variáveis dependentes: BI, CR, CL, BE

A ocorrência aleatória das anomalias metanucleares não tem sido submetida a estudo sistemático incluíndo uma análise estatística padronizada, mas sua simples observação revela-se bastante informativa sobre o processo de degeneração e morte celular.

Na comparação entre as três regiões orais dos 30 pacientes, BI, CR e CL apresentaram frequências semelhantes nas regiões A e C e tiveram menor incidência na região B. Quanto a BE observou-se a menor frequência na região B e uma incidência duas vezes maior na região C (Tab VII).

Em relação aos 30 controles, nos quais a distribuição dos valores também foi aparentemente caótica, BI e CL revelaram as menores médias na região E, sendo que nas outras regiões, a média de ambas variáveis foi semelhante ou igual. Comparada às outras regiões, a média da variável CR apresentou redução de aproximadamente três vezes na região F, enquanto a de BE foi menor na região E e mais frequente na região F (Tab VII).

4.3 - Comparações inter-individuais (Pacientes *vs.* controles)

A comparação entre as frequencias de todas as variáveis dependentes (CMN, TMN, BI, CL, CR e CL) nas três regiões orais dos 30 sujeitos com as respectivas regiões dos 30 controles foi realizada através do teste de Mann-Whitney conforme pode ser observada na Tabela XIII.

Enquanto as comparações das frequências de CMN e TMN na região C dos pacientes com a sua região correspondente dos controles (F) não foram estatisticamente significante, aquelas entre a região tumoral (B) e a região lateral correspondente dos controles (E) foi acentuadamente significante ($P<0,001$). Mesmo a comparação entre a região contra-lateral ao tumor (A) com a correspondente região dos controles (D) atingiu nível de significância ($P<0,05$), refletindo estágio intermediário de mutagenicidade (direção: $C \rightarrow A \rightarrow B$), tanto nos confrontos de CMN como nos cotejos de TMN cujas probabilidades foram praticamente iguais (Tab XIII).

O aumento nas frequências de CMN e TMN na região tumoral foi de 5,9 e 7,4 vezes respectivamente em relação à região E dos controles. Na região contra-lateral ao tumor, para ambas variáveis, o aumento foi de 3,5 vezes. Aumento de aproximadamente 2,5 vezes (não significante) observa-se na região fundo de saco gengivo-labial superior dos pacientes em relação aos controles.

Com relação às anomalias metanucleares, suas frequências médias nas três regiões orais (A, B e C) dos pacientes em comparação com suas respectivas regiões controles (D, E e F) foram estatisticamente significantes com exceção daquelas relativas à BE cujas diferenças sistematicamente não atingiram a significância estatística (Tab XIII). Também mostrou-se exceção (não siginificante) a comparação C - F da anomalia CR.

Tabela XIII - Comparação (Mann-Whitney) da frequência de células com MN, total de MN e de anomalias metanucleares (BI, CR, CL, BE) por 2000 células por indivíduo, nas regiões orais A, B e C de 30 pacientes e nas regiões orais D, E e F de 30 controles.

Variáveis	Pacientes			Controles			Diferença			Probabilidade		
	A	B	C	D	E	F	A-D	B-E	C-F	A-D	B-E	C-F
CMN	0,933	1,567	0,533	0,266	0,267	0,233	0,667	1,300	0,300	0,0297	0,0006	0,4454
TMN	0,933	1,967	0,600	0,266	0,267	0,233	0,667	1,700	0,367	0,0297	0,0004	0,4409
BI	11,467	9,933	11,033	3,100	2,533	3,233	8,366	7,400	7,800	<0,0001	<0,0001	0,0055
CR	2,233	1,767	2,567	5,267	6,033	1,833	- 3,033	- 4,267	0,733	0,0001	<0,0001	0,1985
CL	18,633	17,900	20,567	4,200	1,367	4,200	14,433	16,534	16,366	0,0009	<0,0001	<0,0001
BE	0,267	0,200	2,500	0,433	0,333	1,333	- 0,167	- 0,133	1,167	0,9694	0,7170	0,7671

Esses resultados revelam que ocorre aumento altamente significante nas frequências de BI, CR e CL nas três regiões orais dos pacientes em comparação com as suas correspondentes regiões nos controles, sem indicação todavia, de sentido sistemático dessas frequências nessas regiões, isto é aparentemente aleatório.

Merece ser destacado que, embora as diferenças das frequências médias de BE nas três regiões orais dos pacientes em comparação com a dos controles não tenham sido estatisticamente significante (Tab XIII), suas proporções nas regiões C, dos pacientes e F dos controles, em comparação intra-individuais com as demais regiões orais (A e B) são até 12 vezes superior nos pacientes e somente cerca de quatro vezes mais frequente nos controles (D e E).

4.4. Efeitos da idade

A Tabela XIV apresenta a análise de regressão das variáveis dependentes por 2000 células por indivíduo sobre a idade de 30 pacientes.

Embora nenhum coeficiente de regressão das variáveis dependentes principais (CMN e TMN) ou secundárias (BI, CL, CR, BE) sobre a idade tenha sido estatisticamente significante, ocorreu tendência sistemática para quase a totalidade das variáveis dependentes apresentar coeficiente de correlação negativos com a idade, ao contrário do esperado, isto é, aumento da mutagenicidade com a idade. A tentativa de normalização das variáveis CMN e TMN através da transformação pela fórmula $\sqrt{y+0,5}x1000$ produziu resultados semelhantes.

A análise de regressão das variáveis dependentes com a idade com base na amostra de 30 controles (Tab XV) também não mostrou resultados estatisticamente significantes. Revelaram a mesma tendência sistemática de correlação negativas para quase todas as variáveis. A transformação da raiz quadrada dessas variáveis indicaram dois resultados com significância estatística (P = 0,05) que também seriam esperados aleatoriamente para 5 % das estimativas.

Tabela XIV – Análise de regressão da frequência de células com MN, total de MN, e de anomalias metanucleares (BI, CR, CL, BE) por 2000 células por indivíduo, sobre a idade de 30 pacientes.

Variáveis	Região oral	m ± dp	r	b ± sb	t *	P
CMN	A	0,933 ± 1,143	0,053	0,007 ± 0,024	0,283	0,780
	B	1,567 ± 1,612	- 0,206	- 0,037 ± 0,033	1,116	0,274
	C	0,533 ± 1,106	- 0,284	- 0,035 ± 0,022	1,566	0,128
TMN	A	0,933 ± 1,143	0,053	0,007± 0,024	0,283	0,780
	B	1,967 ± 2,125	- 0,176	- 0,042 ± 0,044	0,947	0,352
	C	0,600 ± 1,248	- 0,245	- 0,034 ± 0,026	1,335	0,193
BI	A	11,467 ± 8,780	- 0,056	- 0,055 ± 0,185	0,299	0,767
	B	9,933 ± 8,288	- 0,272	- 0,252 ± 0,168	1,497	0,145
	C	11,033 ± 16,353	- 0,011	- 0,021 ± 0,346	0,060	0,953
CR	A	2,233 ± 5,348	0,237	0,142 ± 0,110	1,291	0,207
	B	1,767 ± 3,461	0,067	0,026 ± 0,073	0,356	0,724
	C	2,567 ± 7,016	0,191	0,149 ± 0,146	1,027	0,313
CL	A	18,633 ± 21,313	- 0,241	- 0,575 ± 0,437	1,315	0,199
	B	17,900 ± 18,652	- 0,076	- 0,158 ± 0,393	0,403	0,690
	C	20,567 ± 21,510	- 0,105	- 0,254 ± 0,452	0,561	0,579
BE	A	0,267 ± 0,640	- 0,170	- 0,012 ± 0,013	0,913	0,369
	B	0,200 ± 0,407	- 0,136	- 0,006 ± 0,008	0,792	0,472
	C	2,500 ± 9,228	- 0,166	- 0,171 ± 0,192	0,891	0,380

* grau de liberdade: 28

Tabela XV – Análise de regressão da frequência de células com MN, total de MN, e de anomalias metanucleares (BI, CR, CL, BE) por 2000 células por indivíduo, sobre a idade de 30 controles.

Variáveis	Região oral	m ± dp	r	b ± sb	t *	P
CMN	D	0,267 ± 0,521	0,212	0,013 ± 0,011	1,146	0,261
	E	0,267 ± 0,521	- 0,046	- 0,003 ± 0,012	0,246	0,808
	F	0,233 ± 0,504	- 0,271	- 0,016 ± 0,011	1,491	0,147
TMN	D	0,267 ± 0,521	0,212	0,013 ± 0,011	1,146	0,261
	E	0,267 ± 0,521	- 0,046	- 0,003 ± 0,012	0,246	0,808
	F	0,233 ± 0,504	- 0,271	- 0,016 ± 0,011	1,491	0,147
BI	D	3,100 ± 1,807	- 0,248	- 0,053 ± 0,039	1,355	0,186
	E	2,533 ± 2,403	0,131	0,037 ± 0,053	0,698	0,491
	F	3,233 ± 2,609	0,097	0,030 ± 0,058	0,518	0,608
CR	D	5,267 ± 5,119	- 0,029	- 0,017 ± 0,114	0,151	0,881
	E	6,033 ± 5,690	- 0,178	- 0,119 ± 0,125	0,956	0,347
	F	1,833 ± 3,281	- 0,346	- 0,134 ± 0,069	1,955	0,061 **
CL	D	4,200 ± 7,303	- 0,321	- 0,277 ± 0,154	1,792	0,084
	E	1,367 ± 1,866	- 0,288	- 0,063 ± 0,040	1,592	0,122
	F	4,200 ± 8,160	- 0,355	- 0,343 ± 0,170	2,012	0,054 **
BE	D	0,433 ± 1,331	0,307	0,048 ± 0,028	1,705	0,099
	E	0,333 ± 1,155	0,280	0,038 ± 0,025	1,542	0,134
	F	1,333 ± 5,121	0,272	0,165 ± 0,110	1,497	0,145

* grau de liberdade: 28 ** significante com TRQ (ver texto)

5 - DISCUSSÃO

A análise das células de cada região oral dos 30 pacientes revelou resultados de acordo com a expectativa teórica: a frequência de micronúcleos como marcadora de alterações cromossômicas é condizente com o processo neoplásico. As anomalias metanucleares também apresentaram resultados estatisticamente significantes e revelaram uma relação importante com as alterações do epitélio escamoso diante do álcool, principal agente mutagênico ao qual os pacientes foram expostos. A presente discussão aprecia criticamente a significação das diferenças intra e inter-individuais na frequência de células com MN e anomalias metanucleares com o processo carcinogênico bem como os problemas metodológicos associados à análise citogenética e estatística na obtenção dos presentes resultados.

5.1 - Diferenças entre pacientes e controles

5.1.1 - Diferenças significantes das frequências médias de MN entre pacientes e controles

Apesar das frequências médias de MN serem inferiores a 1/1000 tanto nos pacientes como nos controles (Tab.VI), as comparações intra-individuais realizadas entre as três regiões orais dos pacientes mostraram diferenças extremamente significantes. O aumento foi de três vezes na região ao redor da lesão tumoral (B) e de duas vezes na região contra-lateral (A), quando comparadas à região fundo de saco gengivo-labial (C).

Nos controles, entretanto, as frequências intra-individuais de MN nas regiões D e E foram idênticas e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas à região fundo de saco gengivo-labial superior (F)

Os resultados das comparações inter-individuais entre pacientes e controles, através do teste de *Mann-Whitney,* indicaram um aumento acentuadamente significante de sete vezes na frequência de MN ao redor da lesão (P=0.0004), um aumento significante de três vezes na região contra-lateral ao tumor (P=0.0297) e de duas vezes, mas não significante, na região gengivo-labial superior (P=0.4409) dos pacientes, quando comparadas com as regiões equivalentes do grupo controle (Tab XIII).

Assim, a análise estatística permite postular que os pacientes apresentam um gradiente no desenvolvimento do processo carcinogênico que segue a direção C $\rightarrow$ A $\rightarrow$ B, no qual C seria uma região relativamente não exposta e portanto mais resistente aos agentes mutagênicos, enquanto a região A, tão exposta quanto a região B mas não tumorizada, representaria um estágio intermediário, e a região B seria a mais instável com os menores limiares de sensibilidade biológica para agentes mutagênicos, especificamente o álcool. Durante esse processo, o

desencadeamento da carcinogênese estaria relacionado a um prévio aumento nas frequências de MN.

Essa conclusão torna-se ainda mais evidente pela comparação das frequências de MN nas regiões D e E dos controles. Essas frequências, acentuadamente inferiores às dos pacientes mas similares nas três regiões orais dos controles, sugerem que esse seja o padrão espontâneo de normalidade que ocorre somente na ausência de agentes mutagênicos, isto é, o álcool na presente investigação. Ainda, a ausência de significância estatística das diferenças entre as frequências de MN nas regiões C dos pacientes e F dos controles sugere que a região fundo de saco gengivo-labial superior seja uma região resistente aos agentes mutagênicos em qualquer indivíduo, podendo ser considerada controle somente nas comparações intra-individuais.

5.1.2 - Comparação com outras investigações de alcoólicos e/ou de indivíduos com neoplasias

As investigações da frequência de MN levaram alguns autores a afirmar que a presença do micronúcleo poderia revelar eventos iniciais da carcinogênese (Stich e col., 1982a, b; Stich & Rosin, 1984; Stich e col., 1984, 1988; Dave e col., 1992; Benner e col., 1994a; Ghose & Parida, 1995; Desai e col., 1996) até mesmo porque eles estão ausentes ou ocorrem raramente na mucosa oral normal (Lippman e col., 1990). Consequentemente, a pesquisa de micronúcleos, atualmente conhecida como "teste do micronúcleo", vem sendo realizada em populações expostas a inúmeros agentes mutagênicos quanto ao risco para o desenvolvimento de neoplasias em epitélios esfoliativos, principalmente os orais (Garewal e col., 1993; Stich e Rosin, 1984; Desai e col., 1996).

Na presente investigação, a região com lesão cancerígena apresentou a maior incidência de micronúcleos e as menores frequências das anomalias metanucleares quando comparadas às outras regiões orais dos próprios pacientes e dos seus respectivos controles. Investigação semelhante foi realizada por Tolbert e col. (1991) em regiões orais de usuários de rapé. Esses autores verificaram que o local original da boca exposta ao tabaco teve uma frequência maior de células micronucleadas que o local de exposição secundária (contra-lateral) do próprio indivíduo. Nesse mesmo trabalho, as médias dos micronúcleos e das anomalias metanucleares no grupo controle foram, ainda, inferiores às da região menos exposta dos usuários de rapé, com exceção apenas da cariólise.

Semelhantemente aos resultados da presente pesquisa, Benner e col. (1994a) também verificaram que as células da região de lesão tumoral apresentaram aumento na frequência de MN quando comparadas às de outra região não tumorizada da boca de pacientes com alterações orais pré-malígnas.

Visando avaliar o efeito do tabaco na carcinogênese, Stich e col. (1982a,b) observaram também aumento de aproximadamente 15 vezes na frequência de MN na mucosa oral de usuários crônicos de noz de betel e de tabaco tipo *Kaini*, evidenciando que ambos têm a mesma capacidade clastogênica que o álcool.

Stich & Rosin (1983a) verificaram, ainda, um aumento na frequência de MN em fumantes e usuários de álcool. Enquanto cada um desses fatores isoladamente não aumentou significantemente a frequência de MN, a ação simultânea de ambos elevaram cerca de seis vezes sua incidência. No presente trabalho a região da lesão cancerígena também revelou um aumento de aproximadamente seis vezes na frequência de MN em comparação com a respectiva região dos controles, confirmando o efeito sinergístico dessas duas drogas.

5.1.3 - Diferenças das frequências das anomalias metanucleares entre pacientes e controles

aumento na incidência das anomalias metanucleares, com exceção de BE, nos pacientes em relação aos controles, resultou provavelmente da exposição à agentes mutagênicos, preponderantemente do álcool e também do tabaco. O grupo dos controles, amostra não exposta, representou padrão de normalidade quanto à frequência dessas anomalias. O esquema abaixo revela a ordem de frequência relativa das anomalias metanucleares, bem como de MN, na presença (pacientes) e na ausência (controles) de exposição mutagênica, reveladas na presente investigação:

MN foi a alteração nuclear de menor incidência seguida pela anomalia BE, entretanto,

Grupo	Região	Ordem de frequência
Pacientes	A	BE > MN > CR > BI > CL
	B	BE > MN > CR > BI > CL
	C	MN > BE > CR > BI > CL
Controles	D	MN > BE > BI > CL > CR
	E	MN > BE > CL > BI > CR
	F	MN > BE > CR > BI > CL

nas regiões mais expostas dos pacientes (A e B) MN foi mais frequente que BE. Enquanto nos pacientes CL foi mais frequente que BI e CR nas três regiões orais, observou-se um padrão de distribuição mais aleatório nas três regiões dos controles revelando, de um modo geral, maior incidência da anomalia CR em relação às BI e CL[54].

A comparação das frequências das anomalias metanucleares de pacientes e controles revelou que, entre as regiões B-E, as diferenças quanto às anomalias BI, CR e CL foram extremamente significantes, sugerindo associação entre a formação dessas anomalias e o processo

[54] Durante a análise microscópica observou-se ainda, outras alterações celulares desconhecidas com frequências tão ínfimas que não justificaram suas análises na presente investigação. As fotos dessas anomalias todavia, encontram-se à disposição no Laboratório de Citogenética do Instituto de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da FMUSP.

carcinogênico. Entre as regiões A-D, as médias de BI e CR também foram significantemente diferentes enquanto a diferença entre as médias de CL foi acentuadamente significante, novamente sugerindo que essas anomalias estejam envolvidas com o processo mutagênico uma vez que a região A é tão exposta quanto a B. Entretanto, a análise comparativa das regiões C-F mostra diferenças altamente significantes entre as médias de BI e extremamente significantes quanto às de CL, revelando em epitélios não expostos, que ambas são inerentes ao processo degenerativo da mucosa oral. As médias da variável CR nessa região, bem como as de BE nas três regiões, não exibiram diferenças significantes sugerindo independência do processo carcinogênico (Tab XIII).

As anomalias mais frequentes nos controles (CR) e nos pacientes (CL) estão relacionadas à morte celular (Wyllie, 1981); CR foi também associada tanto à citotoxidade (necrose e queratinização) quanto à genotoxidade (apoptose), enquanto CL parece envolvida somente com a citotoxidade. Consequentemente, o excesso de CR nos controles poderia representar a fase final do processo apoptótico, enquanto o excesso de CL, nos pacientes, indicaria que a resposta citotóxica esteja ocorrendo, com ou sem apoptose, como sugeriu Tolbert e col. (1991).

O epitélio da mucosa oral sofre constantes injúrias durante o processo de alimentação dos indivíduos, o que contribui consequentemente, na incidência das anomalias relacionadas à degeneração celular. Isto explicaria, também, resultados aparentemente contraditórios na literatura, tais como frequências de CR e CL superiores a 21% em indivíduos abstêmios (Titenko-Holland e col.,1994) e aumento na frequência de CR em usuários de rapé (Tolbert e col., 1991). Por outro lado, CL assim como CR foram consideradas por Nakano e Oka (1991), células cancerosas necróticas não viáveis e que, portanto, devem ser eliminadas do epitélio.

Nas comparações intra regionais orais dos controles (Tab VII), CR e CL foram as anomalias mais frequentes, apesar de Titenko-Holland e col. (1994) terem relatado uma variabilidade inter-individual de anomalias metanucleares estatisticamente significante em indivíduos não

expostos. Consequentemente, pode-se afirmar que ambas CR e CL são realmente de ocorrência intrínseca ao epitélio e que, provavelmente, a ação constante de agentes mutagênicos como álcool e, secundariamente tabaco, pode aumentar o índice de morte celular visualizado através do aumento estatisticamente significante dessas anomalias nos pacientes.

Ao invés do aumento na frequência de CL nas três regiões orais dos pacientes observado na presente investigação, Tolbert e col. (1991) observaram frequência 13 vezes maior dessa anomalia somente na região exposta da boca de usuários de rapé, em comparação com a região contra-lateral dos mesmos. Assim, parece mais provável que o álcool e o tabaco atuem em toda a cavidade oral de forma homogênea, e que cada região oral reaja a esses agentes de acordo com seu limiar próprio para a carcinogênese.

A frequência de células em degeneração é fortemente influenciada por processos inflamatórios na mucosa, pelos processos de reparo celular e pela força de raspagem na confecção de esfregaços (Sarto e col., 1987). Além disso, as células anucleadas podem se originar de lesão leucoplásica nem sempre visível a olho nu, de modo que muitos usuários de rapé, sem uma leucoplasia visível mas com alta incidência de células anucleadas, tenham realmente uma lesão incipiente oculta (Roberts, 1997).

Nos pacientes, sob ação constante do fumo e principalmente do álcool, aumenta a velocidade da multiplicação celular nas camadas basais para a reposição de células na mucosa oral e, consequentemente, a probabilidade de ocorrência de erros mitóticos. Assim, o aumento na frequência de BI nos pacientes, em relação aos controles, poderia originar-se desse processo, nos quais os núcleos se dividem perfeitamente, sem entretanto, completar a cariocinese.

As células BI foram observadas em grande quantidade nos epitélios de escamação que possuem grande demanda por multiplicação celular em virtude da ação constante de agentes mutagênicos (pacientes). Na ausência desses agentes (controles), a velocidade da divisão celu-

lar segue um ritmo normal, de modo que a frequência dessa anomalia é, de um modo geral, inferior à de CR e CL. Como Tolbert e col. (1991) não observaram aumento na frequência de BI em usuários de rapé, é possível que esta anomalia esteja relacionada somente ao efeito do álcool, e não do tabaco, ou ao consumo concomitante de ambos.

A anomalia metanuclear BE é a única que não revelou diferença significante em todas as comparações inter-individuais. Nas regiões A e B dos pacientes, BE apresentou as frequências mais baixas das anomalias metanucleares, inclusive que MN. Frequências baixíssimas de BE também foram observadas por Titenko-Holland e col. (1994) em seus controles. BE apresentou ainda, frequência aleatória, tanto em usuários de rapé como em indivíduos controles, de modo que Roberts (1997) não pôde atribuir a presença dessa anomalia ao uso de rapé. Entretanto, a frequência de BE revelou-se 12 vezes superior na região fundo de saco gengivo-labial superior, em comparação com as outras regiões dos pacientes na presente pesquisa, enquanto nas comparações correspondentes dos controles o aumento foi apenas de cerca de quatro vezes.

Curiosamente, as menores frequências de todas as anomalias metanucleares ocorreram na região B, justamente a que apresenta a lesão cancerígena e as maiores frequências de MN. Torrés-Bugarín e col. (1998) também encontraram uma relação inversa entre os micronúcleos e as anomalias metanucleares, porém, em indivíduos sadios. Esses resultados indicariam também que a frequência de MN aumenta às expensas da diminuição das anomalias metanucleares, com processo comparativamente muito mais intenso sob a ação de agentes mutagênicos.

5.1.4 - Relação entre as frequências de MN e das anomalias metanucleares

Sob constante agressão, as células normais da mucosa oral formadas nas camadas basais, sofrem diferenciação, superpondo-se em camadas no epitélio, com queratinização das camadas mais externas que, posteriormente, são eliminadas. Durante esse processo degenerativo, os núcleos das células podem se transformar, formando figuras atípicas como micronúcleos ou demais anomalias metanucleares.

A análise comparativa das frequências de MN e das anomalias metanucleares nos pacientes e nos controles, em confronto com dados da literatura, permite especular sobre uma relação entre os micronúcleos e as outras anomalias metanucleares quanto aos processos: degenerativo, apoptótico e carcinogênico. Cada um desses processos ocorre de acordo com a intensidade da agressão clastogênica sofrida pelo epitélio conforme as hipóteses abaixo.

a) Agressão fraca: Quando a agressão é fraca, normalmente causada pela alimentação, ocorre o processo mais frequente, isto é, as células normais (CN) originadas nas camadas basais sofrem especialização ao longo do epitélio em um período que dura aproximadamente de três a quatro semanas e são eliminadas na forma de CL. Durante essa diferenciação, as células são submetidas ao programa de morte celular (apoptose) representado por CR, mas também eliminadas como CL porque CR é um estágio anterior à CL no processo de degeneração celular (Snell, 1985). Quando o insulto é leve, o reparo celular é normal, o que resulta, nos controles, em frequência baixa de MN e de anomalias metanucleares. Ainda, durante o período de migração pelas camadas epiteliais, as células podem sofrer lise e desaparecer do epitélio antes de chegar à superfície (Stich & Rosin, 1983a), contribuindo para um aumento no número de CL e subestimação da frequência de MN.

b) Agressão moderada: Na agressão moderada, os agentes clastogênicos (álcool e/ou fumo) que afetam as camadas basais da mucosa oral podem provocar alterações nos núcleos celulares. A especialização das células da mucosa oral exposta a um desses dois agentes ocorre de forma a preservá-las no epitélio enquanto forem viáveis, apesar de anormais, para posteriormente serem eliminadas. BE representa a primeira alteração nuclear, provavelmente como uma resposta adaptativa à ação do agente clastogênico. Intensificando-se essa ação, o "fio *Feulgen*-positivo" de BE provavelmente rompe-se e origina um MN. Os "brotos nucleares" (Bhattathiri e col., 1998), também observados na presente análise (Fig 7a,b), confirmam esta hipótese. Marco (1996, comunicação oral) acredita que MN possa ser uma das fases do processo de apoptose uma vez que são estruturas nas quais o material genético torna-se comprometido. No estágio seguinte, inicia-se o processo apoptótico e a degeneração celular representados pelas anomalias CR e CL, apesar de Stich e col. (1982a,b) questionarem a intensidade do efeito clastogênico do tabaco *Kaini* ou das nozes de betel necessário para causar aumento na frequência de CR e CL. Livingston e col. (1990) acreditam que MN também pode ser formado pela ação cariolítica do tabaco nas células das camadas superficial e intermediária, sem exercer os efeitos clastogênicos nos cromossomos das células mitóticas da camada basal, o que provoca a queratinização do epitélio oral. Os dados de Lippman e col. (1990), assim como os de Garewal e col. (1993) e Roberts, (1997), também sugerem que o tabaco não atinja as células matriciais. Paralelamente a esses processos, pode ocorrer ainda, um aumento na demanda por células para reposição tecidual, o que causaria um aumento na frequência da anomalia BI.

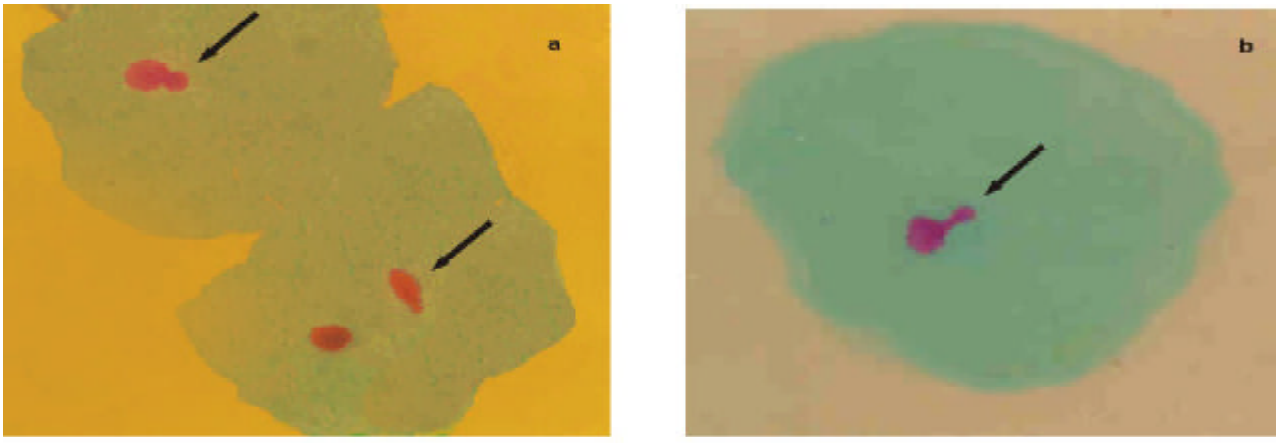
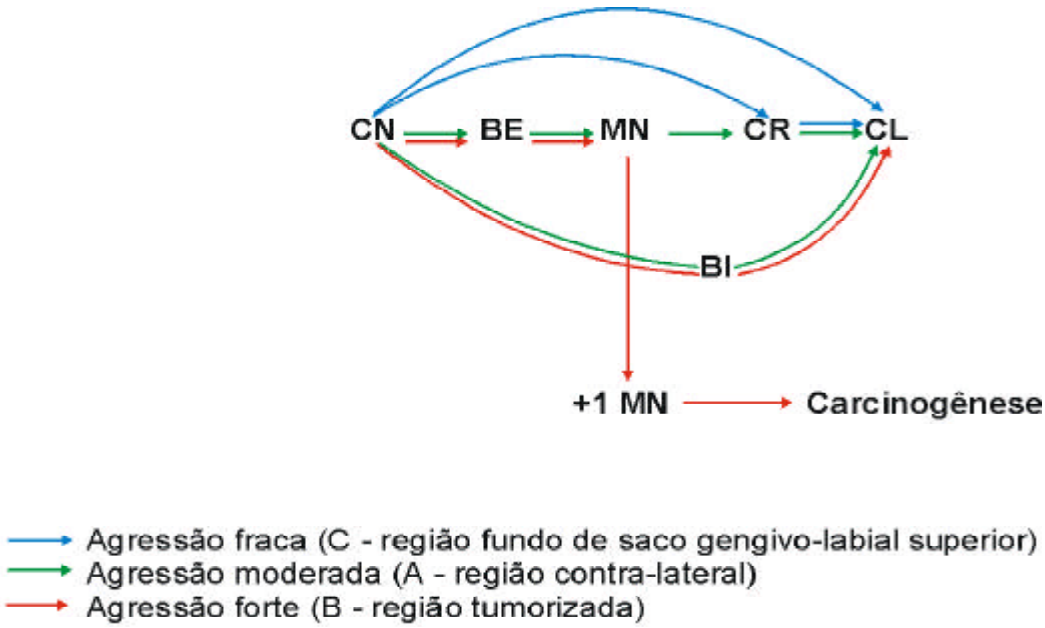


Figura 7 - Células de escamação da mucosa oral de pacientes e controles da presente investigação revelando em a) e b) "brotos nucleares".

c) Agressão forte: A agressão forte causada pelo efeito sinergístico do álcool e do tabaco atingiria o núcleo das células da camada basal de maneira tão intensa que essas células perderiam imediatamente o controle apoptótico. A exemplo do esquema anterior, CN transforma-se em BE e esta, por sua vez, em MN; porém a ação constante do agente mutagênico leva à formação de mais de um MN por célula. Segundo Stich e col. (1982a) quando indivíduos são fortemente expostos durante muitos anos, células com cromossomos anormais são continuamente formadas e esfoliadas na mucosa oral. Pode-se especular que seja necessário um período prolongado de ocorrência de aberrações cromossômicas para produzir uma mudança cariotípica envolvida na transformação neoplásica. Se as quebras cromatídicas, translocações e deleções ocorrem aleatoriamente, então o surgimento de cariótipos com mutações potencialmente carcinogênicas pode precisar de um longo período para sua preservação seletiva. Além disso, a célula precisa permanecer dividindo-se e formando clones, antes de ser excluída da mucosa. Em ambos processos, a produção de alterações cromossômicas específicas bem como sua sobrevivência no tecido, precisam ocorrer antes que a célula potencialmente neoplásica origine linhagens tumorais malignas. Apesar das células com MN serem eliminadas do tecido, as células basais que as originaram são aquelas que podem perder o controle celular e desencadear o processo de carcinogênese.

Entretanto deve ser mencionado que, embora a frequência de MN indique a exposição de tecidos à agentes carcinogênicos antes de qualquer evidência clínica, um aumento na frequência de MN não indica necessariamente a formação de uma lesão pré-neoplásica. O aumento na frequência de MN revela a ação de agentes genotóxicos, devendo indicar um aumento na probabilidade da ocorrência de uma alteração cromossômica específica (genômica), que desencadeie a expressão de um oncogene relacionado com a transformação neoplásica (Stich & Rosin, 1984). Consequentemente, das anomalias metanucleares, o MN é a alteração nuclear mais intimamente relacionada com a carcinogênese (Roberts, 1997). Na agressão forte também pode ocorrer um aumento de BI devido à necessidade de reposição tecidual rápida.

Os três tipos de agressão responsáveis pela degeneração cario-celular podem ser representados de acordo com o esquema abaixo com base nas frequências relativas de MN e das outras anomalias metanucleares (BI, CR, CL e BE) observadas nos pacientes e controles.



A região C é anatomicamente mais protegida da ação dos agentes clastogênicos e portanto, uma região de baixíssima incidência de tumores. Pode-se postular ainda, que essa região tenha um mecanismo de reparo normal como o apresentado no modelo de agressão fraca, o qual ocorreria por simples eliminação das células danificadas (CL) ou, ainda, através de um mecanismo de proteção relacionado à apoptose (CR), também de eliminação celular, altamente eficiente. Isto confere a essa região um limiar de resistência à carcinogênese maior do que o observado nas outras regiões.

A região A, tão exposta quanto a B, parece apresentar um limiar para a carcinogênese intermediário entre as regiões B e C. Essa região segue o modelo de exposição moderada na qual as células sofrem transformações nucleares devido à ação do tabaco e principalmente do álcool, sem entretanto, perder a programação tanatogênica nas camadas basais com a característica esfoliativa intrínseca do epitélio, com subsequente aumento no índice mitótico.

Já a região ao redor da lesão tumoral (região B) apresenta o menor limiar para a carcinogênese. Nessa região ocorre um mecanismo semelhante ao da agressão forte, no qual o álcool, e semelhantemente o tabaco, atinge as células da camada basal provocando predominantemente um aumento no número de MN, levando à perda de apoptose e irrompimento da carcinogênese evidenciado pelo início da lesão cancerígena.

Ainda mais, o gradiente encontrado na frequência de MN nas três regiões orais dos pacientes deve estar relacionado aos limiares de resposta das células em cada região aos agentes mutagênicos uma vez que a geração de MN pode refletir uma produção constante de vários tipos de alterações genômicas que podem estar envolvidas na gênese do câncer oral (Livingston e col., 1990).

5.2 - Fatores intervenientes sinergísticos

Na presente investigação, a idade média dos pacientes (52,9 anos) diferiu significantemente daquela dos controles (38,4 anos). A diferença média de 14,5 anos (Tab. I) poderia ter algum efeito no incremento da frequência de MN, uma vez que tem sido relatado que, não somente a incidência de aberrações cromossômicas estrututrais aumenta discreta mas significantemente com a idade (Gattás & Saldanha, 1997), como também a ocorrência de câncer seja um processo dependente do tempo de vida. Assim, torna-se necessário indagar em que medida as diferenças nas frequências de MN entre pacientes e controles, e, consequentemente, a carcinogênese decorre da sobrevida dos primeiros em relação aos últimos.

Admitindo-se a existência do efeito etário, seria de se esperar, assim como ocorreu nos trabalhos de Kayal e col. (1993) e Ghose & Parida (1995), uma regressão positiva significante da frequência de MN sobre a idade, tanto estimada a partir dos controles como principalmente calculada a partir da amostra dos pacientes; neste grupo, mais acentuadamente na região tumorizada (B). Contrárias às expectativas, as estimativas de regressão nos pacientes e controles (Tabs XV e XIV) indicaram coeficientes de regressão estatisticamente não significantes mesmo após a tentativa de normalização da variável dependente, porém indicando predominantemente coeficientes de correlação também inesperadamente negativos entre a idade e a frequência de CMN ou TMN bem como de algumas anomalias metanucleares. Todavia, regressões significantes ao nível de 5% foram obtidas com relação à CR e CL, ambas na região fundo de saco gengivo-labial superior dos controles, após transformação da raiz quadrada. Mesmo a significância estatística desses resultados pode ser posta em dúvida uma vez que espera-se encontrar um, de cada 20 resultados, significante aleatoriamente com base no nível de significância estabelecido previamente.

Deve ser lembrado porém, que a concentração significante de MN na região tumorizada, e não aleatoriamente nas três regiões dos pacientes, indica uma influência secundária da idade sobre os resultados.

Através de informações anamnésticas e registros hospitalares (Apêndices I e II) foi possível obter dados que representam direta ou indiretamente fatores intervenientes na frequência de MN. A maioria dessas variáveis independentes exibe uma distribuição não paramétrica e algumas delas, tais como consanguinidade dos pais bem como a cor da pele e os grupos sanguíneos dos pacientes, não possuem *a priori* causa teórica de efetivamente estar associada à variabilidade da frequência de MN, enquanto outras poderiam ter diretamente algum efeito sobre a sua frequência.

5.2.1 – Variáveis não paramétricas

A tabela XVI mostra as probabilidades na comparação da frequência total de MN por 2000 células por indivíduo na amostra dos pacientes com relação às variáveis independentes não paramétricas, estimadas não somente através do c^2 de contingência (teste exato de *Fisher*) com base no número de indivíduos com ou sem MN, como também pelo teste de *Mann-Whitney*, nas comparações bi-amostrais e o teste de *Kruskal-Wallis* nas comparações multi-amostrais, com base na distribuição de MN por indivíduo. Com exceção de um item do questionário *CAGE (Cut down, Annoyed, Guilty and Eye-opener)* todos resultados foram não significantes, isto é aleatórios, considerando-se o relativamente baixo tamanho amostral (30) em comparação com o provavelmente elevado número de indivíduos necessário para revelar eventuais pequenas diferenças.

A não significância dos resultados seria esperada para a maioria das comparações por razões teóricas ou metodológicas. Com relação à frequência de MN, a cor da pele, grupos sanguíneos ou mesmo consanguinidade dos pais são fatores teoricamente aleatórios quanto à ocorrência de MN, o que foi confirmado pelas estimativas de probabilidade. Todavia, fatores intervenientes tais como uso de tabaco, hospitalização psiquiátrica pelo álcool, região de localização oral e recorrência familial de neoplasias e, principalmente, o consumo do álcool, devem estar teoricamente associadas direta ou indiretamente à frequência de MN nos pacientes.

Entretanto, as estimativas de probabilidade na tabela XVI mostraram que somente um dos itens (intenção de diminuir ou parar de beber) do *CAGE*, amplamente utilizado no diagnóstico do alcoolismo, foi suficientemente sensível estatisticamente para estabelecer diferenças na frequência de MN entre os próprios pacientes, revelando, indiretamente, o efeito do álcool.

Tabela XVI - Probabilidades na comparação da frequência total de MN por 2000 células por indivíduo com relação a fatores intervenientes não-paramétricos, estimadas através do teste exato de Fisher (χ^2) e do teste de Mann-whitney (U).

Variável independente (comparação)	(c^2)	(U)
Cor da pele (brancos vs não branco)	0,43	0,25
Consanguinidade dos pais (ausente vs presente)	1,00	____ [c]
Grupo sanguíneo ABO (sem antígeno vs com antígeno)	0,30	0,76
Tipo sanguíneo Rh (sem antígeno vs com antígeno)	1,00	____ [c]
Frequência – fumo [0, 1, 2 e 3 (+) vs 4(+)] [a]	0,40	0,53
Hospitalização psiquiátrica (presente vs ausente)	1,00	0,50
Região da neoplasia (1 – gengiva e retromolar, 2 – língua e soalho de boca, 3 – região tonsilar migdalina, 4 – base de língua)	0,62	0,61 [d]
Recorrência familial da neoplasia (nenhum vs 1, 2, 3 e 4 parentes afetados)	1,00	0,65
Frequência – álcool [1, 2 e 3 (+) vs 4 (+)] [a]	0,21	0,34
CAGE [b] (ausente vs presente)		
I – Diminuir/parar de beber	0,07	0,05 [e]
II – Incômodo com críticas	1,00	0,85
III – Beber pela manhã	0,70	0,66
IV – Culpa por beber	0,70	0,94
V – Total	0,63	____ [c]
Recorrência familial de alcoolismo (nenhum vs 1, 2, 3 e 4 parentes afetados)	0,14	0,38

χ^2 comparação de indivíduos com e sem MN
U comparação da distribuição de indivíduos com 0, 1, 2, 3, ..., MN

a ver apêndice
b pergunta do questionário *CAGE (Cut down, Annoyed, Guilty and Eye-opener)*
c prejudicado porque o desvio padrão de uma das colunas é zero
d teste de *Kruskal-Wallis* (multiamostral)
e significante ao nível de 5%

5.2.2 – Variáveis paramétricas

Já as variáveis independentes paramétricas foram selecionadas em virtude de sua relação *a priori* com a frequência de MN. Para a avaliação de seu efeito interativo sobre, não somente a ocorrência de MN mas também das demais anomalias metanucleares e consequentemente sobre a carcinogênese, utilizou-se a análise de regressão múltipla escalonada (*stepwise*) que seleciona, no cálculo do intercepto multifatorial (a) da equação de regressão, as variáveis estatisticamente significantes.

A tabela XVII apresenta o resultado dessas estimativas efetuadas tanto para a frequência de CMN como também para TMN por indivíduo. Com relação às anomalias metanucleares, a única selecionada como significantemente associada às variáveis independentes foi a cariólise (CL).

Da análise de regressão múltipla, conclui-se que a variável independente mais importante foi o álcool avaliado parametricamente através do início, tempo e fim do seu consumo (*ia*, *ta* e *fa*). A idade (*id*) e o fim do consumo de álcool (*fa*), assim como o tempo de uso do tabaco (*tf*) e o fim do consumo de álcool (*fa*), devem ter ação interativa ou sinergística.

Os coeficientes de regressão são semelhantes nas regiões orais A e B mas não na região C (fundo de saco gengivo-labial superior), quanto às variáveis CMN e TMN. Entretanto, a contagem de TMN parece mais sensível estatisticamente para revelar associações. Por exemplo, a regressão de TMN sobre a idade, normalizada ou não, torna-se não significante quando considerada como CMN.

A normalização das variáveis dependentes CMN e TMN através da raiz quadrada produz resultados mais consistentes, porém na regressão sobre *fa* na região oral A, os resultados tornaram-se não significantes. Entretanto, esta transformação não detectou associação da frequência de MN com fumo (*tf*) na região C, evidenciada pelos dados não transformados (DNT). Por outro lado, somente a normalização identificou a regressão de MN (CMN e TMN) sobre a idade na região C.

Tabela XIX - Análise de regressão múltipla de células com MN, do total de MN e de anomalias metanucleares (CL) por 2000 células por indivíduo, sobre as variáveis independentes (fatores intervenientes) paramétricas estatisticamente significantes de 30 pacientes.

Variável Dependente (Y)	Região Oral	Transformação de Y	m ± dp	Variável independente (X)	b ± s_b	t	P	r^2
CMN	A	DNT	0,778 ± 1,086	fa	- 0,018 ± 0,009	4,297	0,049	0,1467
		TRQ	1046,81 ± 433,83	fa	- 7,112 ± 3,476	4,185	0,051	0,1434
CMN	B	DNT	1,370 ± 1,548	id	- 0,058 ± 0,032	3,187	0,086	0,1131
		TRQ	1260,22 ± 540,23	id	- 20,487 ± 11,283	3,297	0,081	0,1165
CMN	C	DNT	0,556 ± 1,155	tf	- 0,044 ± 0,018	5,811	0,024	0,1949
				fa	- 0,021 ± 0,009	5,646	0,026	0,1905
					a = 2,833 ± 1,011; F = 4,764; P = 0,016			
CMN	C	TRQ	938,85 ± 424,47	id	- 21,701 ± 7,986	7,384	0,012	0,2353
				fa	- 8,269 ± 3,112	7,058	0,014	0,2273
					a = 2331,66 ± 359,98; F = 6,075; P = 0,007			
TMN	A	DNT	0,778 ± 1,086	fa	- 0,018 ± 0,009	4,297	0,043	0,1467
		TRQ	1046,81 ± 433,83	fa	- 7,112 ± 3,477	4,185	0,051	0,1434
TMN	B	DNT	1,667 ± 1,901	id	- 0,081 ± 0,039	4,371	0,047	0,1488
		TRQ	1339,37 ± 621,26	id	- 26,493 ± 12,746	4,320	0,048	0,1474
TMN	C	DNT	0,630 ± 1,305	fa	- 0,029 ± 0,010	8,037	0,009	0,2509
				ta	- 0,041 ± 0,018	4,809	0,038	0,1669
					a = 2,804 ± 1,144; F = 4,934; P = 0,016			
TMN	C	TRQ	958,85 ± 466,53	id	- 21,898 ± 8,858	6,112	0,021	0,2030
				fa	- 9,478 ± 3,452	7,539	0,011	0,2390
					a = 2399,12 ± 399,26; F = 5,749; P = 0,009			
CL	A	DNT	19,814 ± 22,101	ia	- 1,324 ± 0,539	6,029	0,021	0,1943
		TRQ	3742,78 ± 2558,37	ia	- 144,060 ± 63,279	5,183	0,032	0,1717
CL	B	DNT	16,704 ± 18,121	fa	0,263 ± 0,148	3,164	0,087	0,1120
		TRQ	3562,00 ± 2164,76	fa	35,707 ± 17,330	4,245	0,050	0,1452
CL	C	DNT	21,778 ± 22,342	ia	- 1,131 ± 0,563	4,031	0,056	0,1388
		TRQ	4141,22 ± 2306,82	ia	- 125,400 ± 57,458	4,763	0,039	0,1600

Com relação às outras variáveis dependentes, os únicos coeficientes de regressão significantes se referem à anomalia metanuclear CL em todas as regiões orais: na região A, quanto ao início do consumo de álcool (*ia*), na região B, em relação ao fim do consumo de álcool (*fa*) e, na região C, novamente associado à *ia*. A normalização dessa variável aumentou a consistência estatística nas regiões B e C, tornando os resultados estatisticamente significantes.

Mais do que sua consistência estatística, merecem ser discutidos os resultados da análise de regressão que revelaram situações contraditórias. A frequência de MN (CMN ou TMN), normalizada ou não, regrediu negativamente sobre o fim do consumo do álcool (*fa*) na região A e sobre a idade (*id*) na região B; ainda, regrediu significantemente tanto sobre a idade (*id*) como sobre o fim do consumo de álcool (*fa*) na região C, somente após a transformação da raiz quadrada. Também nesta região, somente para a variável CMN, ocorreu a regressão do fim do consumo de álcool (*fa*) e do tempo de uso do tabaco (*tf*). Resultado semelhante foi obtido com relação à variável TMN.

Todos os resultados com coeficientes de regressão sistematicamente negativos são contrários aos esperados teoricamente: a idade (*id*), fim do consumo de álcool (*fa*), tempo de consumo de álcool (*ta*) e tempo de uso de tabaco (*tf*) deveriam produzir aumento na frequência de MN, levando-se em conta as diferenças das frequências de cada variável entre os pacientes e controles. Entretanto, os coeficientes de regressão obtidos com significância estatística com relação à única variável metanuclear (CL) a saber, início do consumo de álcool (*ia*) nas regiões A e C e fim do consumo do álcool (*fa*) na região B, exibiram resultados de acordo com a expectativa teórica. Como os dois coeficientes de regressão (primeiro negativo e segundo positivo) medem o mesmo efeito, evidencia-se um aumento da frequência de CL diante da ação clastogênica do álcool.

Diante da diferença extremamente significante na frequência de MN entre os pacientes e controles nas regiões orais com gradiente de acordo com a expectativa teórica ($C \rightarrow A \rightarrow B$), a explicação provável dos coeficientes de regressão predominantemente negativos expressando correlações baixas, estatisticamente significantes, entre a ocorrência de MN e as variáveis inde-

pendentes indicadoras do consumo do álcool (*ta* e *fa*) e do uso do tabaco (*tf*), deve envolver os mecanismos de reparo diante da agressão de agentes carcinogênicos.

A análise de regressão indica ainda que, contrário do verificado com MN, ocorreu aumento estatisticamente significante somente da frequência de CL em função das variáveis envolvidas com o consumo do álcool nas três regiões orais. Concordantemente, esta anomalia foi a mais frequente nos pacientes conforme o esquema da página 98.

Em face da cronicidade de um agente clastogênico como o álcool nos pacientes, espera-se, como primeira etapa um aumento substancial na frequência de BE e MN (primeira etapa), com posterior degeneração dos seus núcleos (CR), numa segunda etapa, e, finalmente, uma produção massiva de CL (conforme a Tab XIII e esquemas das páginas 98 e 105), em uma terceira etapa, como mecanismo de reparo, visando a manutenção da normalidade das células do epitélio. Enquanto apreciada através de coordenadas tempo-frequência (Fig 8), ocorre inicialmente excessivo aumento na frequência de MN, diminuindo gradativamente (segunda e terceira etapas) com a tendência de eliminação das células com núcleos anômalos (MN, BE, CR e BI) sob a forma de CL. Esta última etapa do processo de reparo tissular responde pelos coeficientes de regressão das frequências de MN (negativos) e de CL (positivos) sobre as variáveis indicadoras do consumo de álcool.

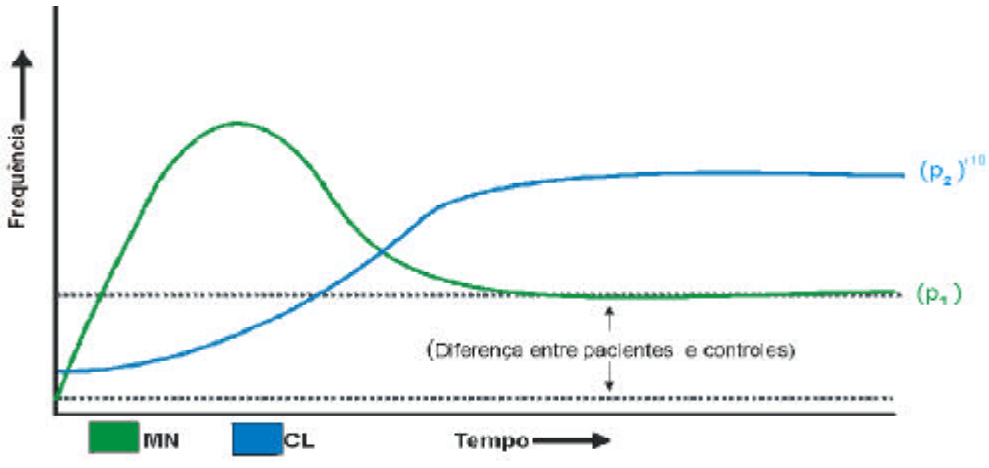


Figura 8 - Variação temporal-esquemática da frequência de MN (p_1) e de CL $(p_2)^{-10}$ após exposição crônica ao álcool (pacientes) durante as etapas de clastogênese (mutagênese) com intenso aumento de carcinogênese, e depressão da ocorrência de MN, a partir da exposição inicial (controles). Durante o processo, a frequência de CL aumenta permanecendo em nível elevado. A evolução da frequência de MN em função do consumo do álcool resulta em coeficiente de regressão (b) pequeno, mas estatisticamente significante (Tab. XIX).

Entretanto, durante todo o processo de eliminação das células com núcleos anômalos, em comparação com a dos controles, a frequência de MN permanece consistentemente mais elevada conforme se verifica nas três regiões orais (Tab XIII).

Como consequência, esse processo de “eliminação seletiva” reflete uma regressão negativa da frequência de MN indiretamente sobre a idade dos pacientes, particularmente visível na região oral tumorizada. Concordantemente, o reparo com a eliminação das células com MN, se expressa através de sua transformação, aumentando a frequência de CL.

Torna-se então congruente que o processo se reflita sobre a idade dos pacientes uma vez que, quanto mais crônico o processo clastogênico (região oral A) seguido do carcinogênico (região oral B), maior também a ocorrência de CL, produzida às expensas de células com MN e demais células nucleadas anormais.

A análise de regressão múltipla envolvendo idade (*id*), consumo de álcool (*ta*) e tempo de existência do carcinoma (*tc*) não evidenciou qualquer interação entre essas três variáveis independentes, todavia, novamente indicou uma pequena regressão negativa ($b = 0,082 \pm 0,039$) mas significante ($F = 4,37$; $P = 0,047$) das frequências de MN sobre a idade.

Em linfócitos de ex-alcoólicos abstinentes, a frequência de aberrações cromossômicas estruturais, geradoras dos MN, aumenta suave ($r = 0,32$) mas significantemente ($b = 0,021 \pm 0,009$, $P = 0,023$) com o tempo de abstinência (Gattás & Saldanha, 1997). Esta situação sugere que o álcool possua também um efeito sistêmico causando mutações nas células matriciais leucopoiéticas, ao contrário do que ocorre com a frequência de MN nos pacientes alcoólicos com carcinomas na presente investigação. Nestes alcoólicos abstinentes, esperar-se-ia que a existência relativamente breve das células epiteliais, em constante divisão, inviabilizasse a formação de linhagens mutantes persistentes, mesmo em células aberrantes primordiais da derme. A futura análise da frequência de aberrações cromossômicas das células dos pacientes examinados na presente investigação certamente esclarecerá esta questão.

5.3 - Crítica metodológica

O protocolo inicial do teste do micronúcleo em células da mucosa oral proposto no inicio da década de 80 pelo grupo de Stich sofreu algumas modificações, principalmente quanto aos critérios de análise microscópica. Apesar dos esforços de Sarto (1987) em eliminar vieses epidemiológicos e da inclusão na análise das outras anomalias metanucleares proposta por Tolbert e col. (1992), pouca atenção foi conferida aos critérios metodológicos nas comparações entre populações expostas e controles. Atualmente, os pesquisadores ainda utilizam as freqüências observadas em grupos controles da década de 80. Além disso, observa-se ausência de precisão e objetividade quanto ao padrão de normalidade na avaliação da freqüência de MN em células da mucosa oral (Beliën e col., 1995), levando ao estabelecimento de associações espúrias na falta de grupos controles adequados.

5.3.1 - Viéses decorrentes da análise citogenética

É difícil obter esfregaços com células intactas para análise citogenética da maioria dos pacientes com câncer (Adhvaryu e col., 1991; Garewal e col., 1993) porque geralmente as lesões são ulceradas. Assim, coletar as células ao redor da área do tumor, e não do tumor propriamente dito como realizou-se na presente pesquisa, provoca menos desconforto ao paciente. Além disso, a coleta com escovinhas e imediata suspensão do material em solução salina, disponibiliza um número maior de células (Gattás e col., 1992).

Um dos erros sistemáticos na avaliação da frequência real de micronúcleos é o fato de sua ocorrência de nem sempre ser identificada. Isto acontece porque, durante o processo de divisão celular, o fragmento cromossômico ou cromossomo inteiro perdido do núcleo pode: a) ser reincorporado a um dos dois núcleos filhos, b) ir para fora do citoplasma de ambas células filhas, ou c) ficar no citoplasma de uma das células filha na forma de micronúcleo. Nos dois primeiros casos, não observa-se perda do material cromossômico.

Entretanto, um dos fatores mais difícil de controlar no teste do MN é a subjetividade durante a análise microscópica apesar dos critérios para a contagem dos micronúcleos terem se tornado mais rigorosos na última década. A análise realizada pela equipe de Stich nos anos 80 era imprecisa porque incluía células degeneradas na contagem geral dos MN. Sarto e col. (1987) excluíram da contagem as células degradadas, mas somente com as investigações de Tolbert e col. (1992) surgiu um novo protocolo no qual foram contados separadamente os micronúcleos e as outras anomalias chamadas de metanucleares na presente investigação.

Todavia, muitos trabalhos vem sendo realizados com uma enorme variação quanto aos critérios de análise microscópica de modo que ocorre grande discrepância quanto às estimativas das frequências de MN, inviabilizando as comparações entre as populações. Tolbert e col. (1991) chamaram a atenção para esse efeito quando verificaram uma associação fraca entre a frequência de MN e o uso do tabaco apesar de ter sido relatada com mais intensidade na literatura.

Merece ser evidenciado que em populações com mesmos hábitos alimentares e sanitários, Sarto e col. (1987) encontraram frequências de MN cinco vezes inferiores às observadas por Stich & Rosin (1983b). Essa avaliação superestimada da frequência de MN identificada nos trabalhos coordenados por Stich, provavelmente, ocorreu em virtude desse Autor haver considerado as células com cariorréxes como MN, além de ter analisado no máximo 1000 células por indivíduo. Essa tendenciosidade nos trabalhos do grupo de Stich também foram anteriormente criticada por Kayal e col. (1993) e Garewal e col. (1993).

Já que torna-se difícil compatibilizar as diferenças metodológicas entre os inúmeros laboratórios (Adhvaryu e col., 1991), sugere-se que produzam controles citogeneticamente mais padronizados nas investigações a fim de não somente diminuir os erros aleatórios, isto é, a variabilidade entre os observadores, como também eliminar os erros sitemáticos decorrentes da análise microscópica (Garewal e col., 1993).

Uma análise criteriosa diminuiu a chance dos falso-positivos na contagem de MN e das anomalias metanucleares na presente pesquisa. Assim, os resultados relativos aos pacientes no presente trabalho revelaram valores inferiores aos observados por todos os outros autores que utilizaram o teste do MN em populações expostas (Tab XVIII). Esse problema metodológico despertou o interesse para uma análise dos grupos considerados controles.

A escolha de controles para indivíduos expostos a determinados agentes clastogênicos não é tarefa fácil porque as populações humanas estão constantemente sujeitas à diversos agentes mutagênicos com maior ou menor intensidade. Muitos indivíduos são expostos, ainda que temporária ou intermitentemente, à agentes físicos (radiação ultravioleta, radioatividade), químicos (drogas), ou mesmo biológicos (vírus e bactérias) com atividades genotóxicas, como acontece com indivíduos afetados pelo vírus do herpes bucal (HSV), que apresentam aumento temporário na frequência de MN (Stich e col., 1985). Assim, mesmo preenchendo todos os pré-requisitos, o grupo controle ainda apresentará uma frequência espontânea de MN.

Tabela XVI - Frequência de MN em populações expostas em várias investigações de mutagenicidade descritos na literatura.

População exposta	idade (média ou intervalo)	sexo	N°de indivíduos	N°células analisadas por indivíduo	Aumento na frequên-cia de MN	Siginificância na comparação com o controle	Análise microscópica	Análise estatística	Autor
usuários de betel	47,08	M/F	37	mínimo 50 células	+	P< 0,001	Próprio	teste t	Stich e col.,1982
usuários de tabaco Kaini	33,78	M/F	27	mínimo1000	+	P< 0,001	Próprio	teste t (?)	Stich e col., 1982
usuários de tabaco portadores de fribrose oral submucosa	25-65	M/F	31	1000	+	P< 0.001	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Kayal e col., 1983
Fumantes e usuários de bebidas alcólicas	20 a +50	?	70	mínimo 500	+	P= 0,001	Stich ecol., 1982	teste t	Stich e Rosin., 1983
usuários de betel e mascadores de tabaco	30-60	M/F	50	~ 300	+	P< 0,0001	Stich e col., 1982	teste t (?)	Stich e col., 1984
mascadores de noz de betel	?	?	17	mínimo 500	+	significante	Stich e col., 1982	teste t	Stich & Rosin, 1984
mascadores de fumo com betel	?	?	20	mínimo 500	+	significante	Stich e col., 1982	teste t	Stich & Rosin, 1984
Pacientes mascadores de mava portadores fribrose oral submucosa	30,33	M/F	15	mínimo 1000	+	P< 0,001	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Adhvaryu e col., 1991
usuários de rapé	60,20	F	38	conversão 1000	+	P= 0,01	Sarto e col., 1987 e outras anomanias metanucleares	Wilcoxon[c]	Tolbert e col., 1991
mascadores de tabaco	?	?	69	1000	+	P< 0,001	?	?	Garewal e col., 1993
pacientes com lesões orais pré neoplásicas em quimioterapia	59,60	M/F	57	1000 ou mínimo 500	+	P= 0,035[a]	Próprio	Wilcoxon[c]	Benner e col., 1994
					-	P= 0,021[b]			
Usuários de tabaco e álcool	15-65	M/F	50	1000	+	significante	Parida e Ghose., 1992	?	Ghose & Parida, 1995
Usuários de rapé	?	?	22	?	+	P< 0,005	Tolbert e col., 1992	x^2	Roberts,1997
Tabalhadores expostos ao benzeno	37,44	M	18	1500	-	não significante	Surrallés e col., 1997	Man-Whitney[c] ou Wilcoxon[c]	Surrallés e col., 1997
Alcóolicos com câncer oral	58,90	M	30	2000	+	P= 0,0004	Tolbert e col., 1992	Man-Whitney[c] Kruskal-Wallis[c] Dunn[c]	presente trabalho

[a] em pacientes com lesões orais pré neoplásicas, [b] após quimioterapia, [c] testes não paramétricos.

Por conseguinte, os grupos considerados controles de populações sob risco mutagênico relatados na literatura exibem alta variabilidade de MN, comprometendo uma avaliação precisa de sua frequência espontânea em populações “naturais” isto é, não expostas à agentes mutagênicos. A tabela XIX apresenta frequências de MN utilizadas como controles em várias investigações de mutagenicidade descritas na literatura.

Na presente investigação, apesar da região ao redor da lesão exibir um maior e significante aumento na frequência de MN (0,078%), uma frequência intermediária na região oposta à lesão (0,046%) e apenas 0,026% na região fundo de saco gengivo-labial superior, esses valores, comparados aos dados publicados na literatura são, em todas regiões, muito inferiores. Os indivíduos controles, com 0,013% de MN tanto na bochecha direita quanto na esquerda e 0,012% na região fundo de saco gengivo-labial superior também revelaram valores muito inferiores aos relatados na literatura refletindo talvez, um critério mais rígido na avaliação citogenética da presença de MN bem como mais adequado estatisticamente nas comparações.

A comparação das frequências de MN nos pacientes e controles da presente investigação, analisadas através do mesmo critério metodológico revela a necessidade de utilização de controles pareados especificamente para cada população exposta quanto aos inúmeros fatores intervenientes tais como sexo, idade, grupo étnico, profissão, nível sócio-econômico, etc. a fim de minimizar viéses aleatórios e sistemáticos frequentemente presentes em investigações anteriores.

Tabela XVII - Frequência de MN utilizadas como referências controles em várias investigações de mutagenicidade descritas na literatura.

População controle de	idade (média ou intervalo)	sexo	N°de indivíduos	N°células analisadas por indivíduo	Freqüência de MN por 1000 células	Análise microscópica	Análise estatística	Autor
fumantes e alcoólicos	20 - >50	-	15	mínimo de 500	3,20	Stich e col., 1982	teste t	Stich e Rosin, 1983
mascadores de fumo com betel	-	-	34	mínimo de 500	4,00	Stich e col., 1982	teste t	Stich e col., 1985
Mascadores de noz de areca	32,70	M/F	15	mínimo de 1000	1,93	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Adhvaryu e col., 1991
pacientes com carcinomas orais	37,68	M/F	25	≅ 3000	3,80	Sarto e col., 1987	teste t	Sarto e col., 1987
trabalhadores de indústria de tintas	33,00	M	19	3000	0,47	Stich e col., 1985	teste t	Diaz e col., 1990
usuários de rapé	61,40	F	15	conversão para 1000	1,58	Sarto e col., 1987 e outras anomalias nucleares	Wilcoxon [e]	Tolbert e col., 1991
mascadores de noz de betel	-	-	14	mínimo de 500	5,00	Stich e col., 1982	teste t	Stich e col., 1985
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	17-42 [b]	M/F	29	1000	1,75	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Kayal e col., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	15-45 [b]	M/F	10	1000	1,83	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Kayal e col., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	20-25 [d]	F	13	1000	1,00	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Kayal e col., 1993
mascadores de qualquer fumo e alcoólicos	20-25 [c]	M/F	15	1000	1,90	Sarto e col., 1987	teste t (?)	Kayal e col., 1993
enfermeiros expostos à drogas neoplásicas	34,60	M/F	25	1000	0,17	Sarto e col., 1987 e Tolbert e col., 1992	χ^2	Machado-Santelli e col., 1994
indivíduos saudáveis [a]	30-42	F	5	de 2500 a 5600	1,62	Tolbert e col., 1992	Mann-Whitney [e]	Titenko-Holland e col.,1994
consumidores de água com Arsênico	41,60	M/F	32	mínimo de 1000	0,58	Tolbert e col., 1992	teste t	Gonsebatt e col., 1997
fumantes e usuários de *Maras Powder*	40,62	M	14	de 1500 a 3500	8,40	Stich e col., 1982	teste t (?)	Ozkul e col., 1997
trabalhadores expostos ao benzeno	47,27	M	15	1500	2,18	Surrallés e col., 1997	Mann-Whitney [e] ou Wilcoxon [e]	Surrallés e col., 1997
usuários de rapé	-	-	19	1,348	1,80	Tolbert e col., 1992	χ^2	Roberts, 1997
indivíduos com carcinoma oral	38,40	M	30	2000	0,13	Sarto e col., 1987 e Tolbert e col., 1992	Mann-Whitney [e]	presente trabalho

[a] grupo controle não utilizado em comparação com população exposta; [b,c,d] regiões da Índia; [e] testes não paramétricos.

5.3.2 - Viéses decorrentes da análise estatística

Apesar da discrepância na frequência de MN entre populações “não expostas” relatadas na literatura, poucas investigações preocuparam-se com a adequação metodológica da representatividade do número de células para estimar sua frequência espontânea. Beliën e col. (1995) concluíram que, a análise de pelo menos 10.000 células seria suficiente para estimar a frequência básica de MN considerando sua baixa incidência e alta variabilidade entre indivíduos. Esses autores sugeriram, ainda, que fossem realizadas contagens automatizadas de MN embora até o presente as análises ainda vêm sendo realizadas visualmente.

A ocorrência de frequências de MN praticamente iguais nas duas bochechas (D e E), dos controles da presente investigação confirmou o rigor da presente técnica. Os dados da literatura (Tab XIX) indicam que a ocorrência natural de MN esteja em torno de 1/1000, com grande variabilidade intra-individual e intra-populacional, já discutidas anteriormente. A contagem de 2000 células (N) por individuo (n) deve incluir a variabilidade normal (espontânea) da frequência de MN, descartando viéses na estimativa de sua incidência (Ramirez & Saldanha, 1998). Contagens inferiores, como as realizadas na maioria das investigações relatadas na literatura, produzem distribuições truncadas e consequentemente subestimativas da ocorrência real da frequência de MN.

Outro viés relaciona-se ao número de indivíduos a ser considerado na amostragem. Como a consistência estatística aumenta com o tamanho da amostra, optou-se pelo valor de 30 que assegura representatividade estatística do universo para estimar os parâmetros amostrais (médias e variâncias) sem correções para desvios aleatórios. Neste contexto, a realização de três contagens no mesmo indivíduo representa o reconhecimento da variabilidade intra-individual como controle primário da ação mutagênica associada à carcinogênese. Obviamente, contagens através do teste cego impede a ocorrência do viés humano de efeito sutil e variável de acordo com o observador.

[55]p medido em relação ao número de células (N) ou por indivíduo (n) que, ao contrário da distribuição binomial, não se conhece a variável alternativa bem como o valor de $\underline{n}$ na equação $(p+q)^n$ (Moroney, 1956).

Outro problema estatístico é a natureza (precisão, eficiência e confiabilidade) do teste de significância utilizado para revelar diferenças na frequência de MN entre sujeitos e controles. Como a ocorrência de MN é um evento relativamente raro e aleatório, isto é, não paramétrico[55], sua distribuição ajusta-se à fórmula de *Poisson* (cf. 3.3 - Análise estatística). A utilização de testes paramétricos entre duas (t de *student*) ou mais (F de *Fisher*) amostras é ineficiente na avaliação da significância de diferenças entre médias amostrais, procedimento frequentemente realizado por muitos pesquisadores (Tabs XVIII e XIX), tornando inconfiável os resultados de suas investigações.

Os testes não paramétricos correspondentes são mais eficientes e confiáveis para avaliar a significância das diferenças entre duas (teste de *Mann-Whitney*) ou mais (teste de *Kruskal-Wallis*) amostras. O teste de comparação múltipla de *Dunn* permite a comparação de diferenças entre os vários pares amostrais de tamanhos iguais, correspondendo ao ANOVA paramétrico. Ainda, em comparações bi-amostrais, a significância das diferenças envolvendo variável não paramétrica observada em grupos emparelhados, seria mais eficientemente estimada através do teste de amostra emparelhada de *Wilcoxon* (Canover, 1980).

Em investigações multi-amostrais podem ser utilizados outros teste também baseados em patamares (*ranks*), tais como o teste da mediana em que a contingência pode ser analizada pelo χ^2 ou pelo teste G, teste de *Tukey* não paramétrico ou teste de *Neumann-Keuls* (Zar, 1996).

Entretanto, a variável não paramétrica pode ser utilizada em testes paramétricos desde que seja normalizada através de algum tipo de transformação, como foi tentado na presente investigação nas estimativas de regressão múltipla, através da transformação da raiz quadrada $\sqrt{y + 0{,}5}x1000$.

Finalmente, a análise genotóxica através do teste do micronúcleo contribui, dentre as técnicas disponíveis, como um instrumento metodológico de triagem rápida, segura e econômica

para o monitoramento de agentes bio-agressivos ambientais. Consequentemente, é surpreendente a inexistência de monitores eletrônicos automáticos (a exemplo do contador *Geiser* para detectar a radioatividade ambiental) com a finalidade de avaliar indiretamente a ação de biopoluentes, utilizando o teste do MN. Como a frequência de MN, sob a ação de agentes mutagênicos, transforma-se de uma distribuição do tipo *Poisson* em dispersão aproximadamente binomial positivamente assimétrica ($s^2 = m \rightarrow s^2 > m$)[56], a "leitura da variância" através de aparelhos eletrônicos (micronucleômetros) poderia constituir referência para triagens rápidas e seguras de grupos populacionais sob risco mutagênico, a partir de amostras de células da mucosa oral, sangue, etc.

Concluindo, o teste do micronúcleo pode ser instrumento de triagem diagnóstica para prevenção e conduta clínicas em indivíduos sob risco carcinogênico tais como os expostos a agentes biotóxicos ambientais, usuários abusivos ou crônicos do álcool, tabaco e drogas psico-ativas.

Por ser uma técnica simples, prática, não invasiva e de baixo custo permite, com facilidade, o monitoramento individual de pacientes com carcinomas orais, sua evolução clínica, recidivas, surgimento de novas neoplasias, lesões leucoplásicas bem como alterações tópicas causadas por biopoluentes mutagênicos, através do controle intra-individual de diferentes tecidos e inter-individual de populações. Pacientes com carcinoma oral ou portadores de alterações leucoplásicas, quando alcoólicos e fumantes inveterados, apresentam um alto risco de desenvolver um segundo tumor e aqueles com câncer de cabeça e pescoço têm alta taxa de recorrência local ou regional. Um dos problemas do seguimento clínico desses pacientes decorre da necessidade de diagnóstico de novos tumores cuja ocorrência aumenta em função de sua sobrevida, com taxas acima de 5% ao ano (Ramirez e col., 1999).

Como bio-indicador de exposição genotóxica poderia constar de todos os protocolos de quimio-prevenção, particularmente de trabalhadores expostos tais como os que manipulam derivados de petróleo em postos de gasolina (Gattás, 1997) e agricultores em contato direto com

[56] A variância aumenta. A significância dessa variabilidade chamada *Poisson* extra (*extra Poisson variability*) ou supra dispersão (*overdispersion*) é frequentemente observada em experimentos de genotoxidade microbiológica (Khromov-Borisov e col., 1998) e pode ser obtida praticamente em tabelas estatísticas padronizadas (Khromov-Borisov & Henriques, 1998).

agrotóxicos e outros defensivos agrícolas (Titenko-Holland e col., 1997, Gómez-Arroyo e col., 1998).

. Finalmente, o teste do micronúcleo, em pequenas comunidades distantes dos grandes centros clínicos, pode frequentemente representar um dos poucos testes disponíveis para triagem de pacientes sob risco clastogênico.

5.4 - Perspectivas de investigações futuras

Como na presente pesquisa avaliou-se o efeito clastogênico do álcool sobre um órgão alvo (boca), pretende-se nas investigações futuras em programa de doutoramento, investigar a ação sistêmica do álcool, os efeitos pleiotrópicos associados à susceptibilidade individual ao câncer através da análise de enzimas envolvidas com o metabolismo de agentes carcinogênicos bem como a predisposição familial para a mutagenicidade através de estudo comparado entre pacientes, irmãos e/ou controles não aparentados sadios.

5.4.1 - Análise citogenética

A análise dos linfócitos dos mesmos pacientes da presente investigação quanto às aberrações cromossômicas visa estabelecer associações entre a presença de MN na mucosa oral e alterações estruturais tais como quebras e rearranjos cromossômicos. Com esta finalidade os linfócitos dos pacientes foram processado segundo técnica modificada de Moorhead e col. (1960) e atualmente as metáfases encontram-se congeladas em *eppendorfs* no Laboratório de Citogenética.

As quebras cromossômicas mais frequentemente encontradas em 40-60% das neoplasias de cabeça e pescoço são as deleções afetando os cromossomos 3p,5q, 8p, 9p e 18q. Menos comuns (30-40%) são as duplicações em 3q, 5p,7p,8q e 11q, apesar de dados preliminares sugerirem que a perda do 18q pode ser especialmente importante por envolver alterações dos genes responsáveis pela coesão celular (Carey e col., 1993). Além disso, Rao e col. (1994b) verificaram que os fragmentos cromossômicos 1p13, 3p13-p23, 6q15-q26, 6q21-q25 e 12p11.2 foram sistematicamente perdidos em carcinomas de cabeça e pescoço.

A análise de culturas de células humanas de 11 carcinomas escamosos da mucosa oral revelou que 61% das quebras cromossômicas ocorreram em regiões centroméricas geralmente resultando em isocromossomos e translocações não balanceadas, provavelmente a maior causa do desenvolvimento dos carcinomas orais (Hermsen e col., 1996).

Em virtude de resultados satisfatórios obtidos através da técnica de *FISH* envolvendo sondas centroméricas, tanto em linfócitos como em células da mucosa oral e nasal (Titenko-Holland e col., 1996; Surrallés e col., 1997; Thierens e col., 1999), como metodologia auxiliar, pretende-se hibridizar as mesmas metáfases para identificação de regiões responsáveis pelo processo de mutagenicidade e relacioná-las à ocorrência da carcinogênese previamente observada na mucosa oral.

5.4.2 - Indicadores de alterações no DNA (enzimas polimórficas)

Como 90% dos tumores malígnos ocorrem devido aos insultos ambientais, os organismos superiores desenvolveram mecanismos complexos de proteção metabólica. O primeiro, na maioria dos casos, é a habilidade em metabolizar toxinas xenobióticas. Várias superfamílias de enzimas geneticamente polimórficas, incluindo as do citocromo P450 (P450s), glutationa-S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NATs) estão envolvidas com a resposta metabólica ao insulto ambiental, ativando (fase I) do metabolismo e detoxificando (fase II) a ação dos agentes carcinogênicos. Portanto, uma alteração na atividade dessas enzimas, como resultado de mutação nos genes que a codificam, pode aumentar a susceptibilidade dos indivíduos ao desenvolvimento de algum tipo de câncer (Smith e col., 1995).

Estudos recentes na literatura pertinente estão estabelecendo relações entre a presença ou ausência de alelo mutante específico com a susceptibilidade para o desenvolvimento de um tipo particular de câncer. A baixa atividade do fenótipo NAT2-AS revelou um aumento no risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em resposta aos carcinógenos do tabaco (Gonzáles e col., 1998).

Jovens com câncer de boca revelaram deficiências nas atividades da GST que aumentou o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer em comparação a idosos com atividades normais dessa enzima (Schantz, 1994). Consequentemente, certos indivíduos seriam suscetíveis mesmo à fraca atividade de agentes carcinogênicos enquanto outros seriam altamente resistentes à intensa ação desses agentes.

Além disso, alguns pesquisadores verificaram associações entre a ação dessas enzimas e a frequência de alterações citogenéticas. A frequência de aberrações estruturais em fumantes com câncer de pulmão parece ser incrementada em indivíduos com variantes polimórficas mutantes dos denes da GST (Conforti-Froes e col., 1997). Ainda, a variabilidade individual na ativação metabólica dos agentes mutagênicos bem como a eficiência do reparo de DNA poderiam ser responsáveis pelas diferenças inter-individuais na indução das frequências de linfócitos micronucleados (Duffaud e col., 1997) e logo na predisposição carcinogênica.

O aumento significante na frequência de determinados alelos enzimáticos polimórficos envolvidos com a ativação e detoxificação do álcool poderiam ser identificados como efeitos pleiotrópicos da susceptibilidade-resistência ao câncer. Enzimas polimórficas podem ser analizadas a partir do DNA extraído de linfócitos dos pacientes, já congelados no laboratório de Citogenética.

5.4.3 - Estudo de irmãos

A predisposição à carcinogênese, certamente poligênica e multifatorial, tem sido revelada frequentemente com relação a inúmeros tipos de câncer através de sua concentração familial.

O método de recorrência familial no qual a incidência de uma condição rara em parentes de propósitos aumenta significantemente em comparação com a população geral de acordo com o coeficientes de parentesco (F), poderia ser aplicado ao carcinoma oral utilizando-se o teste do micronúcleo em irmãos sadios com idades semelhantes à dos pacientes. Na hipótese de predisposição genética, a exemplo do que ocorre nas regiões orais dos pacientes, esperar-se-ia um aumento significante na frequência entre os irmãos dos pacientes, comparados aos controles sadios, revelando uma “constelação gênica” predisponente ao carcinoma oral.

6 - CONCLUSÕES

1. A análise da literatura revelou que o teste do micronúcleo pode ser instrumento de triagem diagnóstica para prevenção e conduta clínicas em indivíduos sob risco carcinogênico tais como aqueles expostos a agentes biotóxicos ambientais e usuários abusivos ou crônicos do álcool, tabaco e outras drogas.

2. A comparação da frequência de micronúcleos nas três regiões orais dos pacientes da presente investigação revelou um gradiente estatisticamente significante e condizente com o processo neoplásico.

3. A comparação da frequência de micronúcleos nas regiões orais dos controles mostrou ocorrência idêntica em ambas bochechas na ausência de agentes mutagênicos e do processo carcinogênico.

4. A comparação das frequências de MN indicou ainda, um aumento acentuadamente significante de sete vezes na frequência de MN ao redor da lesão (P=0.0004), um aumento significante de três vezes na região contra-lateral ao tumor (P=0.0297) e de duas vezes, mas não significante, na região gengivo-labial superior (P=0.4409) dos pacientes, quando comparadas com as regiões equivalentes do grupo controle.

5. A região fundo de saco gengivo-labial superior pode ser utilizada, nos pacientes, como uma área de controle operacional intra-individual uma vez que nas três regiões apresentou a menor frequência de micronúcleos. Todavia, esta diferença inter-regional foi acentuadamente menor nos controles.

6. As anomalias metanucleares são intrínsecas ao epitélio de escamação da mucosa oral e representam respostas adaptativas às injúrias provocadas principalmente pelo álcool de acordo com os limiares carcinogênicos de cada região oral.

7. Os resultados sugerem que sob ação do álcool (e do fumo) ocorreria, na mucosa oral dos pacientes, um intenso e rápido aumento na frequência de MN na tentativa de preservação celular, seguindo-se uma segunda fase, com depressão na sua frequência que se estabilizaria, numa terceira fase, em níveis significantemente superiores aos iniciais (controles). Durante a fase de estabilização, ocorreria também um significante aumento na frequência de CL, resultantes da eliminação de MN, como mecanismo de reparo.

8. Quanto ao aspecto metodológico, o estabelecimento de critérios mais rígidos eliminou viéses tanto citogenéticos quanto estatísticos na estimativa da incidência de micronúcleos, revelando a necessidade de controles específicos e pareados quanto a fatores intervinientes em pesquisas de monitoramento mutagênico.

9. A análise dos fatores intervenientes revelaram que o álcool foi o único diretamente responsável pelo aumento na frequência de micronúcleos e, indiretamente, na carcinogênese dos pacientes, enquanto a idade não apresentou efeito estatisticamente significante.

10. Finalmente, apesar do teste do micronúcleo não ter significado patognomônico no diagnóstico da carcinogênese, a análise da literatura e dos resultados da presente investigação confirmaram que a frequência de MN nas células de escamação da mucosa oral possa ser uma conduta auxiliar na triagem rápida de indivíduos sob risco do desenvolvimento de neoplasias orais em virtude de: a) consumo crônico e abusivo de drogas, particularmente o álcool e o tabaco; b) ocorrência de tumor primário tratado ou removido cirurgicamente, no monitoramento de recidivas; c) submissão à tratamentos quimio e/ou radioterápicos intensos; d) parentesco (primeiro grau) próximos de portadores de carcinomas orais.

7 - RESUMO

O teste do micronúcleo (MN) vem sendo utilizado como indicador de exposição genotóxica uma vez que sua ocorrência está associada às aberrações cromossômicas.

Comparou-se a frequência de MN de 30 pacientes alcoólicos crônicos portadores de carcinomas orais e orofaríngeos, nos quais o consumo de álcool variou de quatro à 59 anos, com a de 30 indivíduos abstinentes de semelhante nível sócio-econômico. A diferença (14,5 anos) entre a média da idade dos pacientes ($52,9 \pm 1,6$) e a dos controles ($38,4 \pm 1,5$) foi estatisticamente significante ($P< 0,0001$).

A pesquisa consiste na análise de 2000 células de escamação da mucosa oral de três regiões distintas da boca de pacientes e controles: ao redor da lesão (B), na região contra-lateral à lesão (A) e na região fundo de saco gengivo-labial superior (C), previamente considerada controle devido à baixa incidência de tumores.

As células foram fixadas, coradas e analisadas em “teste cego” através de técnica modificada e adaptada aos requisitos específicos da pesquisa. O número de MN por 2000 células por indivíduo nos pacientes, assim como nos controles mostrou uma distribuição de *Poisson* com dispersão assimetricamente positiva, e aumento da variância nos pacientes. A distribuição de anomalias metanucleares também exibiu desvios significantes da dispersão normal.

A heterogeneidade da frequência de MN nas três regiões orais dos pacientes, avaliada através do teste de *Kruskal-Wallis*, mostrou-se extremamente significante ($P = 0,005$). Enquanto a comparação entre as regiões B *vs* C foi estatisticamente significante ($P < 0,01$), as comparações entre as regiões A *vs* B ou A *vs* C ($P > 0,05$) não revelaram diferenças estatisticamente significante através do teste de comparação múltipla de *Dunn*. As comparações das diferenças

nas frequências de MN resultantes do emparelhamento entre as três regiões orais (A-B, A-C, B-C), aumentou o nível de significância dos resultados quanto à heterogeneidade regional (P = 0,0003) e tornou a comparação A *vs* C estatisticamente significante. Entretanto, a análise da variância não paramétrica da distribuição de MN nas três regiões orais dos controles não indicou heterogeneidade (P = 0,943).

As frequências de MN e de células metanucleadas nas regiões orais dos pacientes também foram comparadas à dos controles através do teste de *Mann-Whitney*. A diferença na região tumoral foi extremamente significante (P < 0,001) e, significante na região oposta à lesão (P = 0,03) porém não significante na região fundo de saco gengivo-labial superior (P = 0,44). Esses resultados indicam um aumento de sete vezes na frequência de MN ao redor da lesão, três vezes na região oposta à lesão e duas vezes, embora não estatisticamente significante, na região fundo de saco gengivo-labial superior, revelando um gradiente na frequência de MN no sentido C $\rightarrow$ A $\rightarrow$ B. Comparações das frequências de células metanucleadas: binucleadas (BI), cariorréxes (CR), cariólises (CL) e *broken egg* (BE) nas três regiões orais de pacientes e controles, revelaram diferenças extremamente significantes, com exceção apenas de BE, em todas as regiões orais e de CR na região fundo de saco gengivo-labial superior.

As comparações dicotômicas das variáveis independentes não paramétricas com a frequência de MN através dos testes de contingência e *Mann-Whitney*, não foram estatisticamente significantes ao nível de 5% de probabilidade, com exceção de uma única questão do questionário de diagnóstico do alcoolismo *CAGE*, que confirmou o efeito do álcool.

Ao contrário dos resultados esperados, as frequências de MN e anomalias metanucleares não mostraram associações significantes com a idade tanto nos pacientes como nos controles. Ainda mais, a análise de regressão múltipla escalonada da frequência de células com MN ou anomalias metanucleares sobre fatores intervenientes, como idade, fim e tempo de consumo de

álcool e tempo de uso de tabaco, nos pacientes, revelou coeficientes de regressão pequenos e negativos, mas significantes. Já os coeficientes de regressão da variável CL sobre o consumo de álcool foi significantemente pequeno, mas positivo, com ou sem transformação das frequências das variáveis dependentes através da raiz quadrada.

Entretanto, os resultados da análise de regressão dos pacientes, aparentemente contraditórios, podem ser explicados supondo-se que as frequências de MN, durante a exposição crônica ao álcool, teriam um forte aumento inicial, diminuindo posteriormente até um nível significantemente maior que aquele no início do consumo de álcool; por outro lado, a frequência de CL aumentaria inversamente como resultado da transformação de MN durante o processo de reparo.

Pode-se deduzir a partir resultados da presente pesquisa que a análise de células com MN e anomalias metanucleares devem levar em consideração critérios de padronização citológicos rígidos. O número de células a ser contado deve ser fixo e superior a 2000 de modo que inclua a variabilidade normal (espontânea) da distribuição de MN e, ainda, eliminar viéses estatísticos na estimativa de suas frequências. Ainda, o tamanho da amostra deve ser superior à 30 indivíduos, a fim de assegurar a representatividade estatística. A significância das diferenças inter-grupais deve ser estimada através de testes não paramétricos. Além disso, análises intra-individuais (ou inter-regionais) bem como a utilização de controles específicos inter-individuais pareados quanto aos fatores intervenientes (sexo, idade, grupo étnico, nível sócio-econômico, etc.) deveriam ser práticas metodológicas usuais.

Como conclusão, o teste do MN deve ser considerado como uma técnica de triagem simples, prática, econômica e não invasiva para a prevenção e monitoramento clínicos de indivíduos sob risco carcinogênico, após exposição à agentes ou situações genotóxicas, como consumo crônico e abusivo de álcool, tabaco e/ou outras drogas mutagênicas, ou ainda, manipulação

profissional de derivados de petróleo e outras substâncias tóxicas industriais. No contexto da presente investigação, o teste do MN deve ser particularmente indicado para monitoramento da evolução clínica de indivíduos com tumores ou lesões leucoplásicas curadas ou removidas cirurgicamente ou após tratamentos quimo ou radioterápicos, através de comparações intra e inter-individuais

8 - ABSTRACT

Micronucleus (MN) test has been used as an indicator of genotoxic exposition since it is associated with the occurrence of chromosomal aberrations.

The frequency of MN among 30 subjects with oral and oropharyngeal carcinomas, whose alcohol consumption varied from four to 59 years, was compared to that of 30 healthy control individuals, abstinent for alcohol and matched for social-economic status. Difference (14.5 years) between average age of patients (52.9 $\pm$ 1.6) and that of controls (38.4 $\pm$ 1.5) was statistically significant ($P < 0.0001$).

The investigation includes the examination of 2000 cells per individual from each of three distinct areas in the mouth of patients and controls: around the lesion (B), opposite to the lesion (A) and in the upper gengivo-labial gutter (C) taken as control site because of its low tumour occurrence.

The cells were fixed, dried and analyzed under “blind test”, according to the technique of Sarto, modified and fitted strictly to the requirements of the research. The number of MN per 2000 cells per individual among patients as well as controls showed a Poisson distribution with a positively asymmetric dispersion and an increased variance among patients. Distribution of metanucleated cells also departed significantly from normal dispersion.

The heterogeneity of MN in the three oral regions of patients, evaluated through Kruskal-Wallis test, was highly significant ($P = 0.005$) and pairwise comparison B *vs* C was statistically significant ($P < 0.01$) but not comparisons between A *vs* B or A *vs* C ($P > 0.05$), through Dunn´s multiple comparison test. Comparisons of pairwise inter-regional oral differences of MN frequencies

(A-B, A-C, B-C), increased the significance levels of the results for regional heterogeneity (P = 0.0003) becoming also the comparison A vs C statistically significant. Otherwise, non parametric analysis of variance of the MN distribution in the three oral regions of the controls indicated great statistical homogeneity (P = 0.943).

Frequencies of MN and metanucleated cells in the oral regions of patients were also compared to those of controls, through Mann-Whitney test. Differences were highly significant (P< 0.001) for tumoral region and significant for the region opposite to the lesion (P = 0.03) but not for the upper gengivo-labial gutter (P = 0.44). These results indicated a seven-time increase in the frequency of MN in the region around the lesion, a three-time increase in the opposite region and a two-time but non significant increase in the upper gengivo-labial gutter, revealing a gradient frequency in the way C $\rightarrow$ A $\rightarrow$ B. Comparisons of frequencies of metanucleated cells: binucleated (BI), cariorrhexis (CR), cariolisis (CL) and broken egg (BE) in the three oral regions, between patients and controls, showed highly significant differences, except for BE frequencies in all oral regions and for CR frequency in the upper gengivo-labial gutter.

Dichotomous comparisons of non parametric independent variables, with MN frequencies, through contingency and Mann-Whitney tests, were not significant at 5% level of probability, except for CAGE diagnosis of alcoholism, which confirmed the alcohol effect.

Contrary to the expected results, sistematically frequencies of MN and metanucleated cells were not significantly correlated to age among patients as well as controls. Moreover, stepwise multiple regression analysis of MN and metanucleated cells in the patients revealed small negative, but significant, regression coefficients upon intervinient factors such age, end and time of alcohol consumption and time of tobacco usage, but regression coefficients of CL, upon alcohol consumption, were significantly small, but positive, before or after square root transformation of dependent variables.

However, the apparently contradictory results from analysis of regression among patients could be explained by the assumption that frequencies of MN, under alcohol exposure, had a early strong increase, but decreased, afterwards, to a level significantly greater than that before alcohol consumption, while CL frequency conversely increased significantly as a result from MN transformation, during the repair process.

It could be stated from the results of the present research that examination of cells with MN and metanucleated anomalies should follow critical and strict cytological criteria of standardization. The number of cell counts should be fixed and above 2000 in order to include normal (spontaneous) variability in the distribution of MN and, therefore, to prevent biases in the estimation of its frequencies. Also, sample size should be above 30 individuals, so that the statistical representativity be assured and significance of intergroup differences, could be estimated through non parametric tests. Moreover, intra-individual (or intra-regional) examinations and specific inter-individual controls matched for intervinient factors (sex, age, etnic group, socio-economic level, etc.) should be an usual methodological practice.

As a conclusion, it must to be considered that MN test is a simple, practical, non-expensive and non-invasive screening technique of diagnosis for clinical prevention and management of subjects under carcinogenic risks, after exposition to genotoxical agents or situations, such as abusive and chronical consumption of alcohol, tobacco and/or other mutagenic drugs or professional manipulation of derivatives of petroleum and other toxical industrial substances. In the context of the present investigation, the MN test must particularly be indicated for monitoring the clinical evolution of subjects with healed or surgically removed tumours or leukoplasic lesions, after chemio or radiotherapic treatments, by means of intra and inter-individual cellular comparisons.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHVARYU, S.G.; DAVE, B.J.; TRIVEDI, A.H. Cytogenetic surveillance of tobacco-areca nut (mava) chewers, including patients with oral cancers and premalignant conditions. *Mutat. Res., 261*: 41-49, 1991.

AGOSTINI, J.M.S.; BUENO, A.M.S.; SILVA, C.R.; KUHNEN, S. Frequências de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de 3 populações naturais de *Geophagus brasiliensis*. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 99, 1998.

AGOSTINI, J.M.S.; OTTO, P.A.; WAJNTAL, A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed in individual to plasma from at-risk groups. *Rev. Brasil. Genet., 19 (4)*: 641-646, 1996.

AL-SABTI, K.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; STEGNAR, P. A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutat. Res., 280*: 215-223, 1992.

AMES, B.N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res., 31*: 347-364, 1975.

ANDREASEN, J.O. Oral lichen planus I - A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg., 25(11)*: 31-42, 1968.

ANWAR,W.A. Assessment of cytogenetic changes in human populations at risk in Egypt. *Mutat. Res., 313*: 183-191, 1994.

AU, W.W.; WALKER, D.M.; WARD JR, J.B.; WHORTON, E.; LEGATOR, M.S.; SINGH, V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat. Res., 260*: 137-144, 1991.

BADR, F.M. & HUSSAIN, F.H. Chomossomal aberrations in chronic male alcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res., 6*: 122-9, 1982.

BAGASRA, O.; KAJDACSY-BALLA, A.; LISCHNER, H.W.; POMERANTZ, R.J. Alcohol intake increases human immunodeficiency virus type 1 replication in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis., 167*: 789-97, 1993.

BALLARIN, C.; SARTO, F.; GIACOMELLI, L.; BARTOLUCCI, G.B.; CLONFERO, E. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutat. Res., 280*: 1-7, 1992.

BARALE, R.; CHELOTTI, L.; DAVINI, T.; DEL RY, S.; ANDREASSI M.G.; BALLARDIN M.; BULLERI M.; HE, J.; BALDACCI, S.; DI PEDE, F.; GEMIGNANI, F.; LANDI, S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age and lifestyle. *Environ. Mol. Mutagen., 31(3)*: 228-42, 1998.

BARAONA, H.; GUERRA, M.; LIEBER, C.S. Cytogenetic damage of bone marrow cells produced by chronic alcohol consumption. *Life Sci., 29*: 1797-1802, 1981.

BARILIAK, I.R. & KOZAACHUK, S.I.U. Embryotoxic and mutagenic activity of ethanol and acetaldehyde in intra-amniotic exposure. *Tsitol. Genet., 17*: 57-60, 1983 *apud* GATTÁS, G.J.F. Investigação Genética de ex-alcoólicos crônicos com especial referência às aberrações cromossômicas. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,1994. (Tese doutorado em Genética).

BARNES, R.D. & RUPPERT, E.E. **Zoologia dos Invertebrados**, 6 ed., São Paulo. Roca, 1994, p.49 e 59.

BARRA,S.; FRANCESCHI, S.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; LA VECCHIA, C. Type of alcoholic beverage and cancer of the oral cavity, pharynx and oesophagus in an Italian area with high wine consumption. *Int. J. Cancer, 46*: 1017-1020, 1990.

BARTH, T.H.; ZÖLER, J.; KÜBLER, A; BORN, I.A.; OSSWALD, H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, alpha-tocopherol and vitamin C. *Int. J. Vitamin. Nutr. Res., 67(5)*: 368-76, 1997.

BELLIËN, J.A.M.; COPPER,M.P.; BRAAKHUIS, B.J.M.; SNOW, G.B.; BAAK,J.P.A. Standarization of couting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis, 16(10)*: 2395-2400, 1995.

BENNER, S.E.; LIPPMAN, S.M.; WARGOVICH, M.J.; LEE, J.J.; VELASCO, M.; MARTIN, J.W.; TOTH, B.B.; HONG, W.K. Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. *Int. J. Cancer, 59*: 457-459, 1994a.

BENNER, S.E.; WARGOVICH, M.J.; LIPPMAN, S.M.; FISHER, R.; VELASCO, M.; WINN, R.J.; HONG, W.K. Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 3*: 73-76, 1994b.

BHATTATHIRI, V.N.; BINDU, L.; REMANI, P.; CHANDRALEKHA, B.; DAVIS, C.A.; NAIR, K.M. Serial cytological assay of micronucleus induction: a new tool to predict human cancer radiosensitivity. *Radiother Oncol., 41*: 139-142, 1996.

BHATTATHIRI, V.N.; BINDU, L.; REMANI, P.; CHANDRALEKHA, B.; NAIR, K.M. Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells. *Acta Cytol., 42(5)*: 1084-1090, 1998.

BLOT, W.J. Alcohol and cancer. *Cancer Res., 52(suppl.)*: 2119s-23s,1992.

BOFFETTA, P.; MASHBERG, A.; WINKELMANN, R.; GARFINKEL, L. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int. J. Cancer, 52*: 530-533, 1992.

BOUQUOT, J.E. & GORLIN, R. Leukoplakia, lichen planus and other oral keratoses in 23616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg., 61(4)*: 373-381, 1986.

BRASILEIRO FILHO, G.; PITTELA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, J.A. **Bogliolo - Patologia**. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1994. p. 989-992.

BREGMAN, A. A. Cytogenetic effects of ethanol in human leucocytes. *Env. Mut. Soc. Newsl.*, 1971 *apud* OBE, G. & RISTOW, H. Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat. Res., 65*: 229-59, 1979.

BRUSICK, D. **Principles of genetic toxicology**, 2 ed. New York. Plenum Press. 1987. p.4-5.

BUTLER, M.G.; SANGER, W.G.; VEOMETT, G.E. Increased frequency of sister-chromatid exchanges in alcoholics. *Mutat. Res., 85*: 71-6, 1981.

CANOVER, W.J. **Pratical Nonparametric Statistics**, 2 ed. New York. John Wiley. 1980.

CARLSON, J.G. Mitotic behaviour of induced chromosomal fragments lacking spindle attachments in neuroblasts of the grasshopper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 24*: 500-507, 1938 *apud* EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

CAREY, T.E.; WORSHAM, M.J.; VAN DYKE, D.L. Chromosomal biomarkers in the clonal evolution of head and neck squamous neoplasia. *J. Cell. Biochem., 17(Supp.F)*: 213-222, 1993.

CARVALHO, M.B. História natural do câncer da cavidade oral. *In*: RAPOPORT, A. **Câncer da boca**. São Paulo: Pancast, 1997. p. 17-29.

CARVALHO, M.B. & FAVA, A.S. Tumores malígnos da cavidade oral. *In*: BRANDÃO, L.G. & FERRAZ, A.R. **Cirurgia de cabeça e pescoço**. São Paulo: Roca, 1989. p. 239-309.

CASTELLI, E.; HRELIA, P.; MAFFEI, F.; FIMOGNARI, C.; FOSCHI, F.G.; CAPUTO, F.; CANTELLI-FORTI, G.; STEFANINI, G.F.; GASBARRINI, G. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. *Hepato-Gastroenterology, 46(27)*: 1664-1668, 1999.

CERQUEIRA, E.M.M. Danos genéticos em células esfoliadas do cérvice uterino: possível associação e interação entre hábito de fumar e progressão à transformação malígna. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1996. (Tese doutorado em Biologia-Genética).

CHOY, W.N.; BLACK, W.; MANDAKAS, G.; MIRRO, E.J.; BLACK, H.E. A pharmacokinetic study of ethanol inhibition of micronuclei induction by urethane in mouse bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res., 341*: 255-263, 1995.

CONFORTI-FROES, N.; EL-ZEIN, R.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; ZWISCHENBERGER, J.B.; AU, W.W. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res., 379*: 53-59, 1997.

CONNOR, T.H.; MEYNE, J.; MOLINA, L.; LEGATOR, M.S. A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. *Mutat. Res., 64*: 19-26, 1979.

CORMACK, D.H. **Ham's Histologia**, 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. p.5 e 35.

CORTÉS, F.; MATEOS, S.; ESCALZA, P. Cytotoxic and genotoxic effects of ethanol and acetaldehyde in root-meristem cells of Allium cepa. *Mutat. Res., 171*: 139-143, 1986.

DANIEL, A. & ROANE, D. Aneuploidy induced by ethanol during spermatogenesis in the chinese hamster. *Mutat. Res., 164*: 193, 1986.

DAVE, B.J.; TRIVEDI, A.H.; ADHVARYU, S.G. Role of areca nut consumption in the cause of oral cancers. A cytogenetic assessment. *Cancer, 70*: 1017-1023, 1992.

DE FLORA, S.; ZANACCHI, P.; CAMOIRANO, A.; BENNICELLI, C.; BADOLATI, G.S. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat. Res., 133*: 161-198, 1984.

DEL REGATO, J.A. **Cancer: diagnosis, treatment and prognosis**. 6 ed. St. Louis. CV Mosby, 1985. pp 1079.

DESAI, S.S.; GHAISAS, S.D.; JAKHI, S.D.; BHIDE, S.V. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosa cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett., 109*: 9-14, 1996.

DIAZ, S.; FONSECA, G.; FERNANDEZ, I. Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *Hereditas, 113*: 77-80, 1990.

DOPPENSHIMITT, E.; ZAHER, V.L.; GATTÁS, G.J.F. Mutagenic evaluations of micronuclei in civil architecture workers: can they be controls ? Anais do IV Congreso Latino Americano de Mutagenesis, Carcinogenesis y Teratogenesis Ambiental. Viña del Mar, Chile. p. 89. 1996.

DUFFAUD, F.; ORSIÈRE, T.; VILLANI, P.; PELISSIER, A.L.; VOLOT, F.; FAVRE, R.; BOTTA, A. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in health subjects and cancer patients. *Mutagenesis, 12(4)*: 227-231, 1997.

EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

FEINMAN,L. & LIEBER,C. S. Toxicity of ethanol and other components of alcoholic beverages. *Alcohol Clin. Exp. Res., 12*: 2-6, 1988.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res., 392*: 11-18, 1997.

FENECH, M. & MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res., 147*: 29-36, 1985.

FENECH, M. & RINALDI, J. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B_{12} and folic acid. *Carcinogenesis, 15(7)*: 1405-1411, 1994.

FENECH, M.; PEREPETSKAYA, G.; MIKHALEVICH, L. A more comprehensive application of the micronucleus techinique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations - Experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ. Mol. Mutagen., 30*: 112-118, 1997.

FRANCESCHI, S.; TALAMINI, R.; BARRA, S.; BARÓN, A.E.; NEGRI, E.; BIDOLI, E.; SERRAINO, D.; LA VECCHIA, C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res., 50*: 6502-6507, 1990.

FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; MIGLIORE, L. Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutat. Res., 320*: 23-29, 1994.

FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; CURADO, M.P.; PEREIRA, R.N.; SILVA, M.E.; FAVA, A.S.; TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int. J. Cancer, 43*: 992-1000, 1989.

GARCÍA-SAGREDO, J. Bioensayos de citogenética molecular. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Curso Internacional de Postgrado teórico-práctico: Avances en Mutagenesis Ambiental, Concepción - Chile, 28 Octubre - 1 Noviembre, 1996.

GAREWAL, H.S.; RAMSEY, L.; KAUGARS, G.; BOYLE, J. Clinical experience with the micronucleus assay. *J. Cell. Biochem., 17(Suppl.F)*: 206-212, 1993.

GATTÁS, G.J.F. Investigação Genética de ex-alcoólicos crônicos com especial referência às aberrações cromossômicas. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,1994. (Tese doutorado em Biologia-Genética).

GATTÁS, G.J.F. Mutagenicidade em trabalhadores expostos à combustíveis. São Paulo, Associação das Indústrias do Álcool e do Açúcar (Relatório de projeto de pesquisa) 1997.

GATTÁS, G.J.F.; LONGATO FILHO, A.; MAEDA, MYS; SANTOS, D.R.; DE ANDREA FILHO, A. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de *Papanicolaou* e *Feulgen-fast-green*. *Folha Med., 104(3)*: 57-59, 1992.

GATTÁS, G.J.F. & SALDANHA, P.H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of abstinent alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res., 21(2)*: 238-243, 1997.

GATTÁS, G.J.F.; WAJNTAL, A.; SALDANHA, P.H. *In vitro* cytogenetic effects of cannabidiol on human lymphocyte cultures. *Rev. Bras. Genet., 12*: 613-23,1989.

GHOSE, U.R. & PARIDA, B.B. Cytological study of exfoliated buccal mucosa cells of tribes in Orissa State (India) with high risk for oral cancer. *Indian J. Cancer, 32*: 95-99, 1995.

GOMÉZ-ARROYO, S.; DÍAZ-SÁNCHEZ, Y.; MENEZEZ-PÉREZ, M.A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.Y.; RODRIGUES JR., D.L. Analises citogenetico en una población de floricultores expuestos a plaguicidas. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 126, 1998.

GONSEBATT, M.E.; VEGA, L.; SALAZAR, A.M.; MONTERO, R.; GUZMÁN, P.; BLAS, J.; DEL RAZO, L.M.; GARCÍA-VARGAS, G.; ALBORES, A.; CEBRIÁN, M.E.; KELSH, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Cytogenetics effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res., 386*: 219-228, 1997.

GONZÁLEZ, M.V.; ALVAREZ, V.; PELLO, M.F.; MENÉNDEZ, M.J.; SUÁREZ, C.; COTO, E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J. Clin. Pathol., 51*: 294-298, 1998.

GRINSPAN, D. **Enfermedades de la boca.** Tomo IV. Buenos Aires. Mundi. 1982.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STRÖMBERG, U.; MIKOCZY, Z.; LANDO, C.; HANSTEEN, I.L.; MONTAGUD, A.H.; KNUDSEN, L.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C.; TINNERBERG, H.; BROGGER, A.; FORNI, A.; HÖGSTEDT, B.; LAMBERT, B.; MITELMAN, F.; NORDENSON, I.; SALOMA, S.; SKERFVING, S. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on cytogenetic biomarkers and health. *Mutat. Res., 405*: 171-178, 1998.

HARTMANN, A. & SPEIT, G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res., 346*: 49-56, 1995.

HASTAK, K.; LUBRI, N.; JAKHI, S.D.; MORE, C.; JOHN, A.; GHAISAS, S.D.; BHIDE, S.V. Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic damage in patients suffering from oral submucous fibrosis. *Cancer Lett., 116(2)*: 265-269, 1997.

HAYES, S.; GORDON, A.; SADOWSKI, I.; HAYES, C.R.K. Bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: Short term foward selection assay. *Mutat. Res., 130*: 97-106, 1984.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res., 18*: 187-190, 1973.

HEDDLE, J.A. & CARRANO, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res., 44*: 63-69, 1977.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen., 18*: 277-291, 1991.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res., 123*: 61-118, 1983.

HEDNER, K.; WADSTEIN, J.; MITELMAN, F. Increased sister chromatid exchange frequency in chronic alcoholic users. *Hereditas, 101*: 265-266, 1984.

HERMSEN, M.A.J.A.; JOENJE, H.; ARWERT, F.; WELTERS, M.J.P.; BRAAKHUIS, B.J.M.; BAGNAY, M.; WESTERVELD, A.; SLATER, R. Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer, 15*: 1-9, 1996.

HEUSER, V.D.; SILVA, J.; JUNDI, T.A.R.J.; MARINHO, J.R.; FREITAS, T.R.O.; ERDTMANN, B. O teste de micronúcleos no biomonitoramento de zona de mineração de carvão. *Genet. Mol., Biol., 21(Suppl.3)*: 105, 1998.

HÖGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm - A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutat. Res., 130*: 63-72, 1984.

HSU, T.C. Alcohol: a cocarcinogen in head and neck malignances. *Adv. Exp. Med. Biol., 320*: 35-37, 1992.

ILYINSKIKH, N.N.; EREMICH, A.V.; IVANCHUK, I.I.; ILYINSKIKH, E.N. Micronucleus test of erythrocytes and lymphocytes in the blood of the people living in the radiation pollution zone as a result of the accident at the Siberian chemical plant on April 6, 1993. *Mutat. Res., 361*: 173-178, 1996.

INCA, **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde. Coordenação de programas de controle do câncer, 1996.

INCA, Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil [online] Disponível na Internet via URL: www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa99. Arquivo capturado em 14/06/99.

IRANÇO, F.A.; SCHERER, K.D.; TERRA, N.R.; LEMOS, C.T. Análise de micronúcleos em peixes e mortalidade em microcrustáceos expostos a amostras de sedimento do Rio Caí. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 107, 1998.

JENSSEN, D.A.G. & RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat. Res., 75*: 191-202, 1980.

JONES, N.J.; KADHIM, M.A.; HOSKINS, P.L.; PARRY, J.M.; WATERS, R. ^{32}P-Postlabelling analysis and micronuclei induction in primary Chinese hamster lung cells exposed to tobacco particulate matter. *Carcinogenesis, 12(8)*: 1507-1514, 1991.

KABAT, G.C.; CHANG, C.J.; WYNDER, E.L. The role of tobacco, alcohol use, and body mass index in oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Epidemiol., 23(6)*: 1137-1144, 1994.

KÄFER, E. Disruptive effects of ethyl alcohol on mitotic chromosome segregation in diploid and haploid strains of *Aspergillus nidulan. Mutat. Res*., 135: 53-75, 1984.

KAUFMAN, M.H. Ethanol-induced chromosomal abnormalities at conception. *Nature, 302*: 258-260, 1983.

KAYAL,J.J.; TRIVEDI, A.H.; DAVE, B.J.; NAIR, J.; NAIR, U.J.; BHIDE, S.V.; GOSWAMI, U.C.; ADHVARYU, S.G. Incidence of micronuclei in oral mucosa of users of tobacco products singly or in various combinations. *Mutagenesis, 8(1)*: 31-33, 1993.

KHROMOV-BORISOV, N.N. & HENRIQUES, J.A.P. “Statistics in mind” for genetic toxicologists. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 165, 1998

KHROMOV-BORISOV, N.N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Good statistics practice (GSP) – Essential part of good genetic toxicologisy practice (GGTP). *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 165, 1998

KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat. Res., 392*: 1-4, 1997.

KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull’s Toxicology - The basic science of poisons**. 5 ed. N.Y. McGraw-Hill. 1996. p. 273-274.

KLIESCH, U. & ADLER, I.-D. Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. *Mutat. Res., 74*: 160, 1980.

KOLLER, P.C. Effects of radiation on pollen grain development, differentiation and germination. *Proc. R. Soc. Edinburgh B, 61*: 398-429, 1943 *apud* EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

KORTE, A.; WAGNER, H.M.; OBE, G. Simultaneous exposure of chinese hamster to ethanol and cigarette smoke: cytogenetic aspects. *Toxicology, 20*: 237-246, 1981 *apud* GATTÁS, G.J.F. Investigação Genética de ex-alcoólicos crônicos com especial referência às aberrações cromossômicas. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,1994. (Tese doutorado em Biologia- Genética).

KREPINSKY, A.B. & HEDDLE, J.A. Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-iunduced chromosomal aberrations. in: T. Ishihara and M.S. Sasaki (Eds.) Radiation-induced Chromosome Damage in Man. Alan R. Liss, New York, USA, pp. 103-109, 1983 *apud* EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

KRUSKAL, W.H. & WALLIS, W.A. The use of ranks in one criterion analysis of variance. *J. Amer. Statist. Assoc. 47*: 583-621, 1952.

KUCHERIA, K.; TANEJA, N.; MOHAN, D. Chromossomal aberrations; sister chromatid exchanges in chronic male alcoholics. *Indian J. Med. Res., 83*: 417-421, 1986.

KUHNEN, S.; FERREIRA, J.F.; AGOSTINI, J.M.S. Avaliação da frequência de hemócitos micronucleados em mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) expostos ao óleo diesel. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 99, 1998.

LEMASTERS, G.K.; LIVINGSTON, G.K.; LOCKEY, J.E.; OLSEN, D.M.; SHUKLA, R.; NEW, G.; SELEVAN, G.; YIIN, J.H. Genotoxic changes after low-level solvent and fuel exposure on aircraft maintenance personnel. *Mutagenesis 12(4)*: 237-243, 1997.

LEMOS, C.T.; RÖDEL, P.M.; TERRA, N.R.; ERDTMANN, B. Basal micronuclei frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl.3)*: 109, 1998.

LI, N.; SUN, Z.; HAN, C.; CHEN, J. The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 220 (4)*: 218-224, 1999.

LIEBER, C.S.; GARRO, A.; LEO, M.A.; MAK, K.M.; WORNER, T. Alcohol and cancer. *Hepatology, 6*: 1005-1019, 1986.

LILLY, L.J. Investigations *in vitro* and *in vivo*, of the effects of disulfiram (antabuse) on human lymphocyte chromossomes. *Toxicology, 4*: 331-40, 1975.

LIN, Y.; HO, I.; LEE, T. Ethanol and acetaldehyde potentiate the clastogenicity of ultraviolet light, methyl methanesulfonate, mitomycin C and bleomycin in chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res., 216*: 93-99, 1989.

LIPPMAN, S.M.; PETERS,E.J.; WARGOVIC, M.J.; STADNYK, A.N.; DIXON, D.O.; DEKMEZIAN, R.H.; LOEWY, J.W.; MORICE, R.C.; CUNNINGHAM,J.E.; HONG, W.K. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int. J. Cancer, 45*: 811-815, 1990.

LIVINGSTON, G.K.; REED, R.N.; OLSON, B.L.; LOCKEY, J.E. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ. Mol. Mutagen., 15*: 136-144, 1990.

MACFARLANE, G.J.; ZHENG, T.; MARSHALL, J.R.; BOFFETTA, P.; NIU, S.; BRASURE, J.; MERLETTI, F.; BOYLE,P. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Oral. Oncol., Eur. J. Cancer, 31B(3)*: 181-187, 1995.

MAC-GREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; HIATT, R.A.; PETERS, B.; TUCKER, J.D.; LANGLOIS, R.G.; JACOB, R.A.; JENSEN, R.H.; YAGER, J.W.; SHIGENAGA, M.K.; FREI, B.; EYNON, B.P.; AMES, B.N. 'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat. Res., 377*: 125-135, 1997.

MACHADO-SANTELLI, G.M.; CERQUEIRA, E.M.; OLIVEIRA, C.T.; PEREIRA, C.A.A.B. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat. Res., 322*: 203-208, 1994.

MACHADO-SANTELLI, G.M.; CERQUEIRA, E.M.; SANTOS, N.A.; SOUZA, A.; MEIRELES, J.; ANDRADE, F. Micronúcleos e estruturas nucleares atípicas. *Mol. Biol., 21 (Suppl. 3)*: 140, 1998.

MAIER, H.; DIETZ, A.; GEWELKE, U.; HELLER, W.-D.; WEIDAUER, H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin. Investig., 70*: 320-327, 1992.

MARCUCCI, G. Lesões pré-cancerosas. *In*: RAPOPORT, A. **Câncer da boca**. São Paulo: Pancast, 1997. p. 17-29.

MARSHALL, J.R. & BOYLE, P. Nutrition and oral cancer. *Cancer Causes Control,* 7: 101-111, 1996.

MASHBERG, A.; BOFFETTA, P.; WINKELMAN, R.; GARFINKEL, L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U. S. Veterans. *Cancer, 72(4)*: 1369-1375, 1993.

MATSUSHIMA, Y. Chromossomal aberrations in the lymphocytes of alcoholics and former alcoholics. *Neuropsychobiology, 17*: 24-9, 1987.

MATTER, B. & SCHMID, W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res., 12*: 417-425, 1971.

MEDRADO-FARIA, M.A.; ALMEIDA, J.W.R.; ZANETTA, D.M.T. Mortalidade por câncer na região urbano-industrial da Baixada Santista, São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Pública, 33(3)*: 255-261, 1999.

MIGLIORE, L.; VENTURA, L.; BARALE, R,; LOPRIENO, N.; CASTELLINO, S.; PULCI, R. Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastro-intestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. *Mutagenesis, 4(5)*: 327-334, 1989.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELMANN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromossome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res., 20*: 613-6, 1960.

MORONEY, M.J. **Facts from figures**. 3 ed. London. Penguin Books. 1956. p. 96.

MOURA, J.W. Avaliação do potencial mutagênico da quercetina, um dos princípios ativos da samambaia *Pteridium aquilinum*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1996 (Tese de doutorado em Biologia-Genética).

MUÑOZ, E.R. Effect of ethanol pretreatment on genetic damage induced by X-rays in *Drosophila melanogaster* sperm. *Mutat. Res., 232*: 3-10, 1990.

NAGAO, M; TAKAHASHI, Y.; WAKABAYASHI, K.; SUGIMURA, T. Mutagenicity of alcoholic bevereges. *Mutat. Res., 88*: 147-54, 1981.

NAIR, M.P.N.; KRONFOL, Z.A.; SCHWARTZ, S.A. Effects of alcohol and nicotine on cytotoxic functions of human lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol., 54*:395-409, 1990.

NAKANO, E. Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do *bayticol* em medula óssea de *Mus musculus*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1992. (Dissertação mestrado em Biologia-Genética).

NAKANO, T.MD & OKA, K. MD. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. *Cancer 68*: 517-523, 1991.

NIH Consens Statement. Health implications of smokeless tobacco use. [online] 6(1): 1-17, 1986. Arquivo capturado em 1998.

OBE, G. & ANDERSON, D. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens: genect effects of ethanol. *Mutat. Res., 186*: 177-200, 1987.

OBE, G.; GÖBEL, D.; ENGELN, H.; HERHA, J.; NATARAJAN, A.T. Chromossomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics. *Mutat. Res.,73*: 377-386, 1980.

OBE, G.; HERHA, J. Chromossomal damage in chronic alcohol users. *Humangenetik, 29*: 191-200, 1975.

OBE, G. & RISTOW, H. Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat. Res., 65*: 229-59, 1979.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W. Detection of field change in oral cancer using oral exfoliative cytologic study. *Cancer, 68*: 1611-1615, 1991.

OLIVEIRA, B.V. & OLIVEIRA, M.B.M. Prevenção do câncer de boca. *In*: RAPOPORT, A. **Câncer da boca**. São Paulo: Pancast, 1997. p. 153-168.

OCHI-LOHMANN, T.H.; OKAZAKI, K.; MADRUGA, M.R.; PEREIRA, C.A.B.; RABELLO-GAY, M.N. Radiosensitivity of blood lymphocytes from basocellular carcinoma patients, as detected by the micronucleus assay. *Mutat. Res., 357*: 97-106, 1996.

ÖZKUL, Y.; DONMEZ, H.; ERENMEMISOGLU, A.; DEMIRTAS, H.; IMAMOGLU, N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis 12(4)*: 285-287, 1997.

PATEL, R.K.; TRIVEDI, A.H.; JAJU, R.J.; ADHVARYU, S.G.; BALAR, D.B. Ethanol potentiates the clastogenicity of pan masala - an *in vitro* experience. *Carcinogenesis, 15(9)*: 2017-2021, 1994.

PINCU, M.; BASS, D.; NORMAN, A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutat. Res., 139*: 61-65, 1984.

PINDBORG, J.J; DAFTARY, D.K.; METHA, F.S. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in indian villagers. *Oral Surg., 43(3)*: 383-390, 1977.

PINDBORG, J.J.; REIBEL, J.; ROED-PETERSEN, B.; MEHTA, F. Tobacco-induced changes in oral leukoplakic epithelium. *Cancer, 45*: 2330-2336, 1980.

PINTOS, J.; FRANCO, E.L.; OLIVEIRA, B.V.; KOWALSKI, L.P.; CURADO, M.P.; DEWAR, R. Maté, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Southern Brazil. *Epidemiology, 5(6)*: 583-590, 1994.

POPP, W.; WOLF, R.; VAHRENHOLZ, C.; RADTKE, J.; SCHELL, C.; KRAUS, R.; BRAUKSIEPE, A.; NORPOTH, K. Sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of oral cancer patients seem to be influenced by drinking habits. *Carcinogenesis, 15(8)*: 1603-1607, 1994.

PRASAD, M.P.R.; MUKUNDAN, M.A.; KRISHNASWAMY, K. micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer, 31B(3):* 155-159, 1995.

RAMIREZ, A. & SALDANHA, P.H. Análise crítica de grupos controles no teste do micronúcleo em mucosa oral. *Genet. Mol. Biol., 21 (Suppl. 3)*: 140, 1998.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *In*: VARMA, A.K. **Oral Oncology** vol. VI. Macmillan, 1999. p.199-204.

RAO, D.; GANESH, B.; RAO, R.S.; DESAI, P.B. Risk assessment of tobacco, alcohol and diet in oral cancer - a case-control study. *Int. J. Cancer*: 58, 469-473, 1994a.

RAO, P.H.; SREEKANTAIAH, C.; SCHANTZ, S.P.; CHAGANTI, R.S.K. Cytogenetic analysis of 11 squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet. Cytogene. 77*: 60-64, 1994b.

REGEZI, F.A. & SCIUBBA, J.J. **Patologia bucal. Correlações clínico-patológicas***.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1991.

REY, M.; PALERMO, A.M.; MUÑOZ, E.R. Nondisjunction induced by ethanol in *Drosophila melanogaster* females. *Mutat. Res., 268*: 95-104, 1992.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células esfoliadas. *In*: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese - métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: SBG, 1991. p. 91-96.

RIEGER R.; MICHAELIS A.; GREEN M. M. **A Glossary of Genetics and Cytogenetics**. 3 ed. London. Allen and Unwin. 1968. pp. 507.

ROBERTS, D.M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytol., 41(4)*: 1008-1014, 1997.

ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. São Paulo. Atheneu. 1986. pp. 545.

SARTO, F. personal communication, January, 1988 *apud* TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res., 271*: 69-77, 1992.

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A.G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis, 2(1)*: 11-17, 1987.

SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; CANOVA, A.; RAIMONDI, F.; GHIOTTO, C.; FIORENTINO, M.V. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antiblastic therapy. *Mutat. Res., 228*: 157-169, 1990a.

SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; IANNINI, G.; CUPIRAGGI, A.R. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutat. Res., 244*: 345-351, 1990b.

SAX, K. Behaviour of X-ray-induced chromosomal aberrations in allium root tips. *Genetics, 26*: 418-425, 1941 *apud* EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

SCHANTZ, S.P. Head and neck oncology research. *Curr. Opin. Oncol., 6*: 265-271, 1994.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat. Res., 31*: 9-15, 1975.

SCHROEDER, T.M. Investigation of bone marrow smears. *In*: F. Vogel & G. Röhrborn. **Chemical mutagenesis in mammals and man**. Freiburg: Springer, 1970. p. 214-219.

SCHUBERT, I.; STURELID, S.; DÖBEL, P.; RIEGER, R. Intra-chromosomal distribution patterns of mutagen-induced *SCE*s and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*. *Mutat. Res., 59*: 27-38, 1979.

SCHULER, M.; RUPA, D.S.; EASTMOND, D.A. A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage *in vitro*. *Mutat. Res., 392*: 81-95, 1997.

SHKLAR, G. Patterns of keratinization in oral leukoplakia. *Arch. Otolaryngol., 87*: 400-404, 1965 *apud* TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res., 271*: 69-77, 1992.

SILVA AUGUSTO, L.G.; LIEBER, S.R.; RUIZ, M.A.; DE SOUZA, C.A. Micronucleous monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. *Environ. Mol. Mutagen.,29 (1)*: 46-52, 1997.

SMITH, G.; STANLEY, L.A.; SIM, E.; STRANGE, R.C.; WOLF, C.R. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *In*: **Cancer Surveys, Genetics and Cancer: A second look**. Imperial Cancer Res. Fund. vol. 25, 1995. p. 27-65.

SNELL, R.S. **Histologia Clínica**. Rio de Janeiro. Interamericana. 1985. p.61.

SOARES-VIEIRA, J.A.; CARDOSO, L.A.; ESTANQUEIRO, R.C.R.; ZAHER, V.L.; GATTÁS, G.J.F. Frequência de micronúcleos (MN) em trabalhadores expostos ao mercúrio. *Rev. Bras. Genet. (Supl) 16(3)*: 266, 1993.

SOBIN, L.H. & WITTEKIND, CH. **TMN classification of malignant tumours**. 5 ed. NY. Wiley-Liss. 1997.pp 227.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T-H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen., 31*: 183-191, 1998.

STICH, H.F.; CURTIS, J.R.; PARIDA, B.B. Aplication of the micronucleous test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer, 30*: 553-559, 1982a.

STICH, H.F.; STICH, W.; PARIDA, B.B. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at righ risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Lett., 17*: 125-134, 1982b.

STICH, H.F. & ROSIN, M.P. Quantitating the synergistic effects of smoking and alcohol consumption with the micronucleous test on human buccal mucosa cells. *Int. J. Cancer, 31*: 305-308, 1983a.

STICH, H.F. & ROSIN, M.P. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci., 407*: 93-105, 1983b *apud* SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A.G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis, 2(1)*: 11-17, 1987.

STICH, H.F. & ROSIN, M.P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett., 22*: 241-253, 1984.

STICH, H.F.; STICH, W.; ROSIN, M.P. The micronucleus test on exfoliated human cells. *In*: Muhammed, A. & von Borstel, R.C. **Basic and applied mutagenesis**. New York and London: Plenum Press, 1985. p. 337-342.

STICH, H.F.; ROSIN, M.P.; HORNEY, A.P.; MATHEW, B.; SANKARANARAYANAN, R. ; NAIR, M.K. Remission of oral leukoplasias and micronuclei in tobacco-betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int. J. Cancer, 42*: 195-199, 1988.

STICH, H.F.; ROSIN, M.P.; VALLEJERA, M.O. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet, 2*: 1024-1206, 1984.

SURRALLÉS, J.; AUTIO, K.; NYLUND, L.; JÄRVENTAUS, H.; NORPPA, H.; VEIDEBAUM, T.; SORSA, M.; PELTONEN, K. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis 18(4)*: 817-823, 1997.

TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S.; BARRA, S.; LA VECCHIA, C. The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. *Int. J. Cancer, 46*: 391-393, 1990.

TAYLOR, J.H. Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics, 43*: 515-529, 1958.

TEM CATE, A.R. **Histologia bucal, desenvolvimento, estrutura e função**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

THERMAN, E. & SUSMAN, M. **Cromosomas humanos. Estructura, Comportamiento y Efectos**. 3 ed. Ribeirão Preto, SBG. 1996. p.158-159.

THIERENS, H.; VRAL, A.; BARBÉ, M.; AOUSALAH, B.; DE RIDDER, L. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat. Res., 445*: 105-111, 1999.

THODAY, J.M. The effects of ionising radiations on the broad bean root. Part IX. Chromosome breakage and the lethality of ionising radiations to the root meristem. *Br. J. Radiol. 24*: 572-576, 1951 *apud* EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res., 392*: 5-10, 1997.

TITENKO-HOLLAND, N.; MOORE, L.E.; SMITH, M.T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res., 312(1)*: 39-50, 1994.

TITENKO-HOLLAND, N.; LEVINE, A.J.; SMITH M.T.; QUINTANA, P.J.E.; BOENIGER, M.; HAYES, R.; SURUDA, A.; SCHULTE, P. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutat. Res., 371*: 237-248, 1996.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISH, S.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleous assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.,388*: 85-95, 1997.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol., 134(8)*: 840-850, 1991.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res., 271*: 69-77, 1992.

TORRÉS-BUGARÍN, O.; DE ANDA-CASILLAS, A.; RAMÍREZ-MUÑOZ, M.P.; SÁNCHEZ-CORONA, J.; CANTÚ, J.M.; ZÚÑIGA, G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat. Res., 413*: 277-281, 1998.

TURNER, C. & ANDERSON, P. Is alcohol a carcinogenic risk ? *Br. J. Addict., 85*: 1409-15, 1990.

TUYNS, A.J. Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers. *Int. J. Cancer, 32*: 443-4, 1983.

VALVERDE, M.; LÓPEZ, M.C.; LÓPEZ, I.; SÁNCHEZ, I.; FORTOUL, T.I.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; ROJAS, E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen., 30*: 147-152, 1997.

VANDERKERKEN, K.; VANPARYS, PH.; VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis 4(1)*: 6-11, 1989.

VANPARYS, P.; VERMEIREN, F.; SYSMANS, M.; TEMMERMAN R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat. Res., 244*: 95-103, 1990.

VAN WYK, C.W.; STANDER, I.; PADAYACHEE,A.; GROBLER-RABIE, A.F. The areca nut chewing habit and oral squamous cell carcinoma in South African Indians. *S. Afr. Med. J., 83*: 425-429, 1993.

VÉGHELYI, P.V.; OSTOVICS, M.; KARDOS, G.; LESZTNER, L.; SZASZOVSZKY, S.I.; IMPREI, J. The fetal alcohol syndrome-symptoms and pathogenesis. *Acta. Pard. Acad. Scient. Hung., 19*: 171-189, 1978.

VÉGHELYI, P.V. & OSZTOVICS, M. The alcohol syndromes: The intrarecombinogenic effect of acetaldehyde. *Experientia, 34*: 195-6, 1978.

VIAGGI, S.; BONATTI, S.; ABBONDANDOLO, A. New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells. *Mutagenesis 2(5)*: 367-370, 1987.

VOGEL, E. & CHANDLER, J.L.R. Mutagenicity testing of cyclamate and some pesticides in Drosophila malanogaster. Experientia, 30: 621-623, 1974 *apud* GATTÁS, G.J.F. Investigação Genética de ex-alcoólicos crônicos com especial referência às aberrações cromossômicas. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,1994. (Tese doutorado em Biologia-Genética).

WARGOVICH, M.J.; GOLDBERG, M.T.; NEWMARK, H.L.; BRUCE, W.R. Nuclear aberrations as a short-term test for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. *J. Natl. Cancer Inst., 71*: 133-137, 1983 *apud* MIGLIORE, L.; VENTURA, L.; BARALE, R,; LOPRIENO, N.; CASTELLINO, S.; PULCI, R. Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastro-intestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. *Mutagenesis, 4(5)*: 327-334, 1989.

WASHINGTON,W.J.; CAIN, K.T.; CACHEIRO, N.L.A.; GENEROSO, W.M. Ethanol-induced late fetal death in mice exposed around the time of fertilization. *Mutat. Res., 147*: 205-210, 1985.

WYLLIE, A. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *In*: Bowen, I. & Lockshin R. **Cell death in Biology and Pathology**. London: Chapman and Hall, 1981. p. 1-34.

WRAY, A. & MCGUIRT, F. Smokeless tobacco usage associated with oral carcinoma. *Arch. Otolaryngol/Head and neck Surg., 119*: 929-33, 1993.

XUE, K.; WANG, S.; MA, G.; ZHOU, P.; WU, P.; ZHANG, R.; XU, Z.; CHEN, W.; WANG,Y. Micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea-drinking habits. *Int. J.Cancer, 50*: 702-5, 1992.

YAMAMOTO, K.I. & KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res., 71*: 127-131, 1980.

YING, C.J.; YAN, W.S.; ZHAO, M.Y.; YE, X.L.; XIE, H.; YIN, S.Y.; ZHU, X.S. Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomed. Environ. Sci., 10(4)*: 451-5, 1997.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 3rd. New Jersey. Upper Saddle River, Pratice Hall. 1996.

10 - APÊNDICES

APÊNDICE I - FICHA PARA REGISTRO ANAMNÉSTICO DOS ALCOÓLICOS

Caso _____ Reg. Cito _____ MN _____ HH _____ Data _____

Nome _____ Nasc. _____

Idade _____ Cor _____ Local de nasc. _____

Nacionalidade _____ Descendência _____

Endereço _____ Fone _____

Escolaridade _____ Profissão _____

Est civil _____ Filhos _____ Abortos _____

Cônjuge _____ Idade _____

Consangüinidade: ( ) sim ( ) não Tipo _____

HISTÓRICO DO ALCOOLISMO

Início do consumo: (___) anos / Término do consumo: (___) anos / Abstinência: (___) anos

Porque começou a beber _____

Tipo de bebida _____

Intensidade do consumo: + ( ) ++ ( ) +++ ( ) ++++ ( ) _____

_____

O que sentia quando bebia _____

Tratamentos clínicos / Hospitalizações _____

Problemas psiquiátricos _____

Terapia _____

Filiado ao AAA: sim ( ) não ( ) - Tempo de filiação _____

Medicação: sim ( ) não ( ) tipo: _____ tempo: (___) anos(__) meses

Raios X: sim ( ) não ( ) quantidade _____ tempo: (___) anos(__) meses

Observações: _____

_____

HISTÓRICO DO TABAGISMO

Início do tabagismo:(___) anos / Término do tabagismo:(___) anos / Abstinência:(___) anos

Tipo de cigarro / fumo _____

Intensidade do consumo: + ( ) ++ ( ) +++ ( ) ++++ ( ) _____

_____

Outras drogas _____

Observações _____

_____

HISTÓRICO DA NEOPLASIA

Tipo de neoplasia _____

Quando surgiu _____

Sintomas _____

Tratamento _____

Observações _____

_____

ANTECENDENTES FAMILIAIS :

Pai _____ Idade _____

Mãe _____ Idade _____

Consanguinidade: ( ) sim ( ) não Tipo _____

Filhos _____

_____

_____

Irmãos _____

_____

_____

Avós paternos _____

_____

Avós maternos _____

Tios paternos _____

Tios maternos _____

Primos paternos _____

Primos maternos _____

Antecedentes na familia da esposa _____

GENEALOGIAS : ™ alcoolismo / ™ tabagismo / ™ neoplasia

CONSENTIMENTO PÓS- INFORMADO

DECLARO PARA OS DEVIDOS FINS QUE APÓS TER SIDO DEVIDAMENTE ESCLARECIDO, ESTOU CIENTE E DE ACORDO EM PARTICULAR DA PESQUISA QUE ESTÁ SENDO REALIZADA NO HOSPITAL HELIÓPOLIS EM COLABORAÇÃO COM A FACULDADE DE MEDICINA DA USP. ESSA PESQUISA VISA AVALIAR EFEITOS MUTAGÊNICOS DO CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS EM CÉLULAS DE ESCAMAÇÃO DA MUCOSA ORAL E EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES DO SERVIÇO DE CABEÇA E PESCOÇO DO HOSPITAL HELIÓPOLIS.
A MINHA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA PODENDO SER SUSTADA A QUALQUER MOMENTO.

SÃO PAULO,_____ DE _____ DE 199__ .

_____

APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DO ALCOOLISMO

01 - Alguma vez você sentiu que deveria diminuir ou parar de beber ? Sim ( ) Não ( )
02 - Você tinha bom apetite quando consumia álcool em excesso ? Sim ( ) Não ( )
03 - Você tem facilidade em fazer amizades ? Sim ( ) Não ( )
04 - Você possuía um bom relacionamento com seus familiares ? Sim ( ) Não ( )
05 - As pessoas o incomodavam quando criticavam seu modo de beber ? Sim ( ) Não ( )
06 - Você dormia bem à noite ? Sim ( ) Não ( )
07 - Você costumava beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca ? Sim ( ) Não ( )
08 - Você mudava constantemente de emprego ? Sim ( ) Não ( )
09 - Você se sentia culpado pela maneira com que costumava beber ? Sim ( ) Não ( )
10 - Você costumava ter tremores nas mãos quando parava de beber ? Sim ( ) Não ( )
11 - Você se sentia fisicamente mal (vômitos, cólicas de estômago, etc.) quando bebia ? Sim ( ) Não ( )
12 - Você já teve *Delirium tremens*, isto é, já sentiu, viu ou ouviu coisas que não existem ? Sim ( ) Não ( )
13 - Quando você bebia, você tropeçava, cambaleava ou trançava as pernas ? Sim ( ) Não ( )
14 - Depois que você bebia, se sentia com muito calor e suando como se estivesse com febre ? Sim ( ) Não( )
15 - Você ficava desesperado por medo de não ter bebida na hora em que fosse precisar ? Sim ( ) Não ( )
16 - Você costumava ter uma garrafa de bebida sempre por perto ? Sim ( ) Não ( )
17 - Você já teve convulsão depois de beber ? Sim ( ) Não ( )
18 - Você bebia álcool antes do café da manhã ? Sim ( ) Não ( )
19 - Você já teve episódios prolongados de bebedeira (dois dias ou mais) que implicaram falta nas suas obrigações usuais ? Sim ( ) Não ( )
20 - Você já chegou a beber álcool não potável (para uso doméstico) ? Sim ( ) Não ( )
21 - Você já teve episódios de amnésia ? Sim ( ) Não ( )
22 - Você já teve problemas com a polícia, ou mesmo foi preso por causa do álcool? Sim ( ) Não ( )
23 - Você já teve dificuldades no trânsito associadas ao beber ? Sim ( ) Não ( )
24 - Para escrever você usa: a mão direita ( ), a mão esquerda ( ) ou ambas ( )
25 - Você já teve brigas físicas associadas ao beber ? Sim ( ) Não ( )
26 - Você perdeu muitos amigos por causa da bebida ? Sim ( ) Não ( )
27 - Você teve problemas no seu casamento, associado ao beber, que levaram ao divórcio ou a separação ? Sim ( ) Não ( )

APÊNDICE III- CONVENÇÕES PARA AS TABELAS "MÃE" E DE COMPUTAÇÃO

a) Caso - n°

b) Idade (i) - anos

c) Cor da pele (cp) - branco - B - 1; pardo ou mulato - M - 2; negro - N - 3

d) Consanguinidade dos pais (cns) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

e) Início do uso de fumo (if) - anos

f) Tempo de uso de fumo (tf) - anos

g) Fumo - frequência (ff) - ausente (não fuma) - 0; (+) - 1; (+ +) - 2; (+ + +) - 3; (+ + + +) - 4

h) Hospital psiquiátrico - internações (hp) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

i) Neoplasia - tipo (nt) - Retromolar (1) - RM; Soalho de boca (2) - SB; Gengiva (3) - GE; Corpo de língua (4) - CL; Borda de língua (5) - BL; Língua (6) - L; Amígdala (7) - A; Pilar Amigdalino (8) - PA; Loja Amigdalina (9) - LA; Glosso Amigdalino (10) - GA; Base de língua (11)

j) Neoplasia - região (nr) - Gengiva e área retromolar (1); Língua (ponta, borda e corpo) e soalho de boca (2); Região tonsilar - amigdalina (3); Base de língua (4)

k) Recorrência familial de neoplasia (rfn) - nenhum parente afetado - 0; um parente afetado - 1; dois parentes afetados - 2; três parentes afetados - 3; quatro parentes afetados - 4

l) Início da neoplasia (tc) - semanas

m) Início do consumo de álcool (ia) - anos

n) Fim do consumo de álcool (fa) - anos

o) Tempo do consumo de álcool (ta) - anos

p) Tempo de abstinência do álcool (tb) - meses

q) álcool - frequência (af) - (+) - 1; (+ +) - 2; (+ + +) - 3; (+ + + +) - 4

r) CAGE : parar de beber (c1) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

s) CAGE : incômodo - crítica (c2) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

t) CAGE : beber - manhã (c3) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

u) CAGE : sentir culpa (c4) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

v) CAGE - total (ct) - ausente (F ou -) - 0 ; presente (T ou +) - 1

w) Recorrência familial de alcoolismo (rfa) - nenhum parente afetado - 0; um parente afetado - 1; dois parentes afetados - 2; três parentes afetados - 3; quatro parentes afetados - 4

x) Grupo sanguíneo ABO (gs) - O - 0; A - 1; B - 2; AB - 3

y) Tipo sanguíneo (ts) - Rh (-) ou 0; (+) ou 1

1- Intensidade de tabagismo - (+) pouquíssimo (1-2 cigarros/dia); (++) menos que ½ maço (10 cigarros/dia); (+++) de ½ a 1 maço (10-20 cigarros/dia); (++++) mais que 1 maço (+30 cigarros/dia).

2- Intensidade de alcoolismo - (+) para cada dose de destilado ou para cada garrafa de cerveja ou para cada ½ garrafa de vinho por dia. Considerou-se ainda, (+) para quem bebe somente nos finais de semana e (++++) para quem bebe todos os dias.

3 - tempo de abstinências - meses

4 - tempo de uso de medicamentos - meses

5 - tempo de exposição à raios X - semanas

6 - tempo de início da neoplasia - semanas

7 - prejudicado - p

Tabela Mãe de Pacientes

Caso	Reg. de cito	Reg. de MN	Idade	Cor de pele	Escolari-dade	Profissão	Estado Civil	Consangui-nidade dos pais	Abortos
1	647	485	67	branco	primário completo	conferente	casado	-	1
2	648	486	56	branco	colegial incompleto	sargento da pm	casado	-	0
3	656	487	47	branco	primário incompleto	mecanico de caminhão	casado	p	0
4	657	488	50	branco	primário completo	Aux. de transporte	casado	p	0
5	674	489	49	branco	primário completo	comerciante	casado	p	0
6	686	496	52	pardo	colegial completo	tecnico de mecanica	casado	-	0
7	687	497	52	pardo	primário	motorista	casado	p	0
8	688	498	48	pardo	primário	encar. produção	casado	p	0
9	689	499	47	branco	primário completo	Ajudante de mecanico	casado	-	0
10	694	501	67	branco	analfabeto	cozinheiro	solteiro	-	0
11	707	584	55	branco	primário completo	comerciante	separado	-	0
12	708	585	37	branco	ginásio	serralheiro industrial	solteiro	-	0
13	709	586	57	branco	analfabeto	caseiro	casado	-	0
14	710	596	40	branco	primário completo	eletrecista	solteiro	-	0
15	719	622	48	pardo	analfabeto	pedreiro	casado	-	0
16	727	630	69	pardo	analfabeto	calcedeiro	casado	-	0
17	728	631	37	branco	colegial completo	comprador	solteiro	-	0
18	735	695	55	pardo	analfabeto	motorista	casado	-	2
19	739	821	50	branco	primário incompleto	pedreiro	casado	-	0
20	828	823	54	pardo	primário incompleto	pedreiro	solteiro	-	0
21	847	827	52	branco	primário incompleto	porteiro	casado	+	0
22	849	829	50	branco	ginásio completo	pedreiro	casado	+	0
23	855	834	54	branco	primário completo	motorista	casado	-	0
24	857	836	54	branco	primário completo	motorista	desquitado	-	0
25	858	837	42	pardo	analfabeto	pedreiro	viúvo	-	0
26	859	838	54	branco	ginásio incompleto	metanografista	casado	-	2
27	861	840	76	negro	analfabeto	agricultor	viúvo	-	0
28	p	841	61	branco	primário completo	segurança	casado	-	1
29	869	843	61	branco	primário completo	motorista	solteiro	-	0
30	p	877	49	branco	analfabeto	metalurgico	solteiro	-	0

Tabela Mãe de Pacientes

Filhos	Filhas	Total de Filhos	Medica-mentos	Tipo de medica-mentos	Tempo de uso de Medicamentos	Raio X	Local de Raio X	Quantidade de Raio X	Tempo de Raio X	Fumo início	Tempo de fumo	Tempo de abstinencia do fumo
p	p	5	+	analgesico	p	+	p	0	2	p	p	p
p	p	3	+	analgesico	p	+	Tórax	1	16	p	p	84
p	p	4	+	anti- inflamatório	p	-	p	0	0	18	29	0
p	p	4	-	p	p	+	Tórax	1	3	p	p	p
p	p	6	+	analgesico	p	+	Tórax	1	1	8	41	0
1	1	2	-	p	p	p	p	0	0	14	38	0
0	0	0	-	p	p	+	p	2	2	37	15	0
1	2	3	-	p	p	+	p	1	1	20	23	60
1	1	2	+	cardiaco	p	+	p	1	4	14	32	12
0	0	0	-	p	p	p	p	0	0	10	57	0
1	1	2	-	p	p	+	p	10	24	15	40	4
0	0	0	-	p	p	+	p	1	24	7	30	0
2	3	5	-	p	p	-	p	0	0	10	47	0
0	0	0	-	p	p	+	p	3	24	14	26	0
2	1	3	-	p	p	+	p	0	8	15	33	0
4	2	10	+	analgesico	p	-	p	0	24	8	61	0
3	0	3	+	anti-epiletico	10	+	p	6	24	9	28	0
3	3	6	-	p	p	+	Tórax	2	1	16	36	0
2	0	2	-	p	p	-	p	0	24	17	33	1
1	1	2	-	p	p	-	p	0	24	30	20	4
1	4	5	-	p	p	+	Tórax	2	24	16	34	4
1	1	2	-	p	p	+	Tórax	5	24	15	35	0
2	2	4	-	p	p	+	Tórax	2	24	7	47	0
2	2	4	-	p	p	+	abeça/Tóra	7	24	14	40	0
0	0	0	+	anti-depressivo	7	-	p	0	24	5	37	0
1	1	2	+	antiacido	6	+	Tórax	2	24	15	39	0
1	0	1	-	p	p	-	p	0	24	18	58	0
3	2	5	-	p	p	+	Tórax	2	24	17	42	24
0	0	0	-	p	p	+	Tórax	4	24	18	42	12
0	0	0	+	analgesico	2	-	p	0	24	15	34	0

Tabela Mãe de Pacientes

Tipo de fumo	Intensidade do fumo	Recorrência de fumo no pai	Recorrência de fumo na mãe	Recorrência de fumo nos filhos	Recorrência de fumo nos irmãos	Recorrência de fumo nos Avós	Recorrência de fumo nos Tios	Recorrência de fumo nos primos	Uso de Drogas	Terapia
p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	-
p	p	+	-	p	-	p	p	p	p	-
c/filtro	3	-	-	p	p	p	p	p	-	-
p	p	-	-	p	p	-	-	p	p	+
c/filtro	4	-	-	-	-	-	-	p	-	-
c/filtro	2	-	-	-	+	p	-	p	p	-
p	p	p	-	p	-	p	p	p	-	-
c/filtro	3	-	-	-	+	p	-	p	-	-
c/filtro	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-
charuto	4	+	-	p	-	p	+	-	-	-
c/filtro	4	+	-	+	+	p	p	p	-	-
c/filtro	4	+	+	p	+	-	p	p	-	-
cigarro palha	4	-	-	-	+	p	p	p	-	-
c/filtro	4	+	-	p	-	-	-	-	-	-
c/filtro	3	-	-	-	-	-	p	p	-	-
c/filtro	3	+	+	+	+	p	+	p	-	-
c/filtro	p	-	+	-	+	+	+	+	-	-
cigarro palha	1	-	-	+	-	-	+	p	-	-
c/filtro	4	+	+	-	+	p	p	-	-	+
c/filtro	3	-	-	-	-	p	p	p	-	-
c/filtro	4	-	-	-	-	p	p	+	-	-
c/filtro	3	-	-	-	+	+	+	p	-	-
c/filtro	3	-	-	+	-	p	-	-	-	-
c/filtro	2	-	-	-	-	-	+	-	-	-
c/filtro	4	+	+	p	+	p	+	+	+	-
c/filtro	4	-	-	-	-	+	+	+	-	-
vários tipos	3	+	-	-	+	p	+	+	-	-
c/filtro	3	-	-	+	+	+	-	+	-	-
c/filtro	3	-	-	p	+	p	p	p	-	-
c/filtro	3	+	-	p	+	p	p	p	-	-

Tabela Mãe de Pacientes

Hospital psiquiátrico	Tipo da neoplasia	Região da neoplasia	Inicío da neoplasia	Recorrência de neoplasia no pai	Recorrência de neoplasia na mãe	Recorrência de neoplasia nos filhos	Recorrência de neoplasia nos irmãos	Recorrência de neoplasia nos avós	Recorrência de neoplasia nos tios
-	língua	2	p	-	+	-	-	+	p
-	soalho de boca	2	p	-	-	p	-	p	p
-	soalho de boca	2	32	-	+	-	-	-	p
+	soalho de boca	2	p	-	-	p	p	-	+
-	soalho de boca	2	32	-	-	-	-	-	-
-	amígdala	3	12	-	-	-	-	p	-
-	borda de língua	2	24	p	-	p	-	p	p
-	gengiva	1	6	+	-	-	-	p	-
-	corpo de língua	2	8	-	-	-	-	-	+
-	retromolar	1	28	-	-	p	-	p	+
+	língua	2	20	-	-	-	-	p	p
+	pilar amigdalino	3	192	-	+	p	-	-	p
-	borda de língua	2	96	-	+	-	-	p	p
-	soalho de boca	2	16	-	-	p	-	-	-
-	loja amigdalina	3	16	-	-	-	-	-	p
-	retromolar	1	16	-	-	-	-	p	-
+	glosso amigdalino	3	48	-	-	-	-	+	-
-	retromolar	1	32	-	-	-	-	-	-
-	base de língua	4	8	-	-	-	-	-	p
-	loja amigdalina	3	20	+	-	-	-	-	-
-	borda de língua	2	20	-	-	-	-	-	-
-	soalho de boca	2	12	-	-	-	-	-	-
-	soalho de boca	2	24	-	+	-	+	p	-
-	soalho de boca	2	24	+	-	-	-	-	-
+	borda de língua	2	12	+	-	p	-	p	-
-	pilar amigdalino	3	16	-	-	-	-	-	-
-	retromolar	1	8	-	-	-	-	p	-
-	gengiva	1	8	-	-	-	-	-	-
-	borda de língua	2	24	-	-	p	-	p	p
-	base de língua	4	24	-	+	p	-	p	p

Tabela Mãe de Pacientes

Recorrência de neoplasia nos primos	Recorrência de neoplasia na família	Idade no inicío do uso de álcool	Idade no fim do uso de álcool	Tempo de consumo de álcool	Tempo de abstinencia do álcool	Tipo de bebida	Frequência/intensidade de álcool	Filiado ao AAA
p	1	15	64	49		destilados	4	p
p	0	10	0	43	0	desti/ferme	4	-
p	1	18	43	25	48	destilados	4	p
p	0	17	33	16	204	destilados	4	-
p	0	7	45	38	48	destilados	4	-
p	0	19	0	33	0	desti/ferme	2	+
p	0	43	47	4	60	destilados	4	-
-	0	28	0	20	0	desti/ferme	4	-
-	0	18	0	29	0	desti/ferme	1	-
-	0	11	0	56	0	desti/ferme	2	-
p	0	15	48	33	84	desti/ferme	4	-
p	0	15	33	18	48	destilados	2	-
p	1	10	0	47	0	destilados	1	-
-	0	20	35	15	60	desti/ferme	4	-
p	0	20	41	21	84	desti/ferme	1	-
p	0	10	65	55	48	desti/ferme	4	-
-	0	9	36	27	8	destilados	4	+
p	0	19	0	36	0	destilados	4	-
-	0	17	40	23	120	destilados	4	-
-	1	27	50	23	48	destilados	4	-
-	0	18	50	32	24	desti/ferme	4	-
-	0	20	46	26	48	desti/ferme	4	-
-	2	30	54	24	2	destilados	4	-
-	1	16	0	38	0	desti/ferme	4	-
-	1	12	42	30	3	destilados	4	-
-	0	17	45	28	108	desti/ferme	4	-
-	0	17	0	59	0	desti/ferme	2	-
-	0	17	0	41	0	fermentados	4	-
p	0	18	60	42	12	desti/ferme	3	-
p	1	20	49	29	1	fermentados	4	-

Tabela Mãe de Pacientes

Recorrência de alcolismo no pai	Recorrência de alcolismo na mãe	Recorrência de alcolismo nos filhos	Recorrência de alcolismo nos irmãos	Recorrência de alcolismo nos avós	Recorrência de alcolismo nos tios	Recorrência de alcolismo nos primos	Recorrência de alcolismo na familia	Tipo de sangue
+	-	-	+	-	p	p	2	p
+	-	p	+	p	p	+	2	p
+	-	p	p	+	+	+	1	p
+	-	p	p	+	-	p	1	p
+	-	+	+	+	+	p	3	B+
-	-	-	+	p	+	p	1	B+
p	-	p	-	p	p	p	0	O+
-	-	-	+	p	-	+	1	A+
+	-	-	-	+	-	+	1	O+
-	-	p	-	p	-	+	0	A+
-	-	+	+	p	p	p	2	A1+
-	-	p	+	+	p	p	1	O+
-	-	-	+	p	p	p	1	A1+
-	-	p	+	-	+	+	1	AB-
-	+	-	+	-	p	p	2	B+
+	-	+	+	p	+	p	3	O+
-	+	-	-	+	+	+	1	A-
-	-	+	-	+	-	p	1	A+
-	-	-	+	+	-	+	1	O+
+	-	-	-	-	-	-	1	O+
-	-	+	+	p	p	+	2	p
-	-	-	+	-	+	p	1	p
-	-	-	-	p	-	-	0	p
-	-	-	-	+	+	-	0	p
-	-	p	+	p	+	+	1	p
-	-	-	-	-	+	+	0	p
-	+	-	+	p	+	+	2	p
-	-	-	+	-	+	+	0	p
-	-	p	+	p	p	p	1	p
+	-	p	-	p	p	p	1	p

APÊNDICE V - Tabela de Computação dos Pacientes

c	i	cp	cns	fi	ft	ff	hp	nt	nr	rfn	tc	iu	fu	tu	ta	af	rfa	c1	c5	c7	c9	ct	gs	ts
1	67	1	0	p	p	p	0	6	2	1	p	15	64	49	36	4	2	0	0	0	0	0	p	p
2	56	1	0	p	p	p	0	2	2	0	p	10	0	43	0	4	2	1	0	1	1	1	p	p
3	47	1	p	18	29	3	0	2	2	1	32	18	43	25	48	4	1	1	1	1	0	1	p	p
4	50	1	p	p	p	p	1	2	2	0	p	17	33	16	204	4	1	1	1	1	1	1	p	p
5	49	1	p	8	41	4	0	2	2	0	32	7	45	38	48	4	3	0	0	1	0	0	2	1
6	52	2	0	14	38	2	0	7	3	0	12	19	0	33	0	2	1	1	1	0	0	1	2	1
7	52	2	p	37	15	p	0	5	2	0	24	43	47	4	60	4	0	1	0	1	0	1	0	1
8	48	2	p	20	23	3	0	3	1	0	6	28	0	20	0	4	1	0	0	0	0	0	1	1
9	47	1	0	14	32	3	0	4	2	0	8	18	0	29	0	1	1	p	0	0	0	p	0	1
10	67	1	0	10	57	4	0	1	1	0	28	11	0	56	0	2	0	1	0	0	1	1	1	1
11	55	1	0	15	40	4	1	6	2	0	20	15	48	33	84	4	2	1	1	1	0	1	1	1
12	37	1	0	7	30	4	1	8	3	0	192	15	33	18	48	2	1	1	1	1	1	1	0	1
13	57	1	0	10	47	4	0	5	2	1	96	10	0	47	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
14	40	1	0	14	26	4	0	2	2	0	16	20	35	15	60	4	1	1	0	1	0	1	3	0
15	48	2	0	15	33	3	0	9	3	0	16	20	41	21	84	1	2	1	0	1	0	1	2	1
16	69	2	0	8	61	3	0	1	1	0	16	10	65	55	48	4	3	1	0	1	0	1	0	1
17	37	1	0	9	28	p	1	10	3	0	48	9	36	27	8	4	1	1	0	0	1	1	1	0
18	55	2	0	16	36	1	0	1	1	0	32	19	0	36	0	4	1	1	0	1	0	1	1	1
19	50	1	0	17	33	4	0	11	4	0	8	17	40	23	120	4	1	0	1	1	1	1	0	1
20	54	2	0	30	20	3	0	9	3	1	20	27	50	23	48	4	1	1	0	1	1	1	0	1
21	52	1	1	16	34	4	0	5	2	0	20	18	50	32	24	4	2	1	1	1	1	1	p	p
22	50	2	1	15	35	3	0	2	2	0	12	20	46	26	48	4	1	1	0	0	1	1	p	p
23	54	1	0	7	47	3	0	2	2	2	24	30	54	24	2	4	0	1	1	0	0	1	p	p
24	54	1	0	14	40	2	0	2	2	1	24	16	0	38	0	4	0	1	1	0	1	1	p	p
25	42	2	0	5	37	4	1	5	2	1	12	12	42	30	3	4	1	1	1	1	1	1	p	p
26	54	1	0	15	39	4	0	8	3	0	16	17	45	28	108	4	0	1	0	0	1	1	p	p
27	76	3	0	18	58	3	0	1	1	0	8	17	0	59	0	2	2	1	0	0	1	1	p	p
28	61	1	0	17	42	3	0	3	1	0	8	17	0	41	0	4	0	1	0	0	0	0	p	p
29	61	1	0	18	42	3	0	5	2	0	24	18	60	42	12	3	1	0	1	0	0	0	p	p
30	49	1	0	15	34	3	0	11	4	1	24	20	49	29	1	4	1	1	0	1	0	1	p	p

APÊNDICE VI - FICHA PARA REGISTRO ANAMNÉSTICO DOS CONTROLES ABSTÊMIOS

Caso _____ Abst _____ MN _____ Data _____

Nome _____ Nasc. _____

Idade _____ Cor _____ Local de nasc. _____

Nacionalidade _____ Descendência _____

Endereço _____ Fone _____

Escolaridade _____ Profissão _____

Est civil _____ Filhos _____ Abortos _____

Cônjuge _____ Idade _____

Consangüinidade: ( ) sim ( ) não Tipo _____

Parentesco com outros indivíduos da pesquisa: ( ) sim ( ) não n°_____

A quanto tempo exerce a profissão ?_____

Tem outra ocupação além da atual ?_____

TIPO DE DIETA

Faz uso de bebidas alcoólicas ? ( ) sim ( ) não Já fez ? ( ) sim ( ) não

Início do consumo: (___) anos / Término do consumo: (___) anos / Abstinência: (___) anos

Porque começou a beber _____

Tipo de bebida _____

Intensidade do consumo: + ( ) ++ ( ) +++ ( ) ++++ ( ) _____

_____

Fuma ? ( ) sim ( ) não Já fumou ? ( ) sim ( ) não

Início do tabagismo:(___) anos / Término do tabagismo:(___) anos/ Abstinência:(___) anos

Tipo de cigarro / fumo _____

Intensidade do consumo: + ( ) ++ ( ) +++ ( ) ++++ ( ) _____

_____

Toma café ? ( ) sim ( ) não
Frequência: ( ) só pela manhã ( ) 3x ao dia ( ) várias

Toma chá ? ( ) sim ( ) não
Frequência: ( ) só pela manhã ( ) 3x ao dia ( ) várias

Medicação: sim ( ) não ( ) tipo: _____ tempo:(___) anos(__) meses

Raios X: sim ( ) não ( ) quantidade _____ tempo:(___) anos(__) meses

Observações: _____

CONSENTIMENTO PÓS- INFORMADO

DECLARO PARA OS DEVIDOS FINS QUE APÓS TER SIDO DEVIDAMENTE ESCLARECIDO, ESTOU CIENTE E DE ACORDO EM PARTICULAR DA PESQUISA QUE ESTÁ SENDO REALIZADA NA FACULDADE DE MEDICINA DA USP. ESSA PESQUISA VISA AVALIAR A AUSÊNCIA DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DO ÁLCOOL EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL DE PESSOAS NORMAIS QUE NÃO CONSOMEM BEBIDAS ALCOÓLICAS.
A MINHA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA PODENDO SER SUSTADA A QUALQUER MOMENTO.

SÃO PAULO,_____ DE _____ DE 199__ .

_____

Apêndice _ - Tabela Mãe Controles

Caso	Reg. de MN	Idade	Cor da Pele	Escolaridade	Profissão	Estado civil	Abortos	Filhos	Medicamentos
1	880	33	pardo	ginásio incompleto	construtor	casado	0	2	-
2	881	40	branco	primário incompleto	manutenção de jardim e piscina	casado	0	4	-
3	883	32	pardo	ginásio completo	manutenção de jardim e piscina	casado	0	3	+
4	885	41	branco	ginásio completo	construtor civil	casado	0	0	-
5	886	38	pardo	primário incompleto	prensista de máquinas	casado	0	2	-
6	887	52	branco	primário incompleto	vigilante	casado	1	5	-
7	889	34	branco	colegial incompleto	ministro evangélico	casado	0	1	-
8	890	50	pardo	ginásio incompleto	operador de máquinas	casado	0	4	+
9	891	33	branco	primário completo	operador de máquinas	casado	0	0	-
10	892	51	pardo	primário incompleto	tratador de água	casado	0	3	-
11	893	42	branco	colegial completo	industriário	casado	0	2	-
12	894	30	branco	colegial completo	auxiliar de contabilidade	casado	0	2	-
13	895	33	pardo	primário	tratador de água	casado	0	0	-
14	896	32	pardo	colegial	técnico em telecomunicações	casado	0	2	-
15	898	36	branco	colegial	serralheiro	casado	0	3	-
16	899	42	branco	colegial	encarregado de hidrometrônica	casado	0	4	-
17	900	35	pardo	ginásio completo	construtor	casado	0	3	-
18	901	29	branco	ginásio incompleto	manutenção de jardim e piscina	casado	0	0	-
19	902	31	pardo	primário completo	segurança	casado	0	2	-
20	903	28	pardo	ginásio completo	segurança	casado	0	2	-
21	906	50	branco	primário	manutenção geral	casado	0	8	-
22	907	40	branco	superior	engenheiro eletrônico	casado	0	2	-
23	908	33	branco	primário	mecânico	casado	0	1	-
24	909	64	negro	primário	jardineiro	casado	0	13	+
25	910	32	branco	primário	operador de máquinas abrasivas	casado	0	2	-
26	911	30	pardo	colegial	serviços gerais	solteiro	0	0	-
27	912	47	branco	ginásio	vendedor	casado	0	3	+
28	914	35	negro	primário	motorista	casado	0	4	-
29	915	36	branco	ginásio	pedreiro	casado	0	3	-
30	916	42	branco	colegial	escriturário	casado	0	5	+

Apêndice _ - Tabela Mãe Controles

(continuação)

Tipo de medicamento	Tempo de medicamento	Raio X	Quantidade de Raio X	Fumo	Fumo início	Tempo de fumo	Tempo de abstinência do fumo	Tipo de fumo	Frequência/intensidade de fumo	Uso de álcool	Início de uso de álcool	Fim do uso de álcool
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	18	2	240	com filtro	1	-	18	22
anti-gripal	p	-	0	-	15	2	180	com filtro	1	-	15	17
p	0	-	0	-	22	6	156	com filtro	1	-	17	29
p	0	-	0	-	20	4	168	com filtro	1	-	20	24
p	0	+	1	-	8	24	240	corda	3	-	20	32
p	0	-	0	-	17	1	192	com filtro	1	-	17	18
diurético	120	+	1	-	15	10	300	corda	1	-	15	25
p	0	+	1	-	0	0	0	p	0	-	17	32
p	0	-	0	-	17	2	240	palha	1	-	23	24
p	0	+	1	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	19	20
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	+	1	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	16	34	156	com filtro	1	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0
calmante	7	+	p	-	14	34	192	com e sem filtro	4	-	14	20
p	0	+	2	-	14	1	204	com filtro	1	-	14	18
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	14	18
corticóide	1	-	0	-	17	1	360	com filtro	1	-	0	0
p	0	-	0	-	0	0	0	p	0	-	17	20
p	0	+	2	-	0	0	0	p	0	-	17	19
antibiótico	1	-	0	-	0	0	0	p	0	-	0	0

Apêndice _ - Tabela Mãe Controles

(continuação)

Tempo de uso de álcool	Tempo de abstinência do álcool	Intensidade do uso de álcool	Tipo de bebida	Parentesco	Tempo de profissão	Outra profissão	Toma café	Frequência que toma café	Toma chá	Frequência que toma chá
0	0	0	p	-	204	não	+	3 vezes	-	p
4	216	1	fermentados	-	24	não	+	2 vezes	+	esporádica
2	180	1	desti/ferme	11	72	ajudante de obras	+	2 vezes	+	esporádica
12	144	1	desti/ferme	-	156	não	+	3 vezes	+	esporádica
4	168	1	desti/ferme	-	144	ajudante de obras	+	várias	+	esporádica
12	240	4	desti/ferme	-	p	não	+	3 vezes	+	esporádica
1	192	1	fermentados	-	96	não	+	várias	+	esporádica
10	300	1	destilados	4	60	não	-	p	+	1 vez
15	12	1	desti/ferme	-	24	não	+	1 vez	-	p
1	216	1	fermentados	-	156	jardineiro	+	várias	+	1 vez
0	0	0	p	-	96	churrasqueiro	+	raramente	+	raramente
1	120	1	fermentados	-	120	não	+	3 vezes	-	p
0	0	0	p	-	114	não	+	3 vezes	-	p
0	0	0	p	-	120	eletricista	+	3 vezes	+	1 vez
0	0	0	p	-	204	não	+	3 vezes	-	p
0	0	0	p	-	6	não	+	1 vez	-	p
0	0	0	p	-	240	não	-	p	-	p
0	0	0	p	-	48	não	+	1 vez	+	esporádica
0	0	0	p	-	12	caseiro	+	3 vezes	-	p
0	0	0	p	-	96	não	+	várias	-	p
0	0	0	p	p	p	p	+	3 vezes	-	p
0	0	0	p	-	228	editor	+	várias	+	raramente
0	0	0	p	9	192	eletricista	+	raramente	+	3 vezes
6	528	1	destilados	-	180	não	+	várias	-	p
4	168	1	desti/ferme	-	132	operador de outras máquinas	+	1 vez	+	1 vez
4	144	1	desti/ferme	-	144	não	+	1 vez	+	1 vez
0	0	0	p	-	24	não	-	p	+	1 vez
3	170	1	desti/ferme	-	14	manutenção de jardim	+	várias	+	raramente
2	156	1	desti/ferme	-	216	não	-	p	-	p
0	0	0	p	-	192	não	+	várias	+	1 vez

APÊNDICE VIII - COLORAÇÃO DE *FEULGEN*

A - Preparação do reativo de Schiff

1. Em 300 ml de água destilada fervente, adicionou-se 3g de fucsina básica (*Diam* da *Merk*),
2. Após a homogeneização da solução, esperou-se a temperatura baixar à 60º C,
3. Acrescentou-se à solução, 12 g de metabissulfito de sódio e dissolveu-se precipitado,
4. Filtrou-se a solução, à qual adicionou-se em seguida, 60 ml de HCl 1N,
5. Depois a solução foi bem agitada e permaneceu à temperatura ambiente, escuro, por 24 horas,
6. No dia seguinte, adicionou-se 1,5 g de carvão vegetal ativo, agitou-se e filtrou-novamente a solução,
7. Esse reativo transparente foi armazenado no escuro e na geladeira.

B - Preparação da solução de *Fast Green*

1. Dissolveu-se 0,5 g de *Fast Green* em 100 ml de etanol a 95%,
2. Essa solução verde escuro foi armazenada no escuro à temperatura ambiente.

11 - BIOGRAFIA

ANDRÉA RAMIREZ obteve os diplomas de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Físicas e Biológicas pela Organização Santamarense de Educação e Cultura (OSEC) em 1992. Professora da Rede Pública Estadual (PEB II) desde 1990 foi efetivada por Concurso Público em fevereiro de 2000.

Em 1995 a candidata afastou-se das atividades letivas e dedicou-se exclusivamente ao desenvolvimento desta dissertação com bolsa de auxílio financiada pelo CNPq até julho de 1997, quando então, continuou não somente esta pesquisa, como também ministrou aulas para alunos do Ensino Médio.

Desde 1994, a candidata participou de quinze congressos e reuniões científicas sobre a sua especialidade, oito dos quais internacionais, nos quais apresentou sete trabalhos com resultados de suas pesquisas. Em 1997, sob o título “Analise preliminar de micronúcleos em pacientes com carcinomas orais”, recebeu o prêmio “Jorge Fairbanks Barbosa” da Federação Sul Americana das Sociedades de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Em 1998, com o trabalho “*Micronuclei frequency in patients with oral carcinomas*”, foi premiada com “*Student Travel Award*” pela *Environmental and Mutagen Society* (EMS).

A candidata participou, ainda, de pesquisas conduzidas pelo Laboratório de Citogenética do IOF e auxilia em pesquisas na área de Saúde Ocupacional desenvolvidas também no IOF - FMUSP, desde 1998.

Trabalhos Publicados

a) Comunicações a Congressos

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Preliminary analysis of micronuclei in patients with oral carcinomas. Anais do IV Congreso Latino Americano de Mutagenesis, Carcinogenesis y Teratogenesis Ambiental. Viña del Mar, Chile. p. 88. 1996.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Análise preliminar de micronúcleos em pacientes com carcinomas orais. Anais do II Fórum Internacional de Pesquisa Básica e Clínica na Cirurgia do Câncer de Cabeça e Pescoço, Hospital Heliópolis, São Paulo. p. 61. 1997.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPPORT, A.; SALDANHA, P.H. Análise preliminar de micronúcleos em pacientes com carcinomas orais. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Gramado, RS. p.55, 1997. (prêmio "Jorge Fairbanks Barbosa").

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Micronuclei frequency in patients with oral carcinomas. *Environ. Mol. Mutagen., 31(Suppl.29)I:* 75, 1998. (premiado com "Student Travel Award").

RAMIREZ, A. & SALDANHA, P.H. Análise crítica de grupos controles no teste do micronúcleo em mucosa oral. *Genet. Mol. Biol., 21 (Suppl. 3)*: 140, 1998.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; SALDANHA, P.H. Micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol. Biol., 21(Suppl. 3) Suppl*: 91, 1998.

b) Artigos originais

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; CARVALHO, M.B.; RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *In*: VARMA, A.K. **Oral Oncology** vol. VI. Macmillan, 1999. p.199-204.