



VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONÇALVES

**BIOMARCADORES EM MUCOSA BUCAL DE POPULAÇÃO
EXPOSTA A POLUENTES ATMOSFÉRICOS**

SANTOS

2021

VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONÇALVES

**BIOMARCADORES EM MUCOSA BUCAL DE POPULAÇÃO
EXPOSTA A POLUENTES ATMOSFÉRICOS**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada à Programa de Stricto Sensu
de Saúde e Meio Ambiente da
Universidade Metropolitana de Santos,
para obtenção de título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF^a DR^a MIRIAN APARECIDA BOIM

SANTOS

2021

G63b Gonçalves, Vanessa Cristina de Branco

Biomarcadores em mucosa bucal de população exposta a poluentes atmosféricos. / Vanessa Cristina de Branco Gonçalves. – Santos, 2021.

88 f.

Orientador : Mirian Aparecida Boim
Dissertação (Mestrado Profissional), Universidade Metropolitana de Santos, Ciências da Saúde e Meio Ambiente, 2021.

1. Biomarcador. 2. Micronúcleos. 3. Mucosa bucal.
I. Título.

CDD 614

Biblioteca Central UNIMES

Angela M^a Monteiro Barbosa. CRB-8/7811



Universidade Metropolitana de Santos
Mantida pelo Centro de Estudos Unificados Bandeirante

FUNDADORA

PROF^a. Rosinha Garcia de Siqueira Viegas

MANTENEDOR

Prof. Rubens Flávio de Siqueira Viegas

REITORIA

PROF^a. Renata Garcia de Siqueira Viegas

Reitora

PROF^a. Elaine Marcílio Santos

Pró-Reitora Acadêmica

Prof. Rubens Flávio de Siqueira Viegas Júnior

Pró-Reitor Administrativo

Prof. Gustavo Duarte Mendes

Direção Acadêmica

Coordenador do Programa de Mestrado de Saúde e Meio Ambiente

**PROGRAMA DE STRICTO SENSU EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE DA
UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS**

**BANCA EXAMINADORA E ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO PROFISSIONAL**

A sessão pública de defesa da dissertação de mestrado profissional intitulada de “BIOMARCADORES EM MUCOSA BUCAL DE POPULAÇÃO EXPOSTA A POLUENTES ATMOSFÉRICOS”, da discente VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONÇALVES, orientada pela Prof^a. Dr^a. MIRIAN APARECIDA BOIM, foi realizada na data abaixo informada no anfiteatro do Programas de Stricto Sensu da Universidade Metropolitana de Santos, tendo o candidato cumprido, previamente, todas as exigências regimentais do Programa de Stricto Sensu de Saúde e Meio Ambiente, de acordo com a secretaria de pós-graduação da instituição. Realizada a apresentação da dissertação e arguição pública do candidato, os membros da banca em reunião fechada deliberam e emitiram parecer abaixo.

Banca examinadora:	Resultado:	Assinatura
Prof ^a . Dr ^a . Mirian Aparecida Boim	<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Prof. Dr. Edgar Maquigussa	<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Prof. Dr. Caio Vinícius Gonçalves Roman Torres	<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	

Homologação do resultado pelo presidente da banca examinadora:

Aprovado Reprovado

Prof^a. Dr^a. MIRIAN APARECIDA BOIM

Presidente da banca examinadora

Data da defesa: 24/08/2021

PROGRAMA DE STRICTO SENSU EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE DA UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS

FICHA DE CLASSIFICAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E DO PRODUTO

Título da dissertação: “BIOMARCADORES EM MUCOSA BUCAL DE POPULAÇÃO EXPOSTA A POLUENTES ATMOSFÉRICOS”

Linha de Pesquisa: LINHA PESQUISA I - Vigilância Epidemiológica, sanitária e doenças em cidades litorâneas com atividade portuária e petroquímica.

Projeto de Pesquisa do Orientador: Prof^a Dr^a Mirian Aparecida Boim

Produto(s) gerado(s): Publicação de artigo em revista indexada, Manual de boas condutas ambientais e seu impacto positivo sobre população exposta a poluentes ambientais, elaboração de um POP (procedimento operacional padrão)

Classificação da Produto:

Critério	Justificar
Inserção social e econômico prevista:	A detecção de alterações genéticas precoces poderá evitar e prevenir a evolução de doenças resultando em menor gasto com saúde em população de alto risco.
Impacto – potencial:	Prevenir doenças com grande impacto social e de elevados custos em saúde.
Aplicabilidade – Abrangência potencial:	A população a ser estudada abrangerá indivíduos adultos de ambos os sexos com idade a partir de 18 anos.
Aplicabilidade – Replicabilidade:	Trata-se de estudo com coleta simples e minimamente invasiva de amostras de células epiteliais da cavidade oral.
Inovação:	Contribuir para incorporar teste simples para detectar alterações genéticas em serviços de saúde pública com intenção de biomonitoramento de população expostas a contaminantes ambientais
Complexidade:	Apesar de importante, trata-se de estudo relativamente simples do ponto de vista execução.

[...] o que é em geral um problema para outras comunidades [foi] um desastre para Cubatão principalmente devido a fatores geográficos. Como os ventos são fracos, os poluentes na atmosfera não se dispersam rapidamente. E a direção dos ventos, do mar para a serra, significa que a poluição, quando é dispersa, cai na serra florestada. O resultado é o desnudamento [...] e a desestabilização geológica da serra, ameaçando enterrar os habitantes e as próprias indústrias que criaram o problema. [...] Por outro lado, a baixa velocidade dos rios, a maré, e a interrupção dos fluxos naturais por drenagem e aterros significam que os resíduos despejados na água não são facilmente levados ao mar aberto. O resultado é o envenenamento do estuário, com todo tipo de substância tóxica, incluindo mercúrio e outros metais pesados [...]. O homem não escapou ileso desse assalto ambiental. [...] os envenenamentos por benzeno [...], a incidência de doenças respiratórias e dermatológicas [...], além de acidentes de trabalho [...], são testemunhas eloquentes do sofrimento da população cubatense

Hogan., 1993

DEDICATÓRIA

*À **Lu**, sempre presente em minha vida, trilhando comigo todos os sonhos, me incentivando e mostrando que tudo é possível*

*Aos meus pais, **Mary Lúcia** e **Gilberto** (in memoriam), por todos os ensinamentos, que me ensinaram a respeitar a vida e as pessoas acima de tudo*

*As minhas irmãs **Vivian** e **Valéria**, eternas torcedoras*

*A minha sobrinha **Camila** e meu cunhado **Jerry** que completam a família e trazem felicidade*

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento a todos os Professores e funcionários da Pós-graduação em Ciências da saúde e meio ambiente da Universidade Metropolitana de Santos – Unimes.

Agradeço aos participantes do estudo pela confiança e disponibilidade, tornando possível a realização desta pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Prof^ª Dr^ª Mirian Aparecida Boim pela confiança depositada, por toda orientação necessária ao longo do curso e desse estudo, por todo direcionamento, paciência e ensinamentos técnicos e metodológicos.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas de mestrado pela amizade construída e por compartilhar conhecimentos durante esta caminhada.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do CEO – Praia Grande, pela ajuda no projeto piloto, pelo apoio e torcida sempre.

Minha eterna gratidão a Fran, Adélia, Gustavo e Mônica pela possibilidade das coletas, por todo apoio, incentivo, amizade e torcida para que esse projeto acontecesse.

Denise e Júlia, não poderia deixar de agradecer toda ajuda proporcionada por vocês, permitindo que as coletas acontecessem em Cubatão, as quais sem vocês não teria sido possível.

Gratidão a Maria Luíza e Marcão pelo apoio nos laboratórios da Unimes que possibilitaram o processamento das amostras e análises.

A todos os meus amigos e familiares que sempre torceram por mim.

Enfim, deixo minha gratidão a todos que participaram da construção deste trabalho ou que torceram pelo meu sucesso.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA - BIBLIOTECA DA UNIMES	2
BANCA EXAMINADORA E ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado Profissional	5
FICHA DE CLASSIFICAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E DO PRODUTO	6
DEDICATÓRIA	9
AGRADECIMENTOS	10
SUMÁRIO	11
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
3. HIPÓTESE	47
4. OBJETIVOS	47
5. METODOLOGIA	48
5.1 DECLARAÇÃO QUANTO À ADERÊNCIA DO ESTUDO AO PROTOCOLO DE BPC E REQUISITOS LEGAIS APLICÁVEIS	48
5.2 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	48
5.3 DESENHO DO ESTUDO A SER CONDUZIDO	49
5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO VOLUNTÁRIO	51
5.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	52
5.7 COLETAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	52
6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS E CRITÉRIOS	59
7. RESULTADOS	60
8. DISCUSSÃO	77
9. CONCLUSÕES	81
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
11. ANEXOS	87

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AGEM	Agência Metropolitana da Baixada Santista
BMCYT	Ensaio de Micronúcleo em Cítoma Bucal
BN	Células binucleadas
CC	Células com cromatina condensada
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRL	Células com cariólise
CRX	Células com Carriorexe
EMPLASA	Empresa Paulista de Planejamento Metropolitano
HUMNXL	Projeto internacional de Micronúcleo Humano em Células Bucais Esfoliadas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQAR	Índice de Qualidade do Ar
MNs	Células com micronúcleos
MP _{2,5}	Material inalável fino
MP ₁₀	Material particulado inalável
NB	Células com Brotos Nucleares
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NP	Células com broken egg
O ₃	Ozônio troposférico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PK	Células com picnose
PQAR	Programa de qualidade do ar
PRONAR	Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar
SO ₂	Dióxido de enxofre
µg/m ³	Micrograma por Metro Cúbico
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Infográfico da organização mundial de saúde -OMS.
- Figura 2** Vias de acesso e deposição de MP(material particulado).
- Figura 3** Índícios precoces a nível de material genético e celular (biomarcadores), com respectiva progressão crescente dos efeitos.
- Figura 4** Ciclo de reprodução celular.
- Figura 5** Processo de formação do MN em uma célula durante a mitose
- Figura 6** O epitélio de revestimento da mucosa bucal evidenciando a migração das células.
- Figura 7** Alterações nucleares e MNs - adaptado de Tolbert et al 1992
- Figura 8** Imagens fotográficas do próprio autor obtidas através de microscopia óptica com aumento de 400x.
- Figura 9** Diagrama adaptado de Thomas et al. (2009) para o ensaio BMCyt
- Figura 10** Células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal (bochecha) corada com a técnica de reação de Feulgen e contra coloração de fast green – 100x
- Figura 11** Mapa da cidade de Cubatão/ SP (Fonte: Google Maps – acesso em: 20/08/2020)
- Figura 12** Imagem do município de Cubatão com as indústrias do polo petroquímico
Fonte: Google Maps – acesso em: 20/08/2020
- Figura 13** Mapa da cidade de Praia Grande/SP (Fonte: Google Maps – acesso em: 20/08/2020)
- Figura 14** Fotomicrografia em 400x de Cromatina condensada – CC
- Figura 15** Fotomicrografia em 400x de Cariorrexe – CRX
- Figura 16** Fotomicrografia em 400x de picnose – PK
- Figura 17** Fotomicrografia em 400x de cariólise – CRL
- Figura 18** Fotomicrografia em 400x de binucleadas – BN
- Figura 19** Fotomicrografia em 400x de micronúcleos - MN
- Figura 20** Fotomicrografia em 400x de broto nuclear – NB

- Figura 21** Fotomicrografia em 400x de broken egg – NP
- Figura 22** Médias das idades obtidas, no grupo 1(exposto) e grupo 2(controle) - Teste T de Student (P=0,300)
- Figura 23** Gráfico boxplot com as diferenças de média para CC. Teste de Mann Whitney (P = 0,083).
- Figura 24** Gráfico boxplot com as diferenças de média para CRX. Teste de Mann Whitney (P = 0,269)
- Figura 25** Gráfico boxplot com as diferenças de média para PK. Teste de Mann Whitney (P = 0,063)
- Figura 26** Gráfico boxplot com as diferenças de média para CRL. Teste de Mann Whitney (P = 0,893)
- Figura 27** Gráfico boxplot com as diferenças de média para MN. Teste de Mann Whitney (P = 0,002)
- Figura 28** Gráfico boxplot com as diferenças de média para NB. Teste de Mann Whitney (P =0,005)
- Figura 29** Gráfico com diferenças de média para BN. Teste T de Student (P = 0,003)
- Figura 30** Gráfico boxplot com as diferenças de média para NP. Teste de Mann Whitney (P = 0,250)
- Figura 31** Fotomicrografia de alterações do grupo exposto, aumento de 400x, Coloração de Schiff/fast green. A- MN, B – NB, C – NP, D – BN, E – CC, F – CRX, G – PK e H – CRL
- Figura 32** Fotomicrografia de alterações do grupo controle, aumento de 400x, Coloração de Schiff/fast green. A- MN, B – NB, C – NP, D – BN, E – CC, F – CRX, G – PK e H – CRL

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padrões da qualidade do ar no Estado de São Paulo, D.E n°59113/2013.
Tabela 2	Índice de qualidade do ar (IQAR) - CETESB DE n°- 59113/2013.
Tabela 3	Análise descritiva com principais características demográficas dos indivíduos pertencentes ao estudo
Tabela 4	Somatório do n° de eventos para cada biomarcador (CC, PK,CRX,CRL)
Tabela 5	Análise descritiva com resultados das frequências dos biomarcadores de morte celular, com médias \pm desvio padrão
Tabela 6	Somatório do n° de eventos para cada biomarcador -MN,NB,BN,NP
Tabela 7	Análise descritiva representada por frequências dos biomarcadores de instabilidade no DNA com média \pm desvio padrão
Tabela 8	Análise de variância de Kruskal Wallis para grupos etários e biomarcadores.
Tabela 9	Teste de coeficiente de correlação de Spearman (não paramétrico) – idade/biomarcadores.
Tabela 10	Relatório da qualidade do ar, rede de monitoramento Cubatão (Parisi, Centro e Vale do Mogi). Período de 01/09/2020 – 20/10/2020 . Fonte: QUALAR/CETESB - acesso em10/03/2021.
Tabela 11	Relatório de ultrapassagens dos parâmetros: MP₁₀, NO₂, O₃ e SO₂ . Sistema de informação de qualidade do ar. Período de 01/09/2020 – 20/10/2020 - acesso em10/03/2021
Tabela 12	Relatório da qualidade do ar, rede de monitoramento Cubatão (Parisi, Centro e Vale do Mogi). Período de 20/12/2020 – 10/01/2021 . Fonte: QUALAR/CETESB - acesso em10/03/2021
Tabela 13	Relatório de ultrapassagens dos parâmetros: MP₁₀, NO₂, O₃ e SO₂ . Sistema de informação de qualidade do ar. Período de 20/12/2020 – 10/01/2021 - acesso em10/03/2021

Emissões industriais são um dos principais responsáveis pelas altas concentrações de poluentes atmosféricos em regiões de polo petroquímico. Populações que vivem sob influência direta de poluentes representam grande interesse em saúde pública, principalmente no que diz respeito à prevenção de muitas doenças, incluindo o câncer. Estudos anteriores demonstram os efeitos da poluição ambiental no processo de mutação e carcinogênese. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos dos poluentes atmosféricos, por meio da utilização do Teste de Micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. Foram investigadas alterações nucleares indicativas de instabilidade no DNA (micronúcleos, broto nuclear, binucleada, broken egg), degenerativas indicadoras de apoptose (cromatina condensada, cariorrexe, picnose), além de necrose (cariólise). Para a investigação foram analisadas células esfoliadas da mucosa jugal de 48 indivíduos adultos de ambos os sexos, sendo 24 indivíduos do grupo exposto composto por população residente no entorno do polo petroquímico da cidade de Cubatão e 24 indivíduos pertencentes ao grupo controle, residentes em Praia Grande, cidade não afetada diretamente pelos poluentes. O processamento das amostras coletadas foi realizado por meio de citologia de base líquida (CBL) e as análises citológicas foram feitas sob teste cego em 1000 células avaliadas para cada indivíduo. Os resultados mostraram que indivíduos residentes em região sob influência de maiores concentrações de poluentes atmosféricos apresentaram aumento na frequência de alterações nucleares. O grupo exposto apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nas variáveis indicativas de instabilidade no DNA: MNs (micronúcleos), NB (broto nuclear) e BN (binucleadas) indicando danos genotóxicos, entretanto, não foi encontrada diferença significativa nos indicadores de degeneração nuclear ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que a exposição a poluentes atmosféricos pode afetar potencialmente a integridade nuclear principalmente por meio de uma instabilidade no DNA de células epiteliais da mucosa bucal e esses dados podem ser usados como biomarcadores para os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos poluentes.

Palavras chaves: **Biomarcador; Micronúcleos; Mucosa bucal; Poluição do ar**

ABSTRACT

Industrial emissions are one of the main factors responsible for the high concentrations of air pollutants in regions of the petrochemical complex. Populations that live under the direct influence of pollutants represent a great interest in public health, especially concerning the prevention of many disease including cancer. Previous studies demonstrate effects of environmental pollution on the mutation and carcinogenesis process. Thus, the objective of this study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of air pollutants, through the use of the Micronucleus Test in exfoliated cells of the oral mucosa. Nuclear alterations indicative of DNA instability (micronuclei, nuclear sprout, binucleate, broken egg), degenerative alterations indicative of apoptosis (condensed chromatin, karyorhexis, pyknosis), in addition to necrosis (karyolysis) were investigated. For the investigation, exfoliated cells from the jugal mucosa of 48 adult individuals of both sexes were analyzed, with 24 individuals from the exposed group composed of a population residing in the vicinity of the petrochemical complex in the city of Cubatão and 24 individuals belonging to the control group, residing in Praia Grande, a city not directly affected by pollutants. The processing of the collected samples was carried out using liquid-based cytology (CBL) and cytological analyzes were performed under a blind test in 1000 cells evaluated for each individual. The results showed that individuals living in a region under the influence of higher concentrations of air pollutants showed an increase in the frequency of nuclear alterations. The exposed group showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the variables indicative of DNA instability: MNs (micronuclei), NB (nuclear bud) and BN (binucleate) indicating genotoxic damage, however, no significant difference was found in the indicators of nuclear degeneration ($p > 0,05$). The results suggest that the exposure to air pollutants may potentially affects nuclear integrity mainly through an instability in the DNA of oral mucosa epithelial cells and these data may be used as biomarkers for the citotoxic and genotoxic effects of pollutants.

Key words: Biomarkers; Micronuclei; Mouth mucosa; Air pollution

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição e Saúde

A poluição ambiental está relacionada a todos os fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a saúde dos indivíduos, sendo que o adequado controle desses fatores pode resultar na prevenção de doenças e na criação de ambientes propícios à saúde (WHO., 2018). A poluição ambiental representa um grande risco à manutenção da saúde. Ao reduzir os níveis de poluição, os países podem reduzir a morbidade e mortalidade por diversas doenças incluindo AVC (acidente vascular cerebral), câncer, pneumopatias crônicas e agudas etc (WHO., 2018). No universo de vários trabalhos desenvolvidos, foi relatada uma diversidade de doenças, demonstrando que o efeito da poluição ambiental, particularmente do ar, não afeta apenas o sistema respiratório, mas pode ser causador de risco para outros problemas como o baixo peso ao nascer, incidência e mortalidade por câncer, partos prematuros e anemia falciforme (Dapper et al., 2016). É a maior causa ambiental de doença e morte prematura, sendo responsável por volta de 9 milhões de mortes no mundo (Landrigan., et al 2018). Segundo dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (WHO., 2018), 23% de todas as mortes no mundo estão relacionadas ao meio ambiente, isto configura aproximadamente 12,6 milhões de mortes por ano (**figura 1**).

A atividade industrial constitui um fator que contribui drasticamente para a poluição ambiental (Cesar et al., 2013). Apesar de muitos avanços terem surgido nas últimas décadas para melhorar a qualidade do ar, os atuais níveis de poluição continuam sendo extremamente danosos para a saúde humana (Jasinski., et al 2011). Mesmo os poluentes ambientais estando abaixo dos níveis mínimos regulamentados, estes, continuam ocasionando efeitos na saúde das populações (Coronas et al., 2009).



Figura 1- Mortes ao redor do mundo em consequência à poluição ambiental. Organização Mundial da Saúde / Saúde Pública e Meio Ambiente. Infográficos sobre saúde pública, determinantes ambientais e sociais da saúde.

Fonte: WHO (<https://paho.org/en/documents/infographic> - acesso em 25/10/2019).

O órgão responsável por medições de qualidade do ar no estado de São Paulo é a CETESB. Todos os poluentes analisados, servem como indicadores e parâmetros do nível de qualidade do ar. Geralmente essas medições utilizam um grupo restrito de poluentes, escolhidos de acordo com a maior incidência em determinada região e os efeitos para a saúde da população.

Os poluentes atmosféricos mais frequentemente estudados são: MP (material particulado), SO₂ (dióxido de enxofre), CO (monóxido de carbono), O₃ (ozônio), COV (compostos orgânicos voláteis) e NO_x (óxidos de nitrogênio) (Cetesb). No entanto, a poluição do ar não depende apenas das fontes de emissão e das concentrações dos poluentes emitidas, mas também, das características dos fatores locais: como topografia e condições meteorológicas.

1.2 Polo Industrial de Cubatão

A região metropolitana da Baixada Santista (RMBS) compreende nove cidades: Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Praia Grande, São Vicente, Santos, Guarujá, Bertioga e Cubatão. Foi a primeira região metropolitana criada no Brasil, sem a participação de capital de Estado. Instituída pela Lei Complementar Estadual nº 815, em 30 de julho de 1996, a RMBS está completando mais de duas décadas de formação (AGEM). Na região encontra-se inserido o parque industrial de Cubatão, além do complexo portuário de Santos, este que é o maior e mais importante porto da América Latina (EMPLASA). A cidade de Cubatão situada a 8 metros de altitude, está disposta em um território que compreende 142,88 Km² e tem uma população estimada de 130.705 pessoas no ano de 2019 (IBGE). Localizada na base da serra do mar, a cidade de Cubatão obteve um papel de destaque no cenário da Baixada Santista, do estado de São Paulo e do Brasil devido a criação do parque industrial, que compreende dezenas de indústrias, sendo que duas, Cosipa e Ultrafertil possuem terminais portuários para recebimento e embarque de produtos.

No mundo em desenvolvimento, torna-se muito comum que certos locais recebam uma concentração de indústrias pesadas, designadas como polos industriais. A transformação de Cubatão em um dos maiores polos industriais, teve início com a instalação da refinaria de petróleo Presidente Bernardes e da siderúrgica Usiminas. Nos anos 1960, em torno dessas duas grandes indústrias, foram sendo instaladas outras indústrias, principalmente petroquímicas, de fertilizantes e de cimento, transformando o parque de Cubatão em um dos principais parques industriais da América Latina, com um grande sistema de transportes e infraestrutura (oleodutos, linhas de transmissão), e grande proximidade do porto de Santos. O processo de crescimento não levou em consideração as consequências para o meio ambiente e a saúde da população (Alves., 2013). Com o passar dos anos, sérios problemas ambientais foram detectados, com a poluição repetida e sistemática do meio ambiente, tendo como impacto, graves problemas para

o meio ambiente e em consequência para a saúde da população, tendo o seu início a partir da década de 80, onde aconteceram episódios alarmantes de poluição atmosférica (Pires., 2012).

A topografia da região caracterizada por vales, as correntes de ar, o regime de ventos na região do polo, aliadas a distribuição irregular da população no entorno do polo petroquímico, com seu parque industrial disperso de maneira aleatória pelo território, contribuem para a criação de microambientes muito peculiares incluindo a não dispersão adequada dos poluentes, resultando no aumento das suas concentrações e proporcionalmente aumento nos agravos de saúde, principalmente os respiratórios (Jasinski et al., 2011).

Alves. (2013) em seu estudo socioambiental, mostrou que quase um terço da população do município de Cubatão reside em áreas de alta vulnerabilidade socioambiental (com alta pobreza e alta exposição ao risco ambiental a poluentes), o que é bastante expressivo e preocupante.

Além dos problemas clássicos relacionados à poluição ambiental, tem sido verificado uma instabilidade do genoma em populações estudadas, levando a um aumento na procura de ferramentas efetivas que possam trazer rastreabilidade e monitoramento de variações genômicas relacionadas a exposições de contaminantes ambientais (Bonassi et al., 2009).

1.3 Mutagênese

A poluição ambiental além de promover doenças agudas e crônicas, pode causar danos reversíveis e irreversíveis ao DNA, levando a efeitos mutagênicos (Coronas., et al 2009). As lesões no DNA podem ocorrer em decorrência de estímulos endógenos ou como resposta à estímulos genotóxicos do ambiente, e o reparo dessas lesões se torna indispensável para a manutenção da integridade dos genes (Branzei e Foiani., 2008). O desenvolvimento de anormalidades cromossômicas está relacionado com perdas ou transcrições incorretas de informações genéticas. O DNA tem propriedades complexas que conferem capacidade de mutações, variações genômicas e combinações para manter o seu metabolismo funcional operante. A população humana está exposta a diferentes tipos de agentes químicos, físicos, biológicos, e os estudos procuram mostrar de que forma essas agressões podem afetar as populações e seus sistemas orgânicos (Branzei e Foiani., 2008). Desta forma a detecção precoce de alterações genômicas, antes da manifestação clínica, pode trazer incontestáveis benefícios para a população exposta a poluição ambiental.

Muitos estudos foram realizados nas últimas décadas para determinar possíveis instabilidades dos genes através de diversas técnicas, sendo que uma das mais difundidas e adotadas para avaliar mutagenicidade em populações expostas é a investigação da frequência de micronúcleos (MNs) em linfócitos do sangue periférico, em células epiteliais, eritrócitos e fibroblastos (Bonassi et al., 2009).

MNs são pequenas estruturas extranucleares que contém material genético em seu interior e são envolvidos por membrana nuclear, sendo menores que o núcleo celular principal (Tolbert et al., 1992; Carrard et al., 2007; Thomas et al., 2009). É um mecanismo que confere instabilidade genômica para a célula, podendo ser decorrente de alterações cromossômicas espontâneas endógenas ou por influências ambientais (Carrard et al., 2007). MNs são considerados biomarcadores de efeito que podem aparecer após exposição a estressores ambientais configurando genotoxicidade nas moléculas de DNA, importante ferramenta para o monitoramento biológico individual ou populacional (Moore et al., 2004). Se caracterizam por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não estão incorporados ao núcleo principal da célula, e aparecem após o processo de mitose, portanto se originam em processos de alterações cromossômicas durante a divisão celular (Bonassi et al., 2011; Fenech et al., 2011). Assim, a presença de MN pode ser utilizada como um biomarcador de dano genotóxico (Bonassi et al., 2011).

MNs podem ser detectados em diversos tipos celulares incluindo as células epiteliais da mucosa bucal. Eles aparecem em células esfoliadas da mucosa bucal e representam o reflexo da migração dessas células da camada basal do epitélio, local onde ocorre a divisão mitótica e consequente formação das células alteradas, para a periferia do epitélio bucal, onde são esfoliadas como um processo de renovação contínuo (Stich et al., 1982).

As células epiteliais esfoliadas da mucosa presente na cavidade bucal podem ser obtidas por raspagem, e desta forma são facilmente coletadas, através de método pouco invasivo, simples, indolor, constituindo uma excelente ferramenta para possibilitar o monitoramento de populações expostas a efeitos dos poluentes ambientais. Essas células epiteliais são submetidas a um método conhecido como citologia .

A citologia esfoliativa consiste em um método que está fundamentado na análise microscópica das características morfológicas de um pequeno conjunto de células de um indivíduo, sendo empregada e bastante utilizada com sucesso em prevenção e diagnóstico de

câncer do colo do útero. A citologia convencional e a citologia de base líquida (CBL) configuram as técnicas mais utilizadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MONITORAMENTO DO AR

Os poluentes do ar são divididos em dois grupos, os chamados poluentes primários, que são emitidos diretamente pelas fontes poluidoras e os poluentes secundários, que são provenientes das reações que acontecem entre um poluente primário e outras substâncias presentes na atmosfera, geralmente tendo como catalisador: a radiação solar (Cetesb).

As emissões de poluentes industriais na região do polo industrial de Cubatão, aliada a condições climáticas e topográficas da cidade que não favorecem a dispersão dos poluentes, configuram um problema de saúde humana e ambiental. Concentrações elevadas dos poluentes atmosféricos representam riscos e degradam o meio ambiente (Cetesb., 2019). São inúmeros os problemas ocasionados pela poluição atmosférica, o monitoramento do ar no estado de São Paulo realizado pela CETESB, permite um acompanhamento dos padrões de qualidade, e o ar de Cubatão diferente de outras regiões urbanas, tem as fontes de emissões principalmente nas indústrias (Cetesb., 2020).

O mecanismo de monitoramento do ar foi considerado decisivo nas políticas de controle ambiental da poluição, por possibilitar a mensuração dos níveis de poluentes através de suas concentrações, permitindo um acompanhamento da qualidade do ar (Souza e Santos, 2018).

A resolução federal datada de 15/06/1989 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabeleceu o programa de controle da qualidade do ar no âmbito nacional (PRONAR). Esse programa constitui tem como objetivo promover a gestão ambiental favorecendo o bem-estar da sociedade e do meio ambiente, descrevendo estratégias para o monitoramento da qualidade do ar e propondo padrões nacionais para estabelecer os índices de qualidade do ar. Ainda na resolução, foram criadas ferramentas para facilitar e auxiliar no cumprimento dos padrões estabelecidos (Brasil., 1989). Essa resolução foi complementada pela resolução publicada em 28 de junho de 1990, onde se definem os padrões de qualidade do ar, as concentrações dos poluentes atmosféricos, definição de padrões primários e secundários. Os primários estão relacionados a ultrapassagem das concentrações estabelecidas e esses aumentos

causam danos à saúde, enquanto os padrões secundários representam as concentrações mínimas que podem causar efeitos e agravos a saúde (Brasil., 1990).

São 2 os objetivos básicos da rede de monitoramento do ar: verificar o grau de exposição de determinada população aos poluentes atmosféricos, embasado nos princípios de saúde pública e verificar a eficácia do monitoramento acompanhando a evolução dos padrões e realizando aprimoramentos quando necessário. O índice de qualidade do ar (IQAR) foi criado para facilitar a divulgação dos dados. A resolução CONAMA n° 491/18 traz os poluentes que fazem parte do IQAR e os valores das concentrações dos poluentes que classificam o ar como “boa” são os valores recomendados pela organização mundial de saúde (WHO), que através de um guia estabeleceu os valores considerados ideais para a saúde humana. Os poluentes que fazem parte do índice são: MP₁₀ (material particulado), MP_{2,5} (material inalável), O₃ (ozônio), CO (monóxido de carbono), NO₂ (dióxido de nitrogênio) e SO₂ (dióxido de enxofre) (Brasil., 2018; Cetesb; WHO., 2006).

O monitoramento da qualidade do ar no estado de São Paulo iniciou-se pela região metropolitana da cidade de São Paulo no ano de 1972, com 14 estações de monitoramento manuais e apenas dois poluentes tinham suas concentrações monitoradas: fumaça preta e dióxido de enxofre (SO₂). O estado estabeleceu padrões para a qualidade do ar inicialmente em 1976, através do decreto estadual n° 8468/76. Em 1981, com o início da utilização de estações automáticas houve um salto qualitativo com o aumento dos poluentes monitorados: MP₁₀ (material particulado inalável), SO₂ (dióxido de enxofre), ozônio (O₃), óxidos de nitrogênio – (NO, NO₂ e NO_x), monóxido de carbono – (CO), além dos parâmetros meteorológicos como direção e velocidade do vento, temperatura e umidade relativa do ar (Cetesb). Em 2008, uma revisão dos padrões de qualidade do ar foi realizada, baseando-se em diretrizes preconizadas e estabelecidas pela OMS. Com essa revisão surgiu o decreto estadual 59113/2013, que estabeleceu metas como valores intermediários a serem cumpridos por etapas e padrões finais, a fim de se atingir as recomendações da OMS. Essas metas gradativas e progressivas foram descritas observando-se alguns critérios importantes: 1) Metas intermediárias (MI) – são medidas de valores temporários que precisam ser atingidos com o intuito de redução da emissão de poluentes pelas fontes emissoras fixas ou móveis. São 3 as etapas intermediárias, e está em vigor desde 24 de abril de 2013 a MI 1. 2) Padrões finais (PF) – medidas estabelecidas para que a saúde da população seja preservada ao máximo dos efeitos indesejáveis da poluição atmosférica.

A **tabela1** demonstra os padrões de qualidade do ar (PQAR) estabelecidos no DE nº 59113/2013, em vermelho representado o padrão vigente:

Poluente	Tempo de amostragem	MI 1	MI 2	MI 3	PF
		partículas inaláveis (MP10)	24 horas	120	100
	MAA	40	35	30	20
partículas inaláveis finas (MP2,5)	24 horas	60	50	37	25
	MAA	20	17	15	10
dióxido de enxofre (SO2)	24 horas	60	40	30	20
	MAA	40	30	20	-
dióxido de nitrogênio (NO2)	1 hora	260	240	220	200
	MAA	60	50	45	40
ozônio (O3)	8 horas	140	130	120	100
monóxido de carbono (CO)	8 horas	-	-	-	9 ppm
fumaça (FMC)	24 horas	120	100	75	50
	MAA	40	35	30	20
partículas totais em suspensão *	24 horas	-	-	-	240
(PTS)	MGA	-	-	-	80
Chumbo **	MAA	-	-	-	0,5

Tabela 1 – Padrões da qualidade do ar no Estado de São Paulo, DE nº59113/2013 (fonte: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/padrees-de-qualidade-do-ar/>)

1. MAA – média aritmética anual 2. MGA – média geométrica anual

* parâmetros auxiliares a serem utilizados a critério da CETESB **monitorado apenas em áreas específica

Na **tabela 2** foi disponibilizado os parâmetros contemplados pelo IQAR, cada poluente recebeu um índice obtido através de um cálculo que classifica o ar em termos de qualidade:

Qualidade	Índice	MP10 (µg/m ³) 24h	MP2,5 (µg/m ³) 24h	O3 (µg/m ³) 8h	CO (ppm) 8h	NO2 (µg/m ³) 1h	SO2 (µg/m ³) 24h
N1 Boa	0 – 40	0 – 50	0 – 25	0 – 100	0 – 9	0 – 200	0 – 20
N2 Moderada	41 – 80	>50 – 100	>25 – 50	>100 – 130	>9 – 11	>200 – 240	>20 – 40
N3 Ruim	81 – 120	>100 – 150	>50 – 75	>130 – 160	>11 – 13	>240 – 320	>40 – 365
N4 Muito Ruim	121 – 200	>150 – 250	>75 – 125	>160 – 200	>13 – 15	>320 – 1130	>365 – 800
N5 Péssima	>200	>250	>125	>200	>15	>1130	>800

Tabela 2 – Índice de qualidade do ar (IQAR) - CETESB (DE nº 59113/2013). Fonte: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/padroes-de-qualidade-do-ar/>

O grupo de poluentes escolhidos para o monitoramento ocorreu em razão da frequência com que ocorrem, da sua importância e impactos conhecidos na saúde humana, e dos recursos disponíveis para o seu acompanhamento e monitoramento (Cetesb). A concentração dos poluentes é afetada não só pela sua emissão na atmosfera, mas também pela dispersão que é diretamente influenciada pelas condições meteorológicas, com destaque para os ventos e a inversão térmica, além das topográficas. A dispersão desse ar contaminado se torna mais crítica nos meses que compreende o período do inverno, pois uma massa de ar quente aprisiona a massa de ar frio mais próximo da superfície, impedindo que os poluentes atinjam camadas mais altas na atmosfera (Cetesb., 2015; Cetesb; De Los A Gutierrez et al., 2020).

2.1.1 Material particulado (MP)

O MP é o poluente mais estudado, formado por pequenas partículas de natureza sólida ou líquida, composto por uma mistura complexa de substâncias, que se encontram em suspensão e dispersos pela atmosfera devido ao seu pequeno tamanho. Essas partículas são classificadas de acordo com o seu diâmetro, configurando assim o seu perfil aerodinâmico de dispersão. Sob essa denominação de material particulado temos as partículas totais em suspensão (PTS), fumaça (FMC), partículas inaláveis (MP10), partículas inaláveis finas (MP2,5) e partículas ultrafinas (MP0,1). O MP pode ser de natureza antropogênica ou natural. As fontes antropogênicas principais estão relacionadas a atividades industriais, queima de biomassa e combustíveis fósseis, tráfego acentuado de veículos automotores; enquanto as fontes naturais podem ser de erupção vulcânica, ressuspensão de poeira, dispersão de processos biológicos (pólen), incêndios florestais, entre outros (Cetesb; WHO., 2006; Brito et al., 2018). O tamanho da partícula está diretamente relacionado com a dimensão dos agravos provocados à saúde humana. Quanto menor o diâmetro dessas partículas, maiores os efeitos provocados. As partículas com diâmetro entre 2,5 /10µm são representadas pelas partículas inaláveis (MP10), enquanto as partículas que possuem diâmetro menores que 2,5µm são as partículas inaláveis finas (MP2,5), enquanto as partículas ultrafinas (MP0,1) possuem diâmetro menor que 0,1µm. As partículas com maiores diâmetros, as partículas inaláveis, podem ser removidas da atmosfera por um processo de sedimentação e precipitação em pouco tempo após a sua emissão e formação, enquanto o material inalável fino por possuir menor diâmetro e menor peso podem permanecer por dias em suspensão na atmosfera, podendo ser levado para regiões distantes do seu local de formação (WHO.,2006). Muitos componentes estão presentes na fração inalável do MP podendo agir no trato respiratório e promover aumentos de doenças do trato respiratório e carcinogênicas (Brito et al., 2018). O MP2,5 (inalável fina) foi associada com doenças do trato respiratório e do sistema cardiovascular, através de inflamação que acontece de forma sistêmica, devido a propagação do MP para a circulação sanguínea (Loxhan et al., 2019). O MP com maior diâmetro aerodinâmico entra no trato respiratório alto, sendo facilmente removidos pelos mecanismos de defesa do organismo, como a tosse, o movimento ciliar e a fagocitose, contudo as partículas menores (finas e ultrafinas) podem chegar aos alvéolos e atingir a corrente sanguínea através das trocas gasosas (hematose), contudo as partículas ultrafinas tem um poder de penetração maior e conseqüentemente atingem a corrente sanguínea mais facilmente (Cetesb, ; WHO., 2006) (**figura 2**).

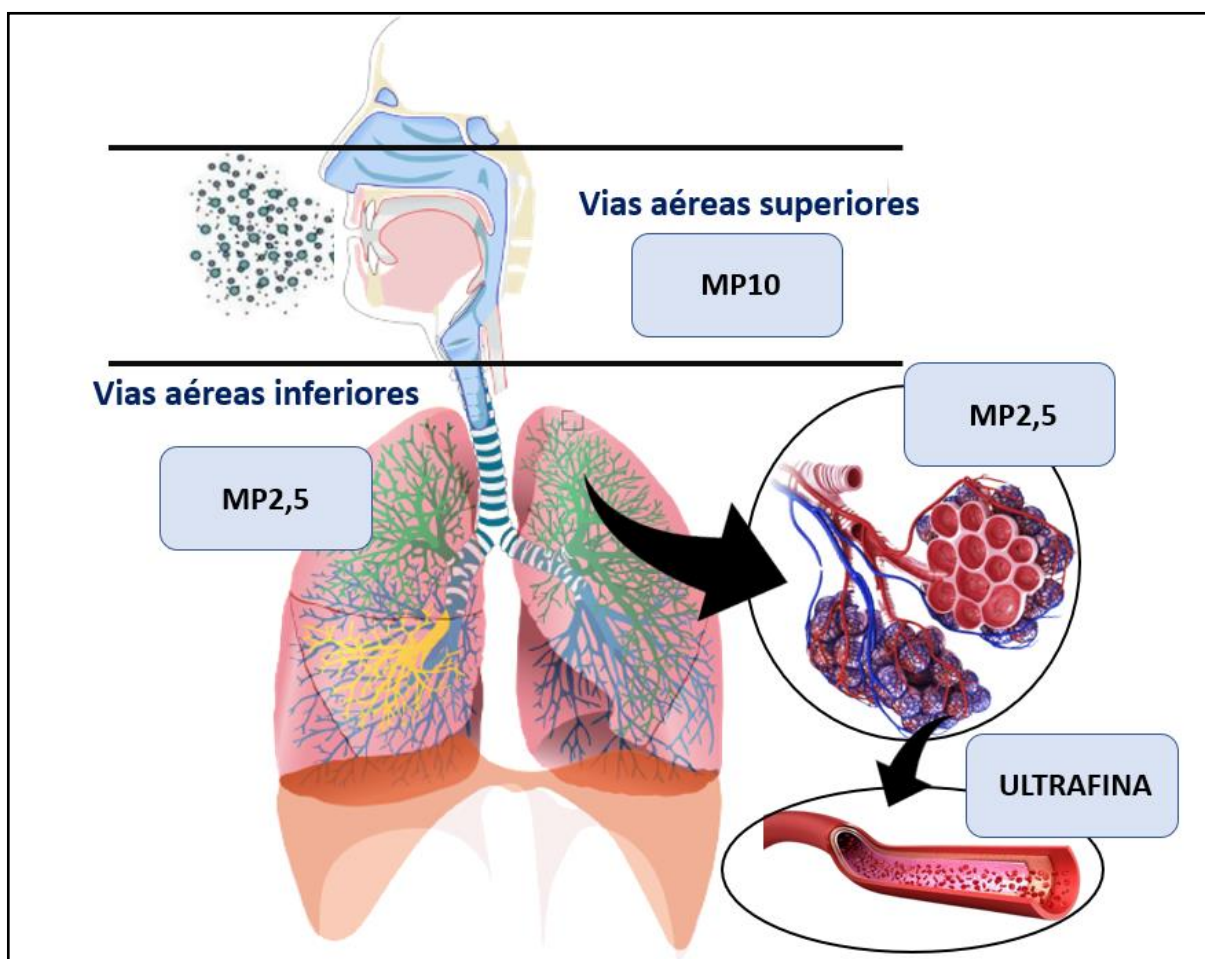


Figura 2 – Ilustração do autor mostrando as vias de acesso e deposição de material particulado (MP) de acordo com o diâmetro aerodinâmico e as vias respiratórias superiores e inferiores.

2.1.2 Dióxido de enxofre (SO₂)

Gás incolor, liberado na atmosfera por fontes antropogênicas, principalmente por atividades industriais relacionadas a termelétricas, produção de fertilizantes, siderurgia com fundição de aço e ferro, produção de ácido sulfúrico. Também pode ser emitido na atmosfera por emissões veiculares produzidas pela queima de combustíveis fósseis. O SO₂ presente na atmosfera participa da formação da chuva ácida, tendo como produto dessa reação: o sulfato, um dos principais componentes presentes na complexa mistura das partículas inaláveis (MP) finas e ultrafinas. O dióxido de enxofre é altamente reativo na atmosfera, podendo estar incorporado a aerossóis, provocando acidificação de águas, destruição de monumentos, corrosão de prédios e construções (Cetesb., 2012). A principal via de contaminação humana é por via inalatória, e

dificuldade respiratória, alteração do sistema imunológico com diminuição no processo de defesa contra doenças pulmonares, agravamento de doenças pulmonares e cardiovasculares existentes, são alguns dos principais efeitos deletérios da exposição a altos níveis de dióxido de enxofre.

2.1.3 Ozônio Troposférico (O₃)

Em comparação a outros poluentes, o controle do ozônio troposférico é o mais difícil, devido à complexidade de sua formação que está relacionada a reações que acontecem na baixa atmosfera através de reações químicas. Considerado um poluente secundário, formado pela reação entre óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (COV) catalisados pela radiação solar. O ozônio é um gás extremamente reativo e oxidante, responsável pela formação do smog fotoquímico (WHO., 2006;Alves., 2020). Estudos mostraram intensa relação entre o aumento das concentrações de ozônio em grandes centros urbanos e as patologias cardiorrespiratórias e neurológicas. A sua formação é fortemente associada com padrões meteorológicos e topográficos específicos que facilitam a sua formação (Alves., 2020).

2.1.4 Óxidos de nitrogênio (NO_x)

São formados durante processos de combustão de combustíveis fósseis, podem ser formados e emitidos por motores de combustão interna, fornos, caldeiras, estufas, incineradores em indústrias químicas. Considerado um poluente primário, participa do processo de formação da chuva ácida e formação de oxidantes (O₃) responsáveis pelo smog fotoquímico. Os óxidos de nitrogênio, uma vez lançados na atmosfera em grandes concentrações, acarretam diversos malefícios tanto para a saúde da população quanto para o meio ambiente. NO_x e O₃ são responsáveis diretos por edemas pulmonares, uma vez solúveis em gorduras, penetram profundamente nos alvéolos pulmonares. Em altas concentrações nos tecidos animais, podem diminuir a permeabilidade celular, diminuindo a troca gasosa nos tecidos, em casos extremos podem provocar o bloqueio da troca gasosa com destruição permanente de células e tecidos. Os óxidos de nitrogênio quando inalados podem provocar metahemoglobinemia, doença caracterizada pela ligação dos óxidos a hemoglobina das hemácias, impedindo a ligação das moléculas de oxigênio (WHO., 2006; Cetesb).

2.2 BIOMONITORAMENTO HUMANO

Desempenha um papel importante na avaliação dos níveis de exposição a poluentes na população de uma maneira geral. As populações que vivem no entorno das fontes emissoras fixas (indústrias) são as primeiras a se exporem a esses contaminantes. O biomonitoramento se utiliza de biomarcadores sensíveis, que permitem a identificação de alterações precoces a nível de material genético, configurando respostas biológicas correspondentes a exposição dos indivíduos e constitui ferramenta muito utilizada no estudo e avaliação do risco de poluentes ambientais nos seres vivos. Os poluentes afetam o sistema biológico de maneira progressiva, primeiro no sistema mais precoce representado pelas estruturas genéticas e celulares, e de maneira crescente pode atingir a longo prazo estruturas e sistemas mais complexos dos seres vivos e de todo o ecossistema (**figura 3**). Quando as exposições a contaminantes atingem níveis mais complexos do sistema biológico ficando evidente suas alterações, a reversibilidade na maioria das vezes não é mais possível, ficando claro o processo de degeneração e a instalação de patologias (Moore et al., 2004).



Figura 3 - Esquema do autor mostrando os indícios precoces a nível genético e celular (biomarcadores), com respectiva progressão crescente dos efeitos –Adaptado de Moore ,et al (2004).

Fonte: Moore ,et al. *An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat.Res.2004; 552: 247–68.*

Um dos principais desfechos ocasionados pela poluição atmosférica é o câncer, por isso a importância sempre crescente da realização do monitoramento humano e do ar, para avaliar os efeitos genotóxicos dos poluentes sobre determinada população. Estudo conduzido por Yanagi et al. (2012) correlacionou positivamente o aumento do MP₁₀ com a incidência e mortalidade por alguns tipos de câncer na cidade de São Paulo. Os autores relatam ainda, a importância da utilização de medidas que visem a redução desse poluente e o acompanhamento contínuo das populações expostas. De todos os casos de câncer, cerca de 90% estão relacionados com fatores externos e ambientais, entre eles: tabagismo, radiação solar excessiva, alguns vírus do ambiente e outros ainda desconhecidos (Bonassi et al., 2007). Neste sentido Bolognesi et al. (2015) evidenciaram a utilidade potencial do ensaio de MN aplicado em células epiteliais para o rastreamento de lesões orais pré-cancerosas.

O biomonitoramento humano através da utilização de biomarcadores, visa a proteção da saúde humana em casos de exposições a poluentes, sendo seu principal objetivo avaliar a exposição e mensurar seus efeitos. O MN é considerado um biomarcador biológico de efeito precoce capaz de verificar a frequência de danos cromossômicos em células nucleadas (Coronas et al., 2009; Bonassi et al., 2011; zhang et al., 2016).

2.3 MITOSE E FORMAÇÃO DE MICRONÚCLEO (MN)

O processo de formação dos MN acontece durante uma fase da mitose conhecida como anáfase. A mitose faz parte do ciclo celular dos seres vivos, onde uma célula-mãe tem o seu material genético duplicado dando origem a duas células-filhas idênticas com material genético igualmente divididos (Fenech et al., 2011). O material genético é previamente duplicado durante o ciclo celular antes do processo de divisão entre as células -filhas. O processo mitótico possui cinco fases distintas divididas em: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Na prófase, considerada a fase mais longa, ocorre a condensação da cromatina com desaparecimento do envoltório nuclear (carioteca) e nucléolo, seguida de separação dos centríolos. Na prometáfase os centríolos migram para os polos celulares onde inicia-se a formação do fuso mitótico, na metáfase os cromossomos se apresentam alinhados na placa equatorial da célula e ligados aos polos através dos centrômeros pelos fusos. Na anáfase ocorre a divisão dos cromossomos, cada cromatídeo migra para os polos opostos da célula. E, por fim,

na telófase ocorre a formação do envelope nuclear (carioteca) em cada cromátídeo, com organização do nucléolo e descondensação dos cromossomos (Amabis e Martho., 2004).

Após o processo de mitose, a célula sofre a separação física em duas células-filhas através de um mecanismo denominado citocinese. Esquema da mitose na **figura 4**:

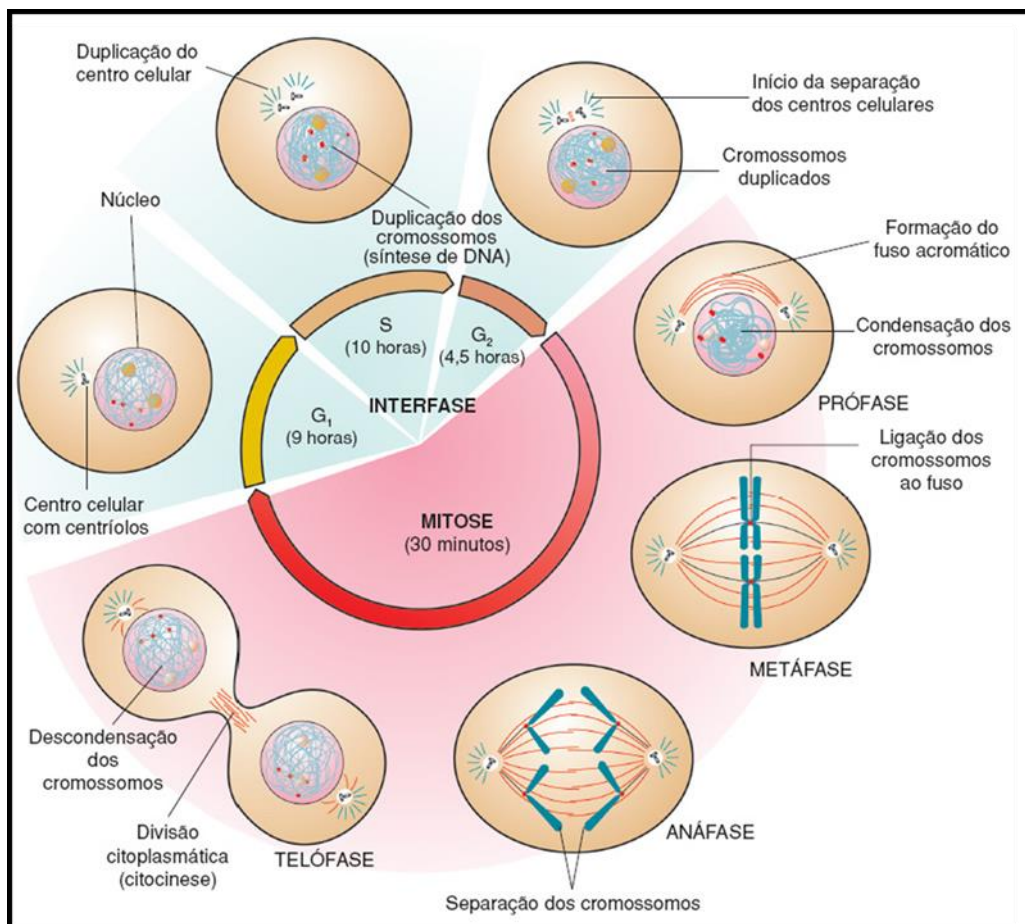


Figura 4 – Ciclo de reprodução celular. Fonte: Amabis e Martho., 2004

MNs representam disfunções no aparelho mitótico (aneugênese) ou quebras cromossômicas (clastogênese). São formações condensadas de cromatina com estrutura semelhante a pequenos núcleos dispersos no citoplasma com características muito semelhantes ao núcleo principal e contém fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante o processo de divisão celular, ficando de fora do núcleo principal (Tolbert et al., 1992; Thomas et al., 2009). Essa ruptura com segregação cromossômica, é causada por lesões ocasionadas ao DNA, não reparadas ou mal reparadas, ou ainda por uma incorreta segregação cromossômica. As lesões no material genético são geralmente corrigidas pelo mecanismo de reparo do DNA,

portanto essas quebras podem ser reparadas não resultando em efeitos cumulativos, porém defeitos ou ineficiência no mecanismo de reparo podem ser letais para a célula resultando em mutações persistentes e danos ao DNA (Branzei e Foiani., 2008).

A formação de MNs ocorre durante o processo de divisão celular na camada basal do epitélio bucal, no entanto a sua identificação só é possível nas camadas mais superficiais do epitélio, em consequência da migração das células da camada basal para as camadas mais superficiais. Este processo de renovação celular é contínuo (Andrade et al., 2017).

A verificação da frequência de MNs em células esfoliadas do epitélio da mucosa bucal constitui uma ferramenta de avaliação importante e potente na verificação de eventuais danos genotóxicos ao DNA (Souto et al., 2010). Sendo amplamente utilizado para investigar a ação de genotoxicidade sobre o epitélio da mucosa bucal (Tolbert et al., 1992). Além disto, é um biomarcador válido para estudos genotóxicos com triagem de grandes populações e estudos como biomarcador de câncer (Federico et al., 2019).

Com isso, a análise de MNs em células epiteliais esfoliadas constitui um teste amplamente utilizado e tem recebido muita atenção pela sua facilidade de uso para mensurar os danos ao DNA permitindo avaliar a instabilidade do genoma, sendo um método não invasivo, de fácil execução, de baixo custo, fácil avaliação e de fácil aceitação por parte da população estudada. Considerado um biomarcador de dano ao genoma, acontece em resposta a estressores ambientais, que permitem a identificação de alterações precoces (Thomas et al., 2009; Bonassi et al., 2011).

Na **figura 5** o esquema com a formação do MN:

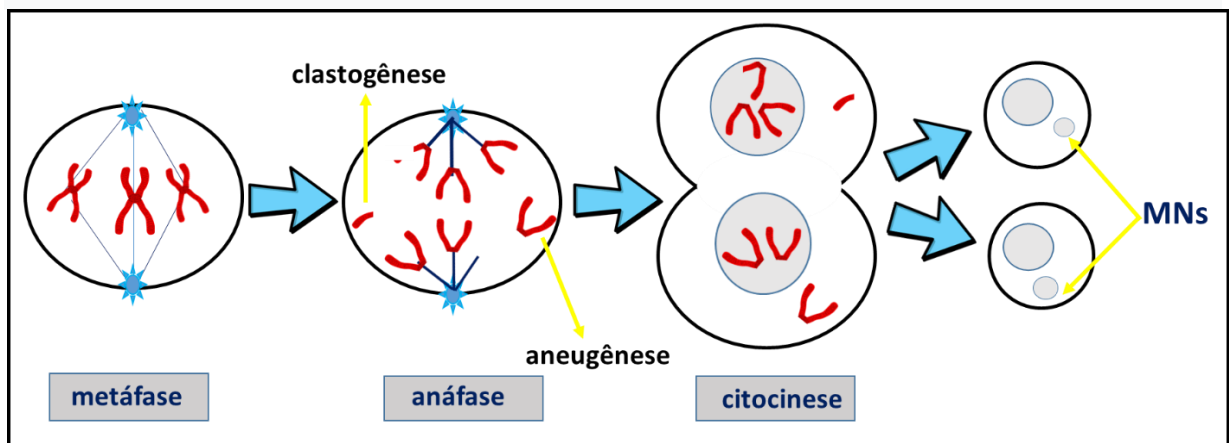


Figura 5 – Esquema do autor mostrando o processo de formação do MN em uma célula durante a mitose. Quebra (clastogênese) ou perda (aneugênese) de um cromossomo culminando com a formação de MN.

2.4 EPITÉLIO BUCAL

O epitélio bucal é considerado uma barreira primária que divide o meio bucal e os tecidos que se encontram adjacentes e mais profundos. Se caracteriza por um epitélio escamoso estratificado que possui células dispostas em estratos e se encontram firmemente aderidas e unidas umas às outras formando uma verdadeira barreira entre o meio externo e o meio interno. As células que compõem esse epitélio são basicamente classificadas em duas populações funcionais distintas: uma população que tem a capacidade progenitora envolvida na função de fornecer novas células através de constantes divisões celulares (mitose), e um outro tipo de célula que se apresenta em maturação e diferenciação celular (Junqueira e Carneiro., 2013). Assim, dois aspectos fundamentais do epitélio bucal são maturação e proliferação. Adjacente a lâmina própria, encontra-se a camada basal, que constitui o estrato progenitor do epitélio. A camada basal é formada por células se multiplicam e, portanto sintetizam DNA e sofrem mitoses. O epitélio para manter sua integridade estrutural necessita de renovação celular de maneira contínua, através de repetidos processos mitóticos que acontecem na camada basal, no qual células das camadas mais profundas migram para a superfície do epitélio até sua descamação. À medida que essas células oriundas da mitose migram para a periferia do epitélio, elas perdem essa capacidade proliferativa não sofrendo mais divisão celular. Durante o processo de mitose cada célula-mãe se duplica dando origem a duas células-filhas com idêntico material genético (Nanci., 2013).

A informação genética celular, representada pelo DNA, é bastante vulnerável à constantes modificações durante a fase de mitose, por esse motivo uma parte da população de células progenitoras tem um ciclo celular mais lento e controlado para permitir que alterações durante o ciclo celular sejam prontamente reparadas. Essas células têm a função de produzir células que permanecerão na camada basal mantendo o potencial proliferativo (Nanci., 2013).

Ao final do ciclo celular, as células-filhas oriundas da divisão celular, podem ter dois destinos distintos, e essa decisão depende de vários fatores metabólicos inerentes a cada célula-filha produzida. Essas células recém geradas podem retornar ao ciclo celular e participar do processo proliferativo na camada basal ou seguir em direção a diferenciação celular e periferia do epitélio (Balogh et al., 2012). As células que sofrem renovação celular e migram para a

periferia do epitélio levam em média de 7-21/28 dias para completa esfoliação (Holland et al., 2008) (**figura 6**).

As células do epitélio da mucosa bucal constituem a primeira barreira contra agentes mutagênicos, e por esse motivo são consideradas importantes no monitoramento de danos ao DNA, em virtude dessas células sofrerem diretamente com a ação de agentes genotóxicos e ou citotóxicos através de ingestão ou inalação, configuram um tecido de rota direta para os poluentes transportados pelo ar. O uso dessas células como biomarcadores resultantes de exposições a contaminantes ambientais leva em consideração a intensa metabolização de carcinógenos que acontecem nesses tecidos epiteliais, confirmando assim a maior incidência de cânceres humanos nesses tecidos (Holland et al., 2008).

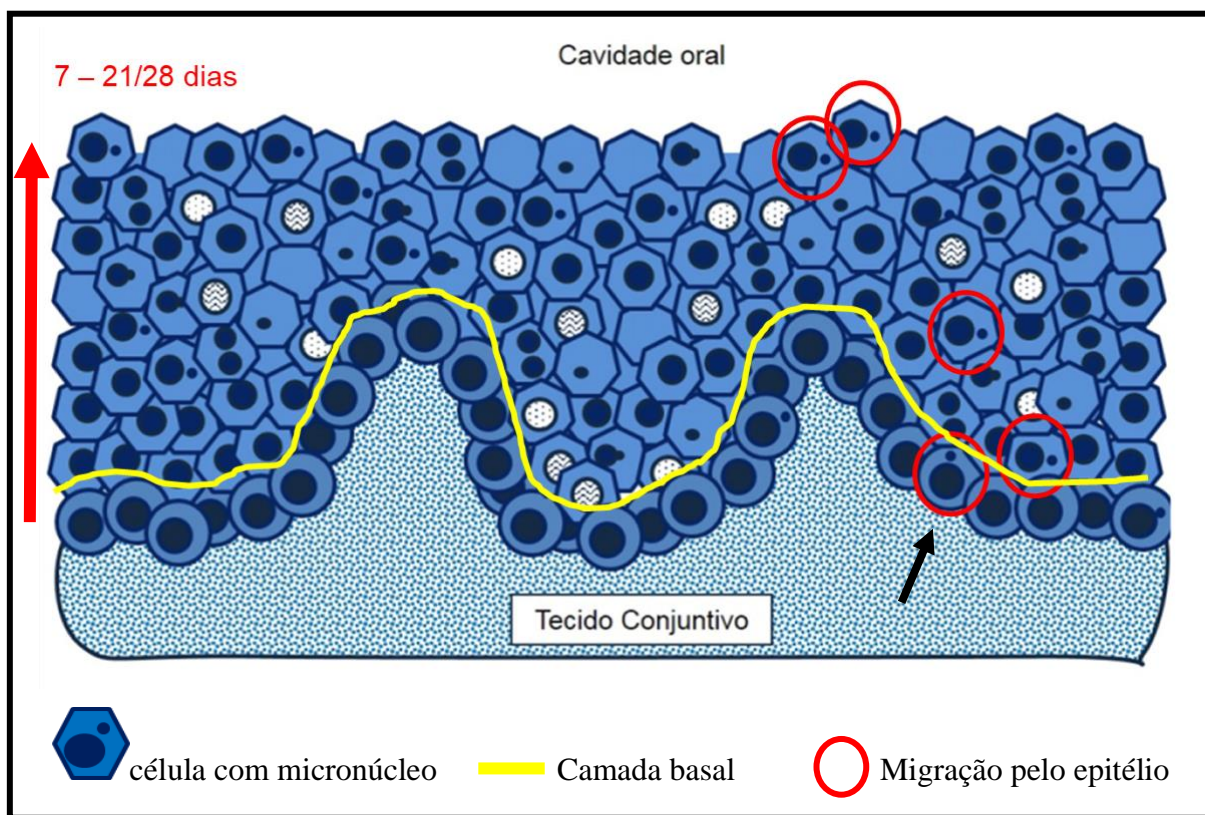


Figura 6 – Esquema do autor mostrando o epitélio de revestimento da mucosa bucal evidenciando a migração das células com alterações nucleares da camada basal para a periferia do epitélio. Adaptado de: *Thomas et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2009;4(6):825-37.*

2.5 CITOLOGIA DE BASE LÍQUIDA (CBL)

As alterações que podem vir a ocorrer no processo de renovação e maturação celular podem ser evidenciadas pela citologia. A princípio as citologias foram utilizadas para avaliação de lesões no útero, sendo mais tarde adaptadas para investigações em células epiteliais da cavidade bucal (Freitas et al., 2016).

A utilização da citologia como um método de investigação das alterações celulares no epitélio é bastante útil, realizada com instrumentos de fácil utilização, tendo como vantagens: coleta rápida, baixo custo e não invasiva. Os mesmos padrões celulares, as mesmas atipias celulares, podem ser conseguidas pelo método de CBL, mantendo os padrões de parâmetros relacionados a morfologia celular. A CBL fornece uma amostra celular impregnada em lâmina com uma melhora considerável na diminuição do número de artefatos presentes na amostra, maximizando a interpretação da morfologia celular e suas alterações. Outra grande vantagem observada com essa técnica é a concentração celular em áreas menores e específicas das lâminas facilitando a leitura manual. A dispersão e a disposição das células na superfície das lâminas são homogêneas, com pouca sobreposição celular objetivando as interpretações celulares (Longatto et al., 2005 e Beerman et al., 2009).

A preparação por meio de CBL pode substituir o esfregaço convencional, sendo mais específica, sensível e precisa, minimizando problemas associados ao preparo das células, com diminuição da quantidade de células inflamatórias, sangue e muco. É uma metodologia semiautomática utilizada para coleta e processamento de células epiteliais, com área de triagem na lâmina menor e melhora considerável na qualidade dos espécimes celulares (Norimatsu et al., 2013). Os preparos conseguidos com CBL são imediatamente colocados em um líquido conservante, fazendo com que a fixação e coloração se apresentem mais homogêneas quando em comparação com método convencional (Longatto et al., 2005). O líquido conservante do meio líquido tem a propriedade de manter as estruturas morfológicas e moleculares íntegras do esfregaço (Freitas et al., 2016).

O estudo de Ramos et al. (2014) para investigar populações expostas a agentes potencialmente carcinogênicos utilizou a CBL em células da mucosa bucal, onde relatou alta qualidade conseguida com as lâminas preparadas com a técnica, ressaltando a fácil preparação e a possível automatização da leitura das lâminas em detrimento da leitura manual. Os autores

ainda relataram que a CBL constituiu um método de aprimoramento e refinamento do processamento das células colhidas.

Outra excelente vantagem da CBL relatada é a possibilidade de detecção precoce de doenças como o HPV, através de exames específicos com o excedente de células do processamento e a possibilidade de realização de outras análises através da imuno-histoquímica. Relata ainda a especificidade e facilidade aumentada para detecção de lesões pré-malignas em mucosa bucal (Kujan et al., 2006).

2.6 PROTOCOLOS DE TOLBERT ET AL (1992) E THOMAS ET AL (2009) PARA O ENSAIO DE MN

Stich et al. (1982) foram os primeiros pesquisadores a utilizar o Teste de Micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal para o uso de biomonitoramento em populações expostas a agentes mutagênicos, em específico do trabalho o tabagismo, em população com o hábito de “mascar” tabaco (“rapé”). Os pesquisadores utilizaram raspados da mucosa bucal, que após os preparos de esfregaço diretamente nas lâminas foram corados com a reação de Feulgen e fast green. O MN era a única aberração cromossômica investigada. Verificou-se uma frequência elevada de células com MN em todos os usuários de tabaco do estudo.

Tolbert et al. (1992) realizaram um trabalho com o objetivo de melhorar a utilidade do ensaio de MN com a intenção de gerar um protocolo inovador até então, sendo utilizado em várias populações de voluntários expostos ou não a agentes mutagênicos. O objetivo proposto foi um refinamento nos critérios de pontuação, identificação e características dos MNs, além da inclusão de outras anomalias nucleares indicativas de apoptose, necrose celular e de danos cromossômicos para serem investigadas e pontuadas, aumentando dessa forma a utilidade epidemiológica do teste. A apoptose é um processo genético controlado e programado de morte celular que encerra o ciclo celular, importante em processos regenerativos dos tecidos ou em resposta a agentes genotóxicos, constituindo assim, importante mecanismo para eliminação de células que apresentam alterações genéticas. Entretanto, a frequência aumentada de apoptose pode ser um importante marcador de risco aumentado para transformações malignas.

As Etapas da Apoptose (condensação da cromatina (CC), picnose (PK), cariorrexe (CRX) e a cariólise (CRL) indicativo de necrose celular, foram incluídas no protocolo proposto pelo

pesquisador por serem sensíveis à eventos genotóxicos e citotóxicos e por aumentarem a sua frequência diante de tais eventos (Tolbert et al., 1992; Meireles et al., 2006; Carrard et al., 2007; Yang et al., 2017). Tolbert et al (1992) descreveram as características como: CC – distribuição anormal de cromatina, concentrada no centro nuclear ou disposta grosseiramente em grânulos, PK – condensação extrema da cromatina com grande redução do tamanho do núcleo, CRX – desintegração da carioteca com presença de inúmeros fragmentos nucleares dispersos pelo citoplasma celular, descritos como corpúsculos de Feulgen positivo e a CRL – ausência nuclear com dissolução do núcleo e aspecto de núcleo fantasma.

Também foram incluídos nas alterações: Células binucleadas que foram descritas como anomalias que ocorrem em virtude de defeito na citocinese após a divisão nuclear e broken-egg descrito como corpos arredondados com cor semelhante ao núcleo, porém menor e ligado ao núcleo principal por um ligamento de cromatina,. O estudo teve como critério final estabelecido para as análises nucleares: MNs, broken-egg, picnose, cromatina condensada, Carriorexe, cariólise e binucleada (**figura 7**).

Na **figura 8** aparecem as imagens microscópicas obtidas pelo autor desse estudo através de microscopia óptica para evidenciar os critérios definidos por Tolbert et al em 1992.

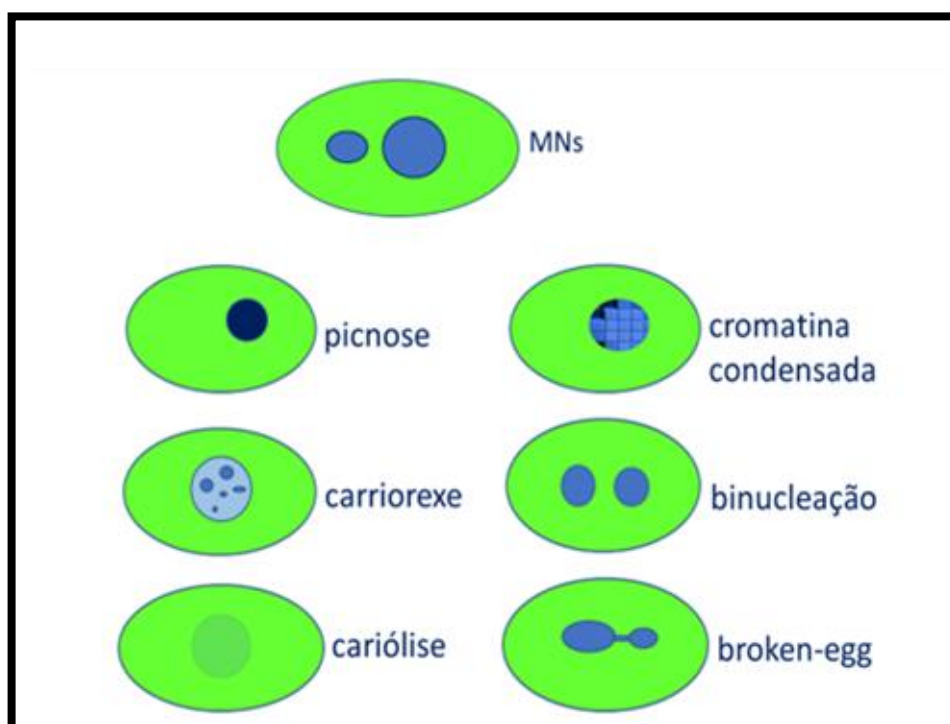


Figura 7 – Diagrama do autor demonstrando alterações nucleares e MNs (acervo próprio) - adaptado de Tolbert et al 1992. Fonte: Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat Res. 1992.

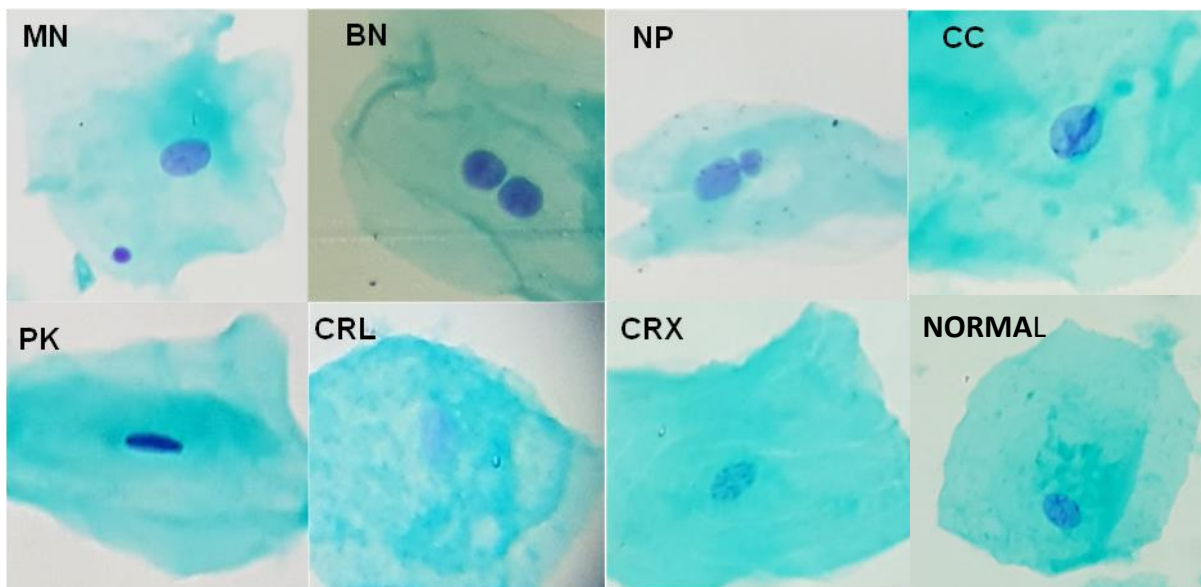


Figura 8 – Imagens fotográficas do próprio autor obtidas de microscopia óptica com aumento de 400x (2021). MN(micronúcleos), BN(binucleadas), NP(Broken egg), CC(cromatina condensada), PK(picnose), CRL(cariólise), CRX(Carriorexe). Seguindo os critérios de pontuação de Tolbert et al (1992)

Ainda nesse estudo, as características dos micronúcleos foram descritas como critérios para a inclusão na pontuação de células alteradas: perímetro suave, arredondado e com membrana presente; o tamanho de até 1/3 do núcleo principal, mas com tamanho suficiente para ter forma e cor; intensidade de coloração e textura semelhante ao núcleo; estar no mesmo plano focal do núcleo; não apresentar sobreposições nucleares e pontes citoplasmáticas que indicariam possível broken-egg. Com relação ao processamento das amostras, as células epiteliais foram coletadas da mucosa com espátula de madeira, sendo mencionado como alternativa escova cilíndrica, após, as células colhidas eram levadas diretamente na lâmina através de um esfregaço, onde então eram fixadas com metanol a 80%. A coloração da lâmina foi realizada pela técnica de Feulgen através de hidrólise ácida com utilização de reativo de Schiff para coloração do núcleo.

Thomas et al. (2009) descreveram um protocolo intitulado BMCyt (teste de micronúcleos em citoma bucal) baseado nos critérios desenvolvidos por Tolbert et al (1992). Configura um método mais abrangente onde cada célula pontuada é estudada e avaliada citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mono, multi ou binucleadas) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade (MN, brotos nucleares-NB). Os autores modificaram a nomenclatura de broken egg para brotos nucleares (NB), relatando que as células com

NB contém um núcleo com uma extremidade sugestiva de um brotamento e que essa anomalia pode estar relacionada a eliminação de DNA devido à amplificação gênica.

Nesse protocolo se estabeleceu um método mais específico para as coletas das células, preparação e processamento das lâminas com utilização de reativo de Schiff (reação de Feulgen) para coloração do DNA e contra coloração das amostras com reagente de fast green para o citoplasma. Os autores sugerem uma cito centrifugação das células coletadas colocadas previamente em um recipiente com líquido conservante e fixante a base de metanol 80% ou uma solução 3:1 de metanol e ácido acético glacial.

Foi relatado ainda, a importância do conhecimento de dados demográficos e de exposição como: idade, sexo, tabagismo, consumo de álcool, doenças degenerativas, exposição à radiação ionizante, histórico de câncer, medicamento em uso ou doenças existentes (história da doença), exposições ocupacionais, entre outros. Esses critérios devem ser considerados dependendo do tipo de estudo epidemiológico a ser executado.

Na **figura 9** as anomalias nucleares sugeridas por Thomas et al. (2009) para o ensaio Bmcyt:

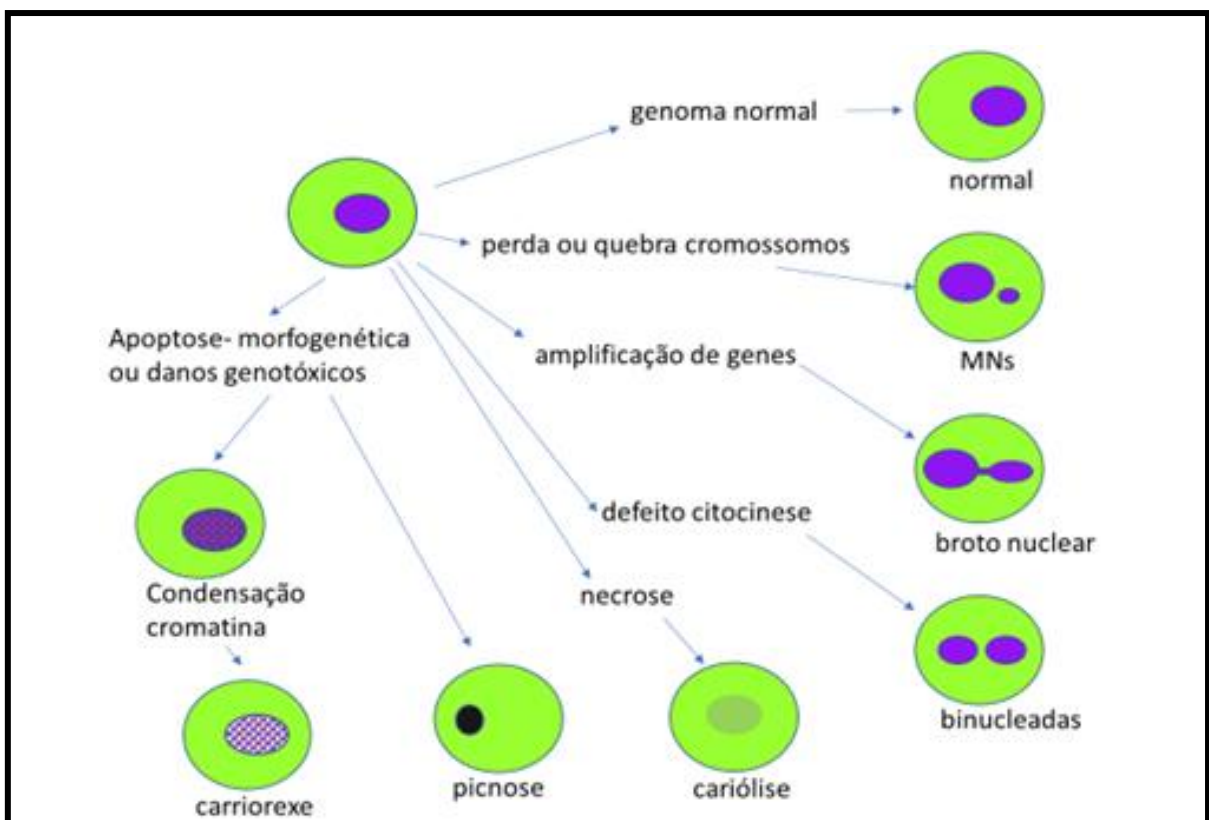


Figura 9 – Diagrama do próprio autor adaptado do trabalho de Thomas et al. (2009) mostrando os vários tipos de células pontuados no ensaio de BMCyt.

Fonte: *Thomas et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2009;4(6): 825-37.*

Em seu estudo, Bolognesi et al. (2013) abordaram o ensaio de citoma da mucosa bucal e forneceram uma versão atualizada detalhada dos critérios de pontuação acompanhada de uma galeria de fotos com as alterações. Esses critérios complementam os relatados anteriormente. Nesse estudo os autores complementam a classificação das anomalias nucleares classificando o broken egg (NP) como uma alteração adicional e não em substituição ao broto nuclear (NB), como classificado em estudos anteriores e foram adicionados a mesma categoria de alteração.

Estudos em formato de projeto colaborativo inter laboratorial denominado HUMNxl foram conduzidos por pesquisadores para identificar variáveis que poderiam alterar os resultados encontrados com relação a medição e mensuração dos parâmetros avaliados, assim como, avaliar possíveis fatores de confusão relacionados as amostras e a população estudada (Rohr et al., 2020).

Holland et al. (2008), iniciaram o projeto colaborativo de validação do HUMNxl para o estudo de danos ao DNA para demonstrar os efeitos citogenéticos de exposições ambientais e ocupacionais, influência de fatores nutricionais, influência do estilo de vida utilizando células esfoliadas da mucosa bucal para a investigação de exposição genotóxica.

2.7 TESTE DE MN EM MONITORAMENTO DE POPULAÇÕES

A utilização do teste ou ensaio de MNs teve amplo relato na literatura, discutindo e analisando as mais diversas condições que podem propiciar danos de genotoxicidade e citotoxicidade. Buscamos relatar as mais comuns: hábitos como tabagismo, etilismo e uso de colutórios com álcool; avaliação dos efeitos da idade no processo de envelhecimento; deficiências nutricionais (principalmente de folato e vitamina B₁₂); danos genéticos induzidos por doenças sistêmicas (principalmente Diabetes mellitus e neurodegenerativas); avaliação dos efeitos a exposição de quimioterápicos e radioterapia; biomonitoramento de populações não expostas a mutagênicos; população exposta ocupacionalmente; radiação ionizante (raio x e celulares) e população exposta a poluentes ambientais, entre outros.

Stich et al. (1982), realizou um estudo na Índia com grupo de risco para o câncer, onde verificou frequência elevada de MNs em grupo de estudo exposto ao tabaco, em relação ao grupo não exposto. No presente estudo, o autor não avaliou outras alterações nucleares.

Meirelles et al. (2006), observando a apoptose em células esfoliadas da mucosa oral em um grupo exposto ocupacionalmente a agentes mutagênicos, verificou frequência significativa de alterações nucleares indicativas de apoptose no grupo estudado, quando em comparação ao

grupo controle, evidenciando assim que a apoptose sofre influência genotóxica e a importância de se incluir essas alterações nos resultados.

Ramos et al. (2014), através da utilização da CBL(citologia de base líquida) avaliaram o potencial genotóxico em trabalhadores da construção civil expostos a poluição do ar. Um grupo de 20 trabalhadores tiveram células coletadas da mucosa bucal e comparadas com um grupo controle de 20 indivíduos. A frequência de MNs, o único parâmetro avaliado, foi estatisticamente mais significativa nos trabalhadores da construção civil.

Da Silva et al. (2015), descreveram a influência de polo petroquímico através da correlação entre MP (material particulado) e sua ação mutagênica em biomonitoramento de crianças. Além de outras técnicas de monitoramento biológico, o teste de micronúcleos foi realizado, onde se avaliou todos os parâmetros descritos por Tolbert et al (1992) e Thomas et al (2009). Os resultados não encontraram diferença estatística significativa entre as frequências dos biomarcadores avaliados na mucosa bucal. Os pesquisadores concluem a necessidade de biomonitoramento rotineiros para identificar valores basais para as alterações, que serviram de guia para estudos futuros.

Tomaz et al. (2016), correlacionaram no seu estudo as anemias e os danos ao material genético, avaliando a frequência de MNs e outras alterações nucleares na mucosa bucal de 30 pacientes anêmicos e 30 pacientes do grupo controle com ausência da doença. Como resposta ao seu estudo encontrou uma prevalência na frequência de MNs, NB, NP e BN muito elevada no grupo anêmico demonstrando o início de instabilidade no DNA, as outras alterações indicativas de apoptose e proliferação se apresentaram equivalentes.

Ferraz et al. (2016), concluíram em seu trabalho que a idade foi fator determinante para o potencial dano ao DNA encontrado. Estudo realizado com 80 indivíduos divididos em 4 grupos com 2 faixas etárias distintas e separados por sexo, apresentou diferença significativa na frequência de MNs e outras alterações degenerativas no grupo mais idoso, após o teste de micronúcleos. Com relação ao sexo não houve diferença entre o grupo jovem, porém o grupo idoso teve maior frequência de CRX e CRL no sexo masculino.

Do Vale et al. (2017), os pesquisadores analisaram a influência de atividades expostas ocupacionalmente em soldados, em um total de 44 participantes, divididos em 2 grupos: soldados e não soldados. Foi utilizado o ensaio de MNs e de morte celular avaliando apenas os parâmetros: MNs, PK, CRL e CRX. Como resultado, verificou-se que os parâmetros de citotoxicidade (PK, CRX, CRL) estavam aumentados no grupo de Soldadores, enquanto os

MNs (indicativos de genotoxicidade) não apresentaram alterações significativas nas frequências entre os grupos.

Antônio et al. (2017), propôs um estudo realizado em crianças com idade média de 7 anos para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos na mucosa bucal após a exposição à radiação ionizante (raio x). O estudo com 30 crianças de ambos os sexos foi realizado através da coleta de células pelo método CBL, uma coleta antes da obtenção das radiografias e uma coleta após a exposição ao raio x. Os resultados foram comparados para avaliação dos parâmetros genotóxicos (MNs, NB, NP) e citotóxicos (PK, CRL, CRX). O resultado obtido revelou aumento significativo das variáveis PK, NB, NP após a obtenção das radiografias, evidenciando potencial de citotoxicidade e genotoxicidade das radiações ionizantes.

Andrade et al. (2017), avaliaram os potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos produzidos pela coleta de lixo em coletores. Esse estudo reuniu 47 indivíduos do sexo masculino para representar o grupo exposto, e os resultados foram comparados com um grupo controle. Foi realizado o teste de MNs e após as análises das amostras não se verificou diferença estatística no parâmetro MNs, no entanto, houve diferença nas frequências de PK e CRL significativa no grupo exposto.

Alpire et al. (2019), avaliaram os efeitos citogenéticos em exposições ambientais verificadas em um estudo com crianças que viviam em condições insalubres no estuário de Santos-São Vicente, estado de São Paulo. Crianças em um total de 40 foram divididas em 2 grupos, 20 que viviam na região e 20 que correspondiam ao grupo controle não expostos a condições de insalubridade. Como resultado do estudo, os autores verificaram aumento significativo na frequência de MNs em células esfoliadas da mucosa oral no grupo exposto, quando em comparação ao grupo controle. Contudo, os parâmetros utilizados para avaliar os efeitos da citotoxicidade (picnose, cariólise e cariorrexe) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Os autores concluem que aumentos significativos no aparecimento de MNs demonstram que a exposição a contaminantes ambientais, pode ocasionar alterações de instabilidade no DNA em células da mucosa bucal.

Cláudio et al. (2019), demonstraram em seu estudo a consequência biológica da exposição humana a pesticidas utilizados na agricultura. No estudo, 21 indivíduos trabalhadores em fazendas de banana expostos a pesticidas, foram comparados a um grupo controle com 20 indivíduos não expostos. O objetivo foi avaliar a instabilidade genômica e a citotoxicidade presente nas células epiteliais da mucosa bucal dos trabalhadores expostos. Como resultado os pesquisadores verificaram que houve uma diferença significativa das frequências de MNs e

CRL nas células dos indivíduos expostos, mas não encontraram diferenças nas taxas das frequências de PK e CRX, concluindo potencial aumento de instabilidade genômica e morte celular nesses indivíduos.

Federico et al. (2019), em estudo com população exposta a área petroquímica na região da Sicília, Itália, verificou aumento nas variáveis de dano ao DNA (MN) e evento de citotoxicidade com aumento significativo de CRL no grupo exposto de trabalhadores expostos e de população residente próxima a região de petroquímica. Nesse estudo, o autor correlacionou vários fatores de confusão, obtendo correlação positiva com o tabagismo. Com relação ao sexo e idade investigados, não houve diferença estatística entre os grupos.

De Los Gutierrez et al. (2020), realizaram estudo em população residente de área industrial de Buenos Aires para avaliar os efeitos dos poluentes atmosféricos. Utilizaram o ensaio de MNs na mucosa bucal conforme o protocolo descrito por Tolbert et al. (1992). O estudo ainda correlacionou a idade e o sexo dos participantes com o resultado da análise dos biomarcadores. Nesse estudo não foi encontrada diferença estatística nas variáveis comparadas entre os grupos, também, não houve diferença nas frequências dos biomarcadores quando se correlacionou idade e sexo.

González-Santiago et al. (2021), em estudo para avaliar os efeitos da poluição do ar em indivíduos jovens expostos em área com alta concentração de poluentes, encontrou aumento significativo de NB, indicativo de dano ao DNA, e aumento nas variáveis de apoptose e cariólise, indicativos de citotoxicidade. Entretanto, não encontrou aumento em MNs e BN.

Com relação ao método de processamento das amostras, uma série de técnicas foram utilizadas, com algumas diferenças e preferências relatadas pelos pesquisadores, principalmente relacionadas a coleta e coloração das células.

A utilização de citologia através de raspado da mucosa bucal foi realizada com espátulas de madeira (Stich et al., 1982; Sarto et al., 1987; Tolbert., et al 1992; Souto, 2010; Do Vale., et al 2017; Alpire et al., et al 2019; Claudio., et al), por Cytobrush ou escova cervical (Ramos., et al 2014; Tomaz., et al 2016; Ferraz et al., 2016; Antônio et al., 2017) e escovas de dente adaptada para a coleta (Thomas et al., 2009; Thomas e Fenech., 2011).

Com relação ao preparo das células, houve relatos de esfregaços diretamente nas lâminas logo após a raspagem em mucosa (Stich et al., 1982; Tolbert et al., 1992; Meirelles et al., 2006; Ferraz et al., 2016) ou foram centrifugadas e filtradas antes da fixação nas lâminas (Thomas et al., 2009; Da Silva et al., 2015; Thomaz et al., 2016; Do Vale et al., 2017).

Segundo Thomas et al. (2009), o método de centrifugação demonstrado no protocolo descrito por ele, resulta em amostras de células em maior quantidade, mais homogêneas e com melhor dispersão no centro da lâmina e menos sobreposições celulares, que dificultariam a análise.

O processo de coloração das lâminas também apresentou diferenças de técnicas relatadas na literatura. Foi utilizada reação de Feulgen com contra coloração de fast green na maioria dos trabalhos revisados (Stich et al., 1982; Sarto et al., 1987; Meirelles et al., 2006; Souto, 2010; Tomaz et al., 2016; Claudio et al., 2019). Ramos et al.(2014), utilizou e comparou 3 técnicas de coloração para as amostras : Giensa, Papanicolau e Feulgen com fast green, sendo apenas o Feulgen específico para coloração do DNA. Nesse estudo os autores encontraram frequência de MNs maiores nas colorações de Giensa e Papanicolau, tanto no grupo exposto como no grupo controle, sugerindo falsos positivos nas amostras, devido a não especificidade dos reagentes ao reagir com DNA. Bonassi et al. (2011) relataram também a possibilidade de amostras com falso positivo de MNs com a coloração de Papanicolau, devido a evidenciação de estruturas que estão no citoplasma como bactérias e grânulos de queratina. A reação de Feulgen é uma técnica específica para DNA que fornece amostras mais limpas, com boa qualidade de contraste, e sendo específicas para DNA tem a comodidade de não corar outras estruturas da célula (Bonassi et al., 2008; Bolognesi et al., 2015)

O primeiro passo para a reação de Feulgen é a hidrólise ácida do DNA, esse ambiente ácido com HCL (ácido clorídrico) faz com que a base purínica do açúcar seja separada da desoxirribose, dessa forma temos estruturas de aldeído livres e o DNA intacto. A molécula de DNA torna-se apurínica permitindo a entrada e ligação com o corante de Schiff que evidencia o DNA de cor magenta. A intensidade do corante é proporcional a concentração de DNA (Ben-Sade e Samach, 2003). A hidrólise se apresenta como o processo mais complexo dentro do método de Feulgen, o tempo de imersão e a temperatura devem ser controlados para se evitar exposições demasiadas ou insuficientes das amostras. A coloração do núcleo e citoplasma devem ser acompanhadas utilizando a microscopia óptica para verificar homogeneidade das colorações assim que são realizadas. O principal benefício em se utilizar a reação de Feulgen com fast green é a diferença de coloração entre núcleo e citoplasma que torna muito mais evidente as estruturas nucleares da célula e o perímetro do citoplasma, facilitando a leitura das alterações. Nessa técnica o núcleo é corado de magenta e o citoplasma cora-se de verde (Souto et al., 2010).

Na figura 10 temos células epiteliais da mucosa bucal submetidas a reação de Feulgen com reativo de Schiff e contra coloração com fast green:

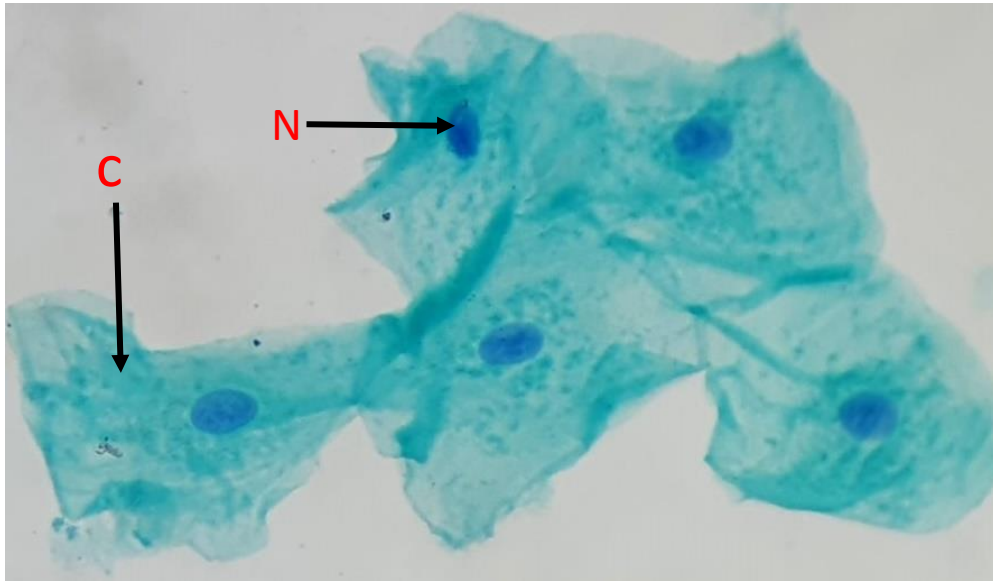


Figura 10– Células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal (bochecha) corada com a técnica de reação de Feulgen e contra coloração de fast green. Fotomicrografia em objetiva de microscópio com aumento de 100x. Imagem do próprio autor.
C – Citoplasma N – núcleo

3. HIPÓTESE

Esse estudo testou a hipótese de que uma população exposta a concentrações de poluentes atmosféricos pode apresentar aumento na frequência de biomarcadores (variáveis) de alterações nucleares em células da mucosa bucal quando comparada a uma população não exposta diretamente.

4. OBJETIVOS

Geral

Avaliar genotoxicidade e citotoxicidade através da análise de biomarcadores relacionados a instabilidade do DNA e processos degenerativos nucleares em células esfoliadas do epitélio da mucosa bucal em população que vive sob influência de poluentes atmosféricos emitidos por polo industrial.

Específicos

Fazer uma comparação da frequência de anormalidades degenerativas relacionadas a morte celular (cromatina condensada, picnose, cariorrexe, cariólise) e dos danos genômicos (micronúcleos, brotos nucleares, binucleadas, broken egg) em grupo de estudo composto por indivíduos residentes no município de Cubatão, no entorno de polo petroquímico, e por um grupo controle composto por indivíduos residentes no município de Praia Grande, fora do polo petroquímico, ambos no estado de São Paulo.

5. METODOLOGIA

5.1 DECLARAÇÃO QUANTO À ADERÊNCIA DO ESTUDO AO PROTOCOLO DE BPC E REQUISITOS LEGAIS APLICÁVEIS

Este estudo foi conduzido de acordo com as Boas Práticas Clínicas (BCP) e demais recomendações estabelecidas pela ICH (Conselho Internacional de Harmonização), que rege as considerações éticas e científicas para projetar, conduzir, registrar e relatar ensaios envolvendo seres humano, bem como em conformidade com as Resoluções 466/12 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde e Resoluções complementares. O estudo foi realizado com aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Metropolitana de Santos - SP (UNIMES) sob o parecer de nº 3.946.126 (CAEE: 29500720.3.00005509) – **(ANEXO A)**, e após autorizações concedidas pelos sujeitos envolvidos na pesquisa através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme disponibilizada cópia em anexo **(ANEXO B)**.

5.2 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A população desse estudo foi composta por 48 voluntários maiores de 18 anos distribuídos igualmente em 2 grupos denominados: grupo 1 (estudo) e grupo 2 (controle). Grupo 1 constituído por indivíduos residentes no município de Cubatão. A população de controle pertencente ao grupo 2 foi composta por indivíduos residentes na cidade de Praia Grande distante 30 km. Todos os indivíduos da pesquisa aceitaram participar voluntariamente do estudo

após responderem a um questionário sociodemográfico por meio de entrevista sobre hábitos relacionados ao hábito de fumar e ingerir álcool, uso de medicamentos, doenças pré-existentes, estado da saúde atual (história da doença), atividades ocupacionais expostas a genotóxicos e citotóxicos.

5.3 DESENHO DO ESTUDO A SER CONDUZIDO

Estudo do tipo transversal observacional sem interferência com a população amostral em ambiente real de exposição, por análise e avaliação de desfechos pré-determinados. O estudo foi embasado através da determinação de um PECO (P= população de estudo indivíduos de Cubatão, E= exposição a poluentes atmosféricos, C= população de controle da cidade de Praia Grande, O= desfechos de alterações nucleares: CC, PK, CRX, CRL, MNs, BN, NB, NP). Análise realizada através de dados quantitativos coletados no período compreendido entre setembro de 2020 e janeiro de 2021.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DO LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

A área de estudo localiza-se na cidade de Cubatão, estado de São Paulo, Brasil. Localizada sob uma latitude de 23°53'44" sul, longitude de 46°25'32" oeste, com 142,4 km² situa-se a 8 metros de altitude. Cidade que apresenta característica de economia rural, urbana e industrial, que se encontra sob influência de polo petroquímico com 25 empresas instaladas representando 5 setores (petroquímico, siderúrgico, químico, fertilizantes e logística) (**figura 11**). O polo industrial fica situado de maneira aleatória pelo território da cidade, situado entre as montanhas da serra do mar, em região de vale o que dificulta a dispersão dos poluentes emitidos na atmosfera (**figura 12**). Por se tratar de projeto observacional com característica de comparação entre populações, a área escolhida para projetar a população de controle para fins comparativos foi o município de Praia Grande, estado de São Paulo, Brasil. Localizada sob uma latitude de 23°59'57" sul, longitude de 46°24'48" oeste, com 147,54 km² situa-se a 5 metros de altitude e representa um dos 15 municípios paulistas classificados como estância balneária pelo governo de São Paulo. Com 22,5 km de costa com 12 praias, tem sua economia baseada na prestação de serviços, comércio e turismo (IBGE) – (**figura 13**).

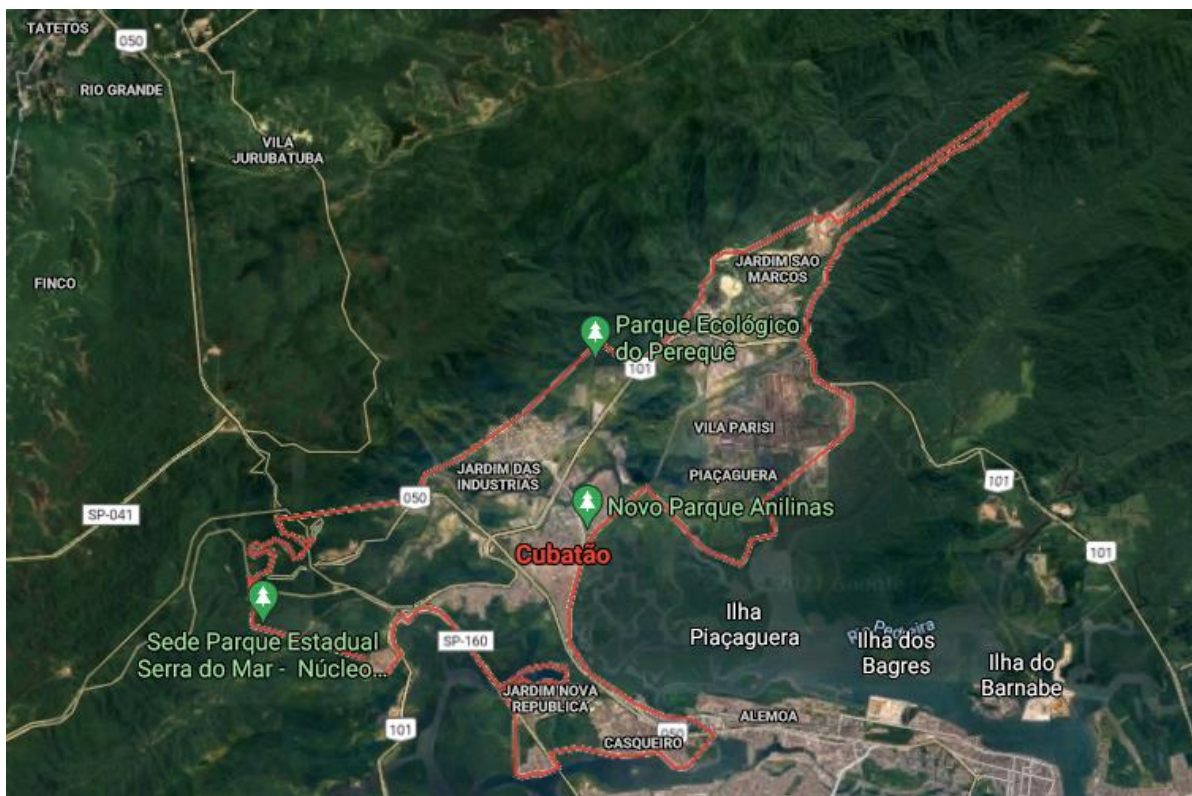


Figura 11 – Mapa da cidade de Cubatão/ SP (Fonte: Google Maps – acesso em: 20/08/2020 - <https://www.google.com.br/maps/place/Cubatão/sp>)

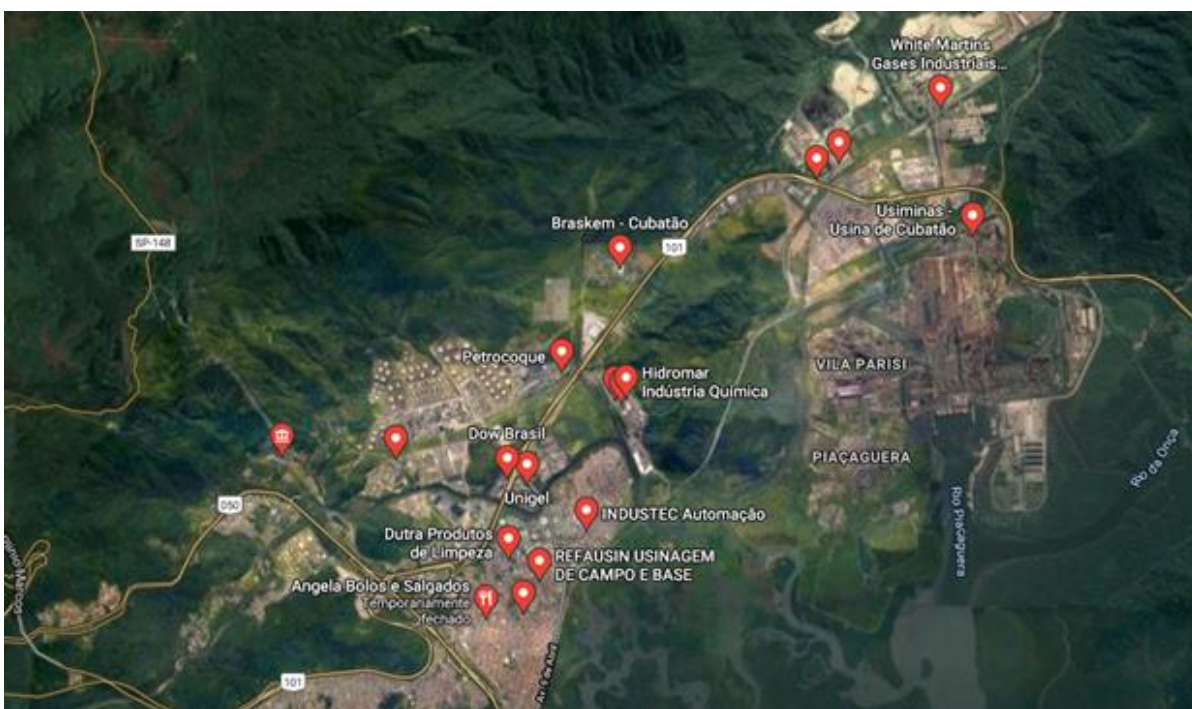


Figura 12 – Imagem do município de Cubatão com as indústrias do polo petroquímico pelo território da cidade de maneira aleatória. (Fonte: Google Maps).acesso em: 20/08/2020- <https://www.google.com.br/maps/search/cubatao/industrias>)

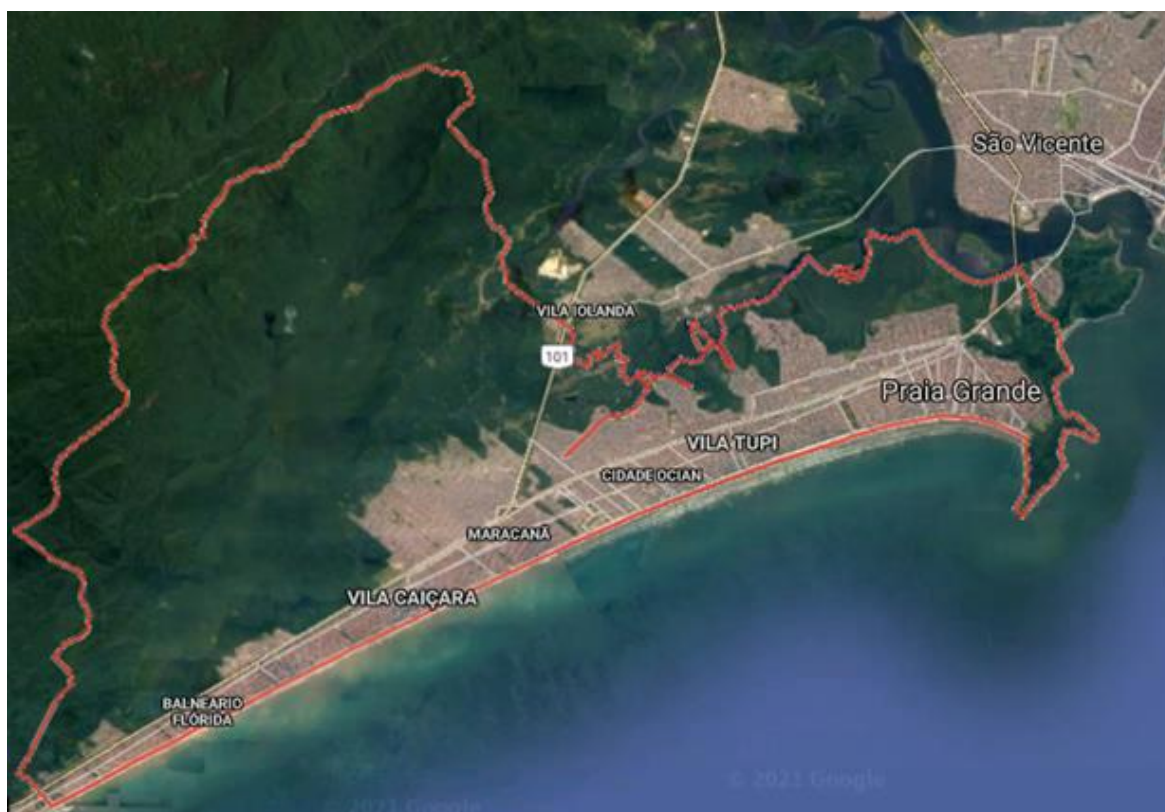


Figura 13 – Mapa da cidade de Praia Grande/SP (Fonte: Google Maps) acesso em:20/08/2020-<https://www.google.com.br/maps/place/PraiaGrande/SP/>)

5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO VOLUNTÁRIO

Após explicar os objetivos e procedimentos do estudo, os participantes de maneira voluntária deveriam cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, que foi confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os voluntários, adultos maiores de 18 anos de ambos os sexos, foram incluídos no estudo após palestras e orientações explicativas, e todos foram convidados a preencher um questionário sobre o histórico de saúde atual, hábitos e atividade ocupacional. Os questionários preenchidos foram analisados e triados para adequação dos critérios de inclusão/exclusão e possibilitar a verificação de possíveis fatores de confusão para os desfechos pré-estabelecidos (biomarcadores). Os fatores de confusão analisados no estudo foram: tabagismo, etilismo, doenças sistêmicas existentes, uso de medicamentos de maneira contínua, tratamento em lesões bucais recente, exposição à radiação ionizante nos últimos 21 dias, exposição ocupacional a agentes genotóxicos.

5.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A resposta positiva a qualquer um dos critérios que representavam os fatores de confusão da amostragem, foi considerado um viés de amostra, portanto o voluntário seria excluído do estudo. Os participantes também puderam solicitar o seu desligamento do estudo a qualquer momento por razões pessoais ou por qualquer outro motivo.

5.7 COLETAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

5.7.1 COLETA DE DADOS DOS POLUENTES MONITORADOS

Foram obtidos dados de amostragem dos poluentes monitorados nas 3 estações de monitoramento da CETESB em Cubatão (Vila Parisi, Centro e Vale do Mogi). Foi utilizado o sistema QUALAR, disponível no site da CETESB, onde foram consultados o IQAR e o Sistema de Ultrapassagens dos poluentes monitorados por essas estações (MP₁₀,NO₂,SO₂,O₃) no período que coincidiu com as datas da coleta das amostras de mucosa bucal dos participantes na cidade de Cubatão.

5.7.2 COLETA EM MUCOSA BUCAL

As coletas das amostras foram realizadas no município de Praia Grande em unidade de saúde da família (SUS - USAFA do Jardim Real), na unidade de odontologia. No município de Cubatão as coletas foram realizadas na iniciativa privada em consultório odontológico. Um total de 24 voluntários foram recrutados em cada grupo, totalizando 48 indivíduos no estudo. Para definição dos números amostrais foram considerados estudos anteriores que utilizaram o Teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. Todas as orientações, bem como as coletas das amostras foram realizadas por Cirurgião-Dentista (pesquisador). O material coletado foi transferido para recipientes individuais contendo líquido conservante e fixativo sendo rotulados por uma auxiliar de maneira que a identificação não era visível ao pesquisador responsável pelas análises. As amostras coletadas seguiam para o processamento de CBL em laboratório de análises clínicas de maneira codificada. As outras etapas do processamento foram realizadas em laboratório nas dependências da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES/Santos-SP.

Os protocolos de amostragem, preparação e coloração foram baseados em Thomas et al. (2009) com algumas modificações e adaptações. Conforme descrito abaixo. Antes da coleta das amostras, os voluntários foram orientados a enxaguar a boca com água por duas vezes com a finalidade de remover detritos (Tolbert et al., 1992; Thomas et al., 2009; Thomas e Fenech., 2011). As coletas foram realizadas de acordo com o preconizado pelo protocolo de Thomas et al. (2009); Thomas e Fenech. (2011) com algumas adaptações: substituição da escova de dente adaptada, por uma escova cervical tipo “pinheirinho” do kit de CBL (Gynoprep® – Stramedical) e substituição do líquido para conservar as amostras. Foi utilizado o metanol 80%, por ser a solução utilizada nos kits de CBL. O metanol tem a vantagem de conservação e fixação das amostras.

As coletas foram realizadas em ambas as bochechas com escova cilíndrica através de 10 movimentos suaves, contínuos e expansivos do centro para fora, com a intenção de aumentar a área de coleta e melhorar a amostragem celular. Para cada bochecha foi utilizada uma escova diferente com a intenção de aumentar a celularidade da amostra e afastar qualquer possibilidade de viés na amostragem. Todas as coletas foram realizadas pelo pesquisador, a fim de manter a padronização. Com as coletas finalizadas deu-se início ao processamento das amostras através de Citologia de base líquida. O sistema utilizado foi o GynoPrep® que possibilita a utilização de cito centrifugação, filtragem e fixação direta das amostras em lâminas com um campo de visão de 22 x 15 cm. A citocentrifugação utilizada de 1000rpm x 10 min permitiu um processamento rápido, fácil, com ótima reprodutibilidade; a filtragem forneceu amostras livres de muco, exsudato, hemácias e detritos. O processamento utilizando a CBL possibilitou a distribuição homogênea da amostra na superfície das lâminas com boa manutenção da morfologia individual das células, com pouca sobreposição celular facilitando a leitura e análise das alterações. Essas constatações reiteram análises observadas por Longatto et al. (2005) e Norimatsu et al. (2013).

Após o processamento das lâminas, estas foram secas naturalmente em temperatura ambiente, onde se realizou o processo de coloração das amostras. O método de coloração escolhido foi a reação de Feulgen com reativo de Schiff e contra coloração com fast green. Esse processo de coloração foi utilizado por Thomas et al. (2009) no protocolo desenvolvido em citoma bucal (BMCyt).

A escolha desse estudo por esse método de coloração teve por base a especificidade da reação de Feulgen pelo DNA. Com essa coloração os cromossomos ficam mais evidentes e as

amostras com coloração de excelente contraste e limpas, pois outras estruturas como citoplasma, RNA, grânulos de queratina não podem ser corados (Bonassi et al., 2008). O método de coloração realizado e adaptado para esse estudo está descrito abaixo:

- A) As lâminas secas com as amostras fixadas foram imersas em recipiente apropriado contendo ácido clorídrico (HCL, 5N) durante um tempo estipulado de 15 minutos, para produzir hidrólise ácida. (HCL diluído para se obter uma titulação de 5N de acordo com protocolo estabelecido pelo laboratório de química da Unimes/Santos-SP)
- B) Após a hidrólise ácida, as lâminas foram lavadas em água destilada para remoção do excesso de ácido e colocadas em imersão com água destilada por 15 minutos. (Água destilada Asfer®- Asfer do Brasil Ltda. Galão com 5l)
- C) A primeira coloração realizada foi a do núcleo com o reativo de Schiff , as lâminas foram imersas em recipiente contendo o reagente com volume suficiente para cobrir completamente as lâminas. As amostras foram mantidas submersas durante 90 minutos em câmara escura. Para a câmara escura foi utilizada uma câmara de revelação radiográfica. (Reativo de Schiff Merck® - Merck, Darmstadt, Alemanha. Frasco contendo 500ml)
- D) Após os 90 minutos realizou-se nova lavagem com água destilada para remoção do excesso de corante.
- E) As amostras foram levadas ao microscópio óptico com aumento de 40x e 100x para verificação da homogeneidade da coloração.
- F) Com o resultado positivo da coloração do núcleo de cor magenta, realizou-se a contra coloração do citoplasma com o reagente de fast green. As lâminas foram submetidas a um “mergulho” de 30 segundos em um recipiente contendo o reagente.
- G) Lâminas foram lavadas imediatamente de maneira abundante com água destilada para remover excesso de reagente, devido à alta reatividade do fast

green, que poderia comprometer as amostras. (Fast Green FCF Dinâmica – Dinâmica® Química Contemporânea Ltda. Frasco com 25gr).

- H) Após esse passo, as lâminas foram submetidas novamente a microscopia com o objetivo de verificar a coloração do citoplasma de cor verde, o que ocorreu.

- I) As lâminas devidamente coradas foram submetidas a etapa de dessecamento das amostras para remoção do excesso de água com a utilização de álcool absoluto 99.5% em 4 banhos de imersão de 2 minutos cada. Depois, as amostras sofreram um processo de clarificação através de 2 banhos de imersão de 5 minutos cada em xilol. O primeiro banho para remoção do excesso de álcool e o segundo banho para clarificação das amostras. A necessidade da utilização do álcool para dessecamento se traduz pelo fato do xilol ser insolúvel em água. O excesso de água em contato com o xilol dá uma aparência leitosa nas lâminas, comprometendo e opacificando as amostras.

- J) Ao fim dessas etapas, as lâminas foram colocadas em uma caixa fechada com tampa para permitir a secagem natural e proteger as amostras de poeira. Após, foram fechadas de maneira hermética com lamínula de vidro e bálsamo do Canadá.

5.8 CRITÉRIOS PARA PONTUAÇÃO E ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os critérios para os vários tipos de alterações foram principalmente baseados no protocolo de Tolbert et al. (1992), e atualizados pelos critérios de Bolognesi et al. (2013). Abaixo estão descritos os critérios para identificação das anomalias relacionadas a morte celular e dano ao DNA respectivamente:

1) **Cromatina condensada(CC)**: células caracterizadas por um núcleo com padrão estriados, representando por regiões condensadas de cromatina intensamente coradas. Relacionada ao processo de apoptose. Exemplos são mostrados na **figura 14**.

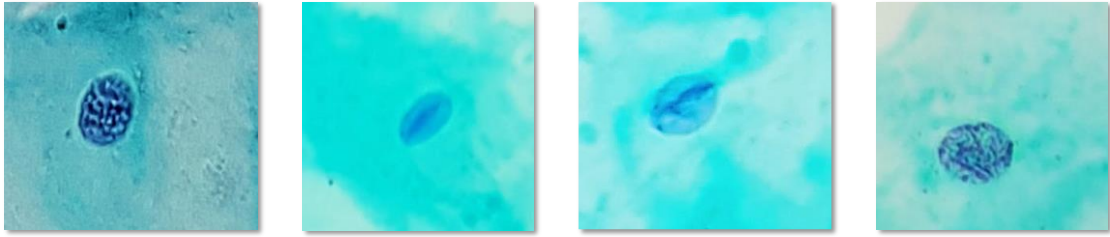


Figura 14 – Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando condensação de cromatina, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

2) **Células com cariorrexe(CRX):** agregação mais extensa de cromatina quando em comparação a CC. Apresenta padrão nuclear pontilhado típico de início de desintegração do núcleo, fenômeno típico dos estágios tardios de apoptose. A apoptose pode gerar corpúsculos de restos nucleares que não devem ser confundidos com MNs. Células demonstradas na **figura 15**.

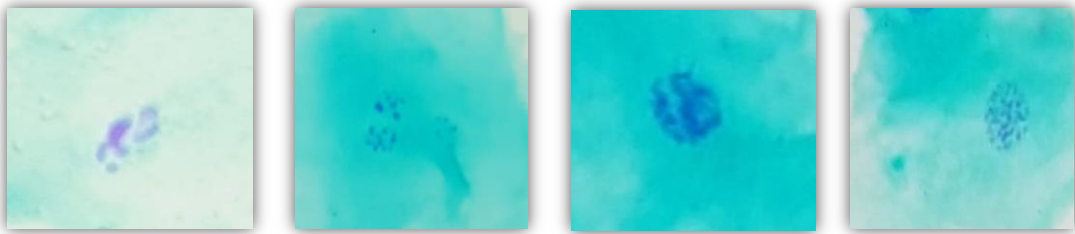


Figura 15 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando cariorrexe, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

3) **Picnose(PK):** caracterizada por núcleo encolhido e intensamente corado, representa a condensação irreversível da cromatina, sendo o momento que precede a cariorrexe. O núcleo apresenta de 1/3 a 2/3 do tamanho de um núcleo normal com coloração nítida, homogênea e intensamente corado. Exemplos de células picnóticas na **figura16**.

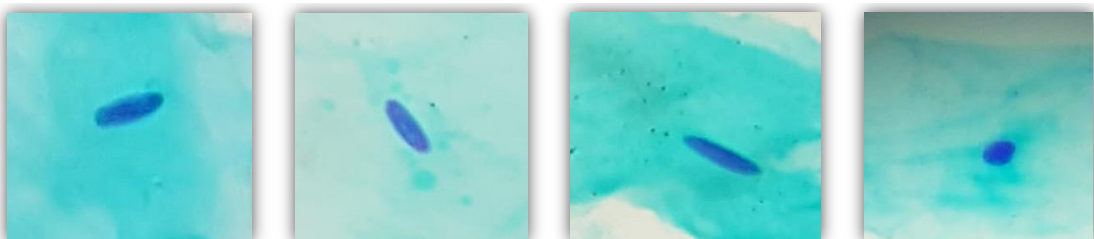


Figura 16 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando picnose, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

4) Cariólise(CRL): ausência quase total de núcleo com esgotamento de DNA, células com núcleo fantasma devido reação de Feulgen negativa pela ausência de DNA. É o estágio de completa desintegração do núcleo, após a ocorrência de necrose e apoptose. No citoplasma dessas células aparecem vestígios de um núcleo, com a presença de apenas algumas proteínas nucleares. Na **figura 17** imagens de cariólise.

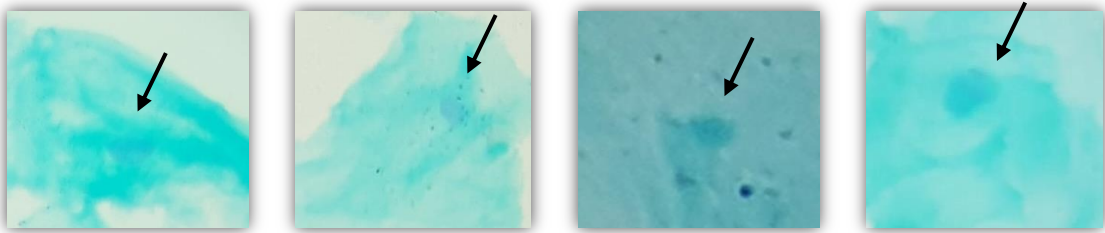


Figura 17 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando **cariólise**, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz. A seta mostra o vestígio nuclear.

5) Binucleada(BN): presença de dois núcleos com mesma morfologia, tamanho, textura e intensidade de coloração. Estão próximos e podem até se tocar. O mecanismo de formação mais aceito é o defeito de citocinese, que pode ser devido a falhas no anel do microfilamento ou parada no ciclo celular em razão de má segregação dos cromossomos ou disfunção do telômero. É um indicador de defeito de citocinese. Imagens na **figura 18**.

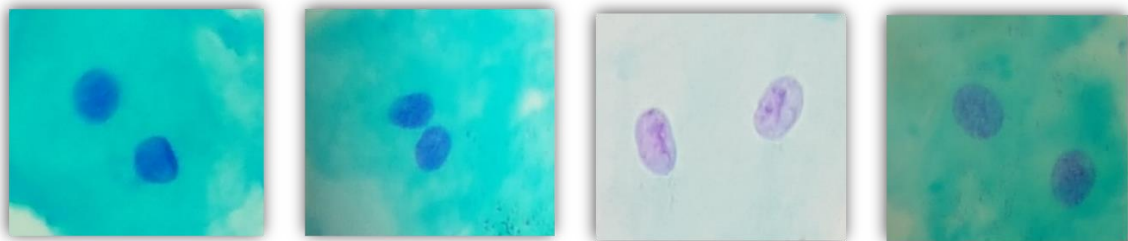


Figura 18 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando **binucleadas**, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

6) Micronúcleos(MN): um ou mais MN presentes em células com um núcleo principal ou células binucleadas. São redondos ou ovais com a mesma textura e coloração semelhante ao

núcleo principal. Apresentam diâmetro de 1/3 a 1/16 do tamanho do núcleo principal, não podem estar conectados com o principal e seu limite deve ser claramente distinguível. Na **figura 19** imagens de MN.

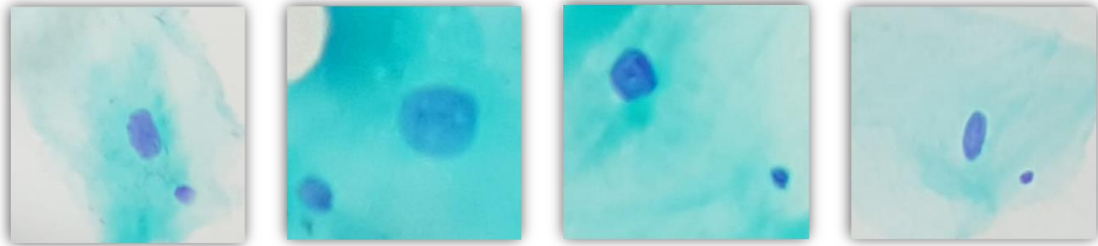


Figura 19 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando **Micronúcleos**, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

7) Broto nuclear(NB) e Broken egg(NP): parecem estar envolvidos com ampliações dos genes. A estrutura é sugestiva de um processo de brotamento envolvido na eliminação de excesso de material genético. Classificados de maneira diferente devido a presença de ponte nucleoplásmica que liga ao núcleo principal. Imagens de NB **na figura 20** e NP **na figura 21**.



Figura 20 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando **broto nuclear**, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

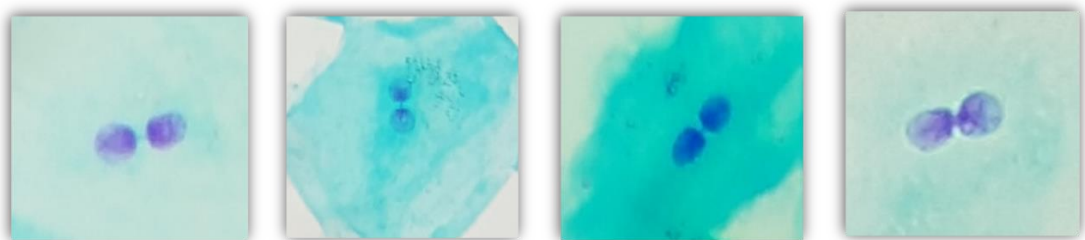


Figura 21 - Fotomicrografia do próprio autor mostrando núcleo de células da mucosa bucal apresentando **broken egg**, com magnificação de 400x em microscópio óptico por transmissão de luz.

Após os critérios de identificação dos biomarcadores estabelecidos, procedeu-se a análise microscópica das amostras. As lâminas foram codificadas e a análise citológica foi realizada em teste cego em relação aos dados obtidos nos questionários, principalmente sexo, idade e grupo a qual pertencia os voluntários, dessa forma se excluiu viés de amostragem nas análises. As análises foram realizadas por um único avaliador, utilizando Microscópio óptico Primo Star ILED marca Zeiss®, com aumento de 100x, 400x e quando necessário aumento de 1000x com objetiva de imersão. Foram computadas 1000 células viáveis com citoplasma íntegro em cada lâmina.

6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS E CRITÉRIOS

Este estudo teve a sua análise estatística realizada com a apresentação dos dados demográficos (idade, sexo e faixa etária) através da avaliação das médias (MD) e desvio padrão (DP) das frequências em cada grupo analisado (grupo 1- exposto e grupo 2- controle) separadamente. A normalidade das variáveis dependentes (biomarcadores: CC, CRX, PK – apoptose e CRL – morte celular; BN, MN, NB, NP – dano genômico) e idade, foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e após, o teste de homogeneidade de Levene foi realizado. As variáveis BN e idade, apresentaram esses dois princípios satisfeitos. Após o teste de normalidade e homogeneidade, as variáveis foram comparadas entre os grupos pelo teste de Mann Whitney (teste não paramétrico), com exceção das variáveis BN e idade que foram analisadas pelo teste T de Student (teste paramétrico). Foi realizado o teste de associação quiquadrado com os dados de sexo, grupos (1 exposto e 2 controle) e grupos etários predeterminados, para verificar se a diferença do percentual das frequências era estatisticamente significativa. Realizou-se teste de correlação de spearman para verificar se as variáveis idade e biomarcadores se correlacionavam. O teste de variância de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar as variáveis com os diferentes grupos etários predeterminados (subgrupo 1: 18-35 anos; subgrupo 2: 36-55 anos; subgrupo 3: 56-76 anos). Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%, admitindo um P bicaudal de 0,05, e portanto o nível crítico da hipótese nula foi fixado em $P = 0,05$. Os dados brutos bem como os resultados das avaliações e estatísticas ficarão disponíveis em papel e meio eletrônico. Os dados foram tabulados usando o programa MS

Excel (Microsoft Corporation® inc, versão 365) e a análise estatística foi realizada pelo software Sigmaplot (Systat Corporation® inc., versão 14.5).

7. RESULTADOS

O estudo consistiu em 48 indivíduos adultos de ambos os sexos, distribuídos em dois grupos: N = 24 para o grupo exposto (grupo 1) e N = 24 para o grupo controle (grupo 2). Com relação ao sexo, da amostra total (N = 48), 31 pertenciam ao sexo feminino (64,6%) e 17 ao sexo masculino (35,4%). O grupo estudo consistiu em uma amostra de 14 indivíduos do sexo feminino (58,3%) e 10 do sexo masculino (41,7%) com idades entre 21 e 60 anos, com uma média de idade de 40,5 anos. No grupo controle havia uma amostra com 17 indivíduos do sexo feminino (70,8%) e 7 do sexo masculino (29,2%) com idade entre 25 e 76 anos, com média de idade de 44,54 anos. Foi analisada também, a quantidade de indivíduos da população total, que pertenciam a subgrupos etários pré-estabelecidos: subgrupo 1 (18-35) com 14 indivíduos (29,2%), subgrupo 2 (36-54) com 25 indivíduos (52,1%) e subgrupo 3 (55-76) com 9 indivíduos (18,8%) dados disponibilizados na **tabela 3**.

Tabela 3 – Características demográficas

Variáveis	total (n)	Exposto (1)	Controle(2)
	48	24	24
sexo	n (%)	n (%)	n (%)
fem	31 (64,6)	14 (58,3)	17 (70,8)
mas	17 (35,4)	10 (41,7)	7 (29,2)
grupo etário (anos)			
1 (18-35)	14 (29,2)	6 (25)	8 (33,3)
2 (36-54)	25 (52,1)	15 (62,5)	10 (41,7)
3 (55-76)	9 (18,7)	3 (12,5)	6 (25)
média ± DP	42,5 ± 13,4	40,5 ± 11,5	44,5 ± 15,2

Análise descritiva com principais características demográficas dos indivíduos pertencentes ao estudo, com os dados demonstrados em percentual (%) para sexo e faixa etária, e média ± desvio padrão (DP) para idade.

O grupo 1(exposto) apresentou uma média de idade de $40,5 \pm 11,5$ anos e o grupo 2(controle) uma média de $44,5 \pm 15,2$ anos. O valor de $P = 0,300$ mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando avaliada a variável idade (**figura 22**).

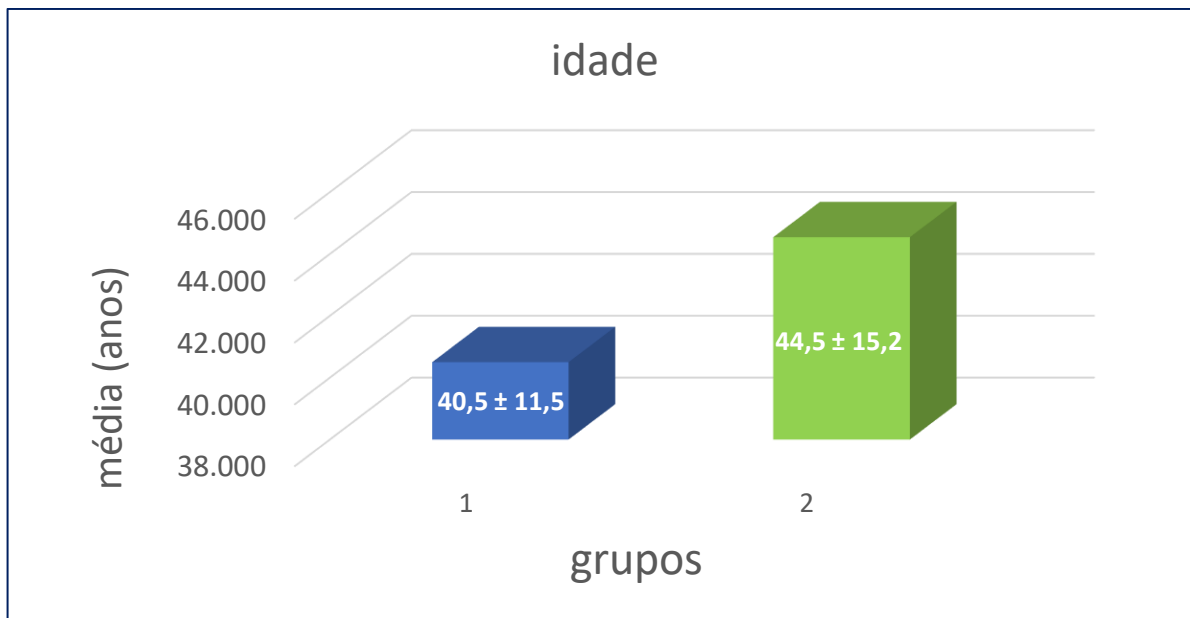


Figura 22 - Médias das idades obtidas, no grupo 1 (exposto) e grupo 2 (controle) para um nível de significância de 95%CI. Teste T de Student ($P=0,300$). Diferença de médias: $-4,0$ para o grupo 1.

Com relação aos percentuais encontrados nas variáveis sexo, idade e faixa etária, realizou-se o teste de associação quiquadrado, para verificar se em termos percentuais, as diferenças encontradas entre os grupos eram estatisticamente significantes. Em uma primeira análise, foi associada a variável sexo e os grupos do estudo, onde se demonstrou que a diferença de percentual não era significativa estatisticamente ($\chi^2 = 0,820$ e $P = 0,365$). Depois a associação entre grupos e faixa etária, também demonstrou não haver diferença percentual grande o suficiente para afirmar uma diferença estatística significativa ($\chi^2 = 2,286$ e $P = 0,319$).

Com essas análises ficou demonstrado que os achados percentuais encontrados quando se avaliou sexo, faixa etária e idade (média com desvio padrão), não apresentaram diferença

estatística, assim as amostras foram analisadas em conjunto independente do sexo, idade e faixa etária dos participantes.

Com relação a análise dos biomarcadores indicadores de morte celular, foi avaliada a frequência (n° de eventos) em uma contagem de 1000 células diferenciadas analisadas para cada amostra. Foi contabilizado o somatório (Σ) total de eventos para cada biomarcador no total de indivíduos, bem como apresentado o somatório para cada grupo (**tabela 4**).

Tabela 4 – Eventos relacionados a morte celular

	Morte celular			
Biomarcador	CC	CRX	PK	CRL
Σ do n° de eventos				
Total (n = 48)	2251	808	2509	907
Grupo exposto (n =24)	1196	469	1499	463
Grupo controle (n = 24)	1055	339	1010	444

Somatório do n° de eventos para cada biomarcador (Σ). CC (cromatina condensada), CRX (Carriorexe), PK (picnose) e CRL (cariólise) de acordo com cada grupo.

A análise estatística foi realizada considerando as frequências dos biomarcadores de morte celular apresentadas na **tabela 5**. Apesar de uma tendência a valores mais elevados em todas as variáveis no grupo exposto, as frequências quando comparados os dois grupos não foram estatisticamente significantes. Para melhor visualização e detalhes estatísticos, as frequências dos marcadores de morte celular estão graficamente apresentadas nas **figuras 23-26**.

Tabela 5 - Frequência dos biomarcadores relacionados a morte celular

Biomarcador		Média ± DP	valor de P
CC	1	49,8 ± 24,8	0,083
	2	43,9 ± 35,2	
CRX	1	19,5 ± 18,3	0,269
	2	14,1 ± 9,5	
PK	1	62,4 ± 61,0	0,063
	2	42,1 ± 31,1	
CRL	1	19,3 ± 11,5	0,893
	2	18,5 ± 10,4	

Análise descritiva com resultados das frequências dos biomarcadores de morte celular, com médias ± desvio padrão. Valor de P após comparação entre os grupos através de teste de Mann Whitney.

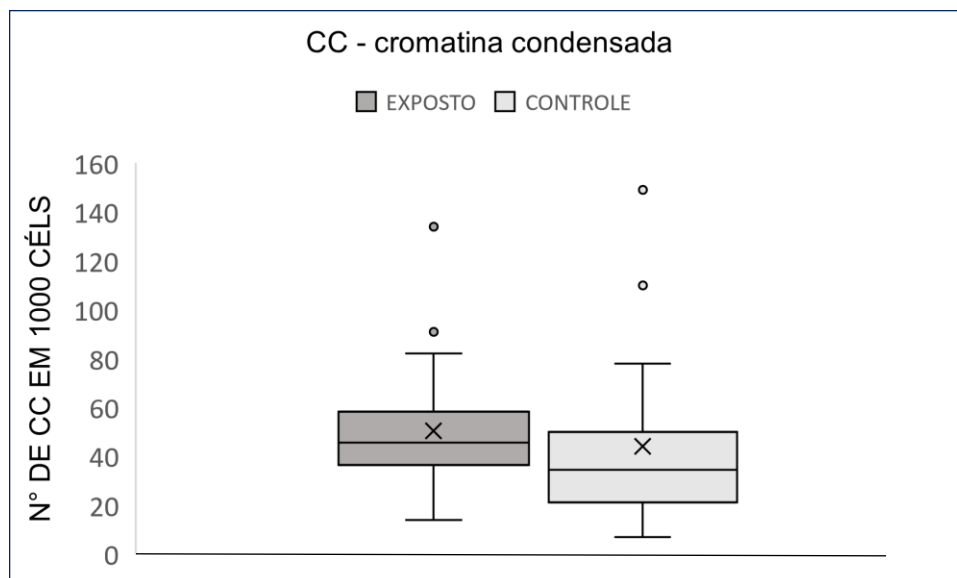


Figura 23– Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras. Teste de Mann Whitney (P = 0,083) para CC.

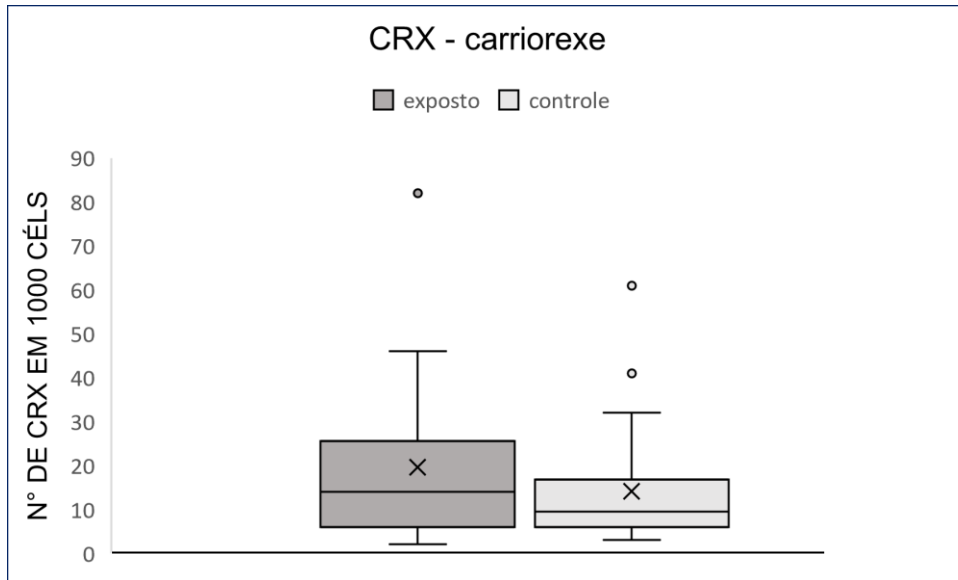


Figura 24 – Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras de CRX. Teste de Mann Whitney ($P = 0,269$)

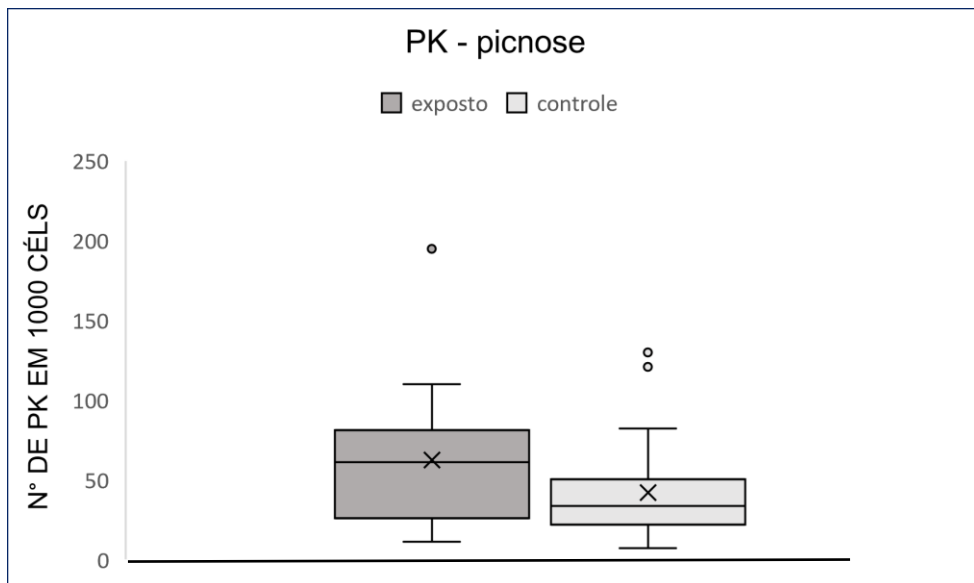


Figura 25 – Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras. Teste de Mann Whitney ($P = 0,063$)

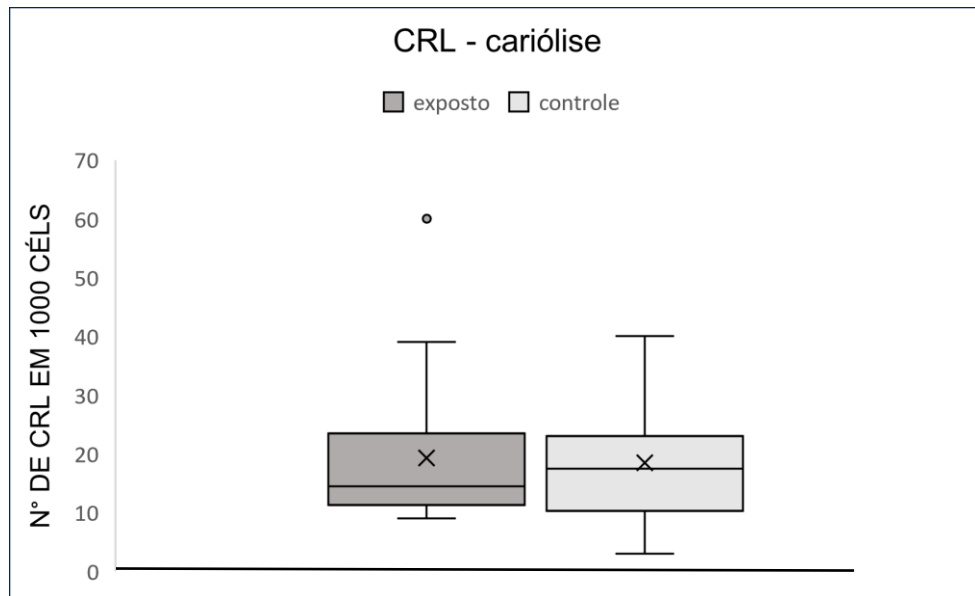


Figura 26 – Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras. Teste de Mann Whitney (P =0,893).

Dos biomarcadores relacionados a morte celular (CC, CRX, PK e CRL), a variável CRL foi a que apresentou a menor frequência de eventos no grupo exposto e a menor diferença de médias entre os grupos (0,79), enquanto as variáveis PK e CC apresentaram as maiores frequências no grupo exposto com diferenças de médias importantes, mas que não se confirmaram em significância estatística, apresentando valor de $P > 0,05$.

A **tabela 6** apresenta os eventos relacionados à instabilidade do DNA. Estes eventos incluíram a presença de micronúcleos (MNs), broto nuclear (NB), células binucleadas (BN) e broken egg (NP). Os resultados estão apresentados como o somatório (Σ) do número absoluto de eventos para cada biomarcador. As variáveis MNs, NB e BN apresentaram resultados maiores no grupo exposto significantes, enquanto a variável NP apresentou discreto aumento.

Tabela 6 – Número de eventos relacionados ao dano do DNA.

Instabilidade no DNA				
Biomarcador	MN	NB	BN	NP
Σ do n° de eventos				
Total (n = 48)	53	113	135	67
Grupo exposto (n = 24)	36	74	85	39
Grupo controle (n = 24)	17	39	50	28

Somatório do n° de eventos para cada biomarcador (Σ). MN (micronúcleos), NB (broto nuclear), BN (binucleadas) e NP(broken egg) de acordo com cada grupo.

As frequências dos biomarcadores foram relacionadas na **tabela 7**, com apresentação de média \pm desvio padrão. Quando os grupos foram comparados para analisar as frequências apresentadas pelas variáveis, os resultados demonstraram diferença significativa entre os grupos para MN, NB, e BN com frequência elevada no local exposto, apresentando significância estatística. Contudo, a variável NP apresentou ausência de diferença significativa.

As **figuras 27-30** apresentam as representações gráficas dos resultados e os detalhes estatísticos.

Tabela 7 – Frequência dos biomarcadores relacionados a instabilidade do DNA.

Biomarcador		Média ± DP	Valor de P
MN	1	1,5 ± 0,9	0,002*
	2	0,7 ± 0,8	
NB	1	3,1 ± 2,3	0,005*
	2	1,6 ± 1,9	
BN	1	3,5 ± 1,8	0,003*
	2	2,1 ± 1,2	
NP	1	1,6 ± 2,1	0,250
	2	1,2 ± 1,5	

Análise descritiva representada por frequências com média ± desvio padrão, com valor de P, após comparação entre os grupos através de teste de Mann Whitney. *valores significantes .

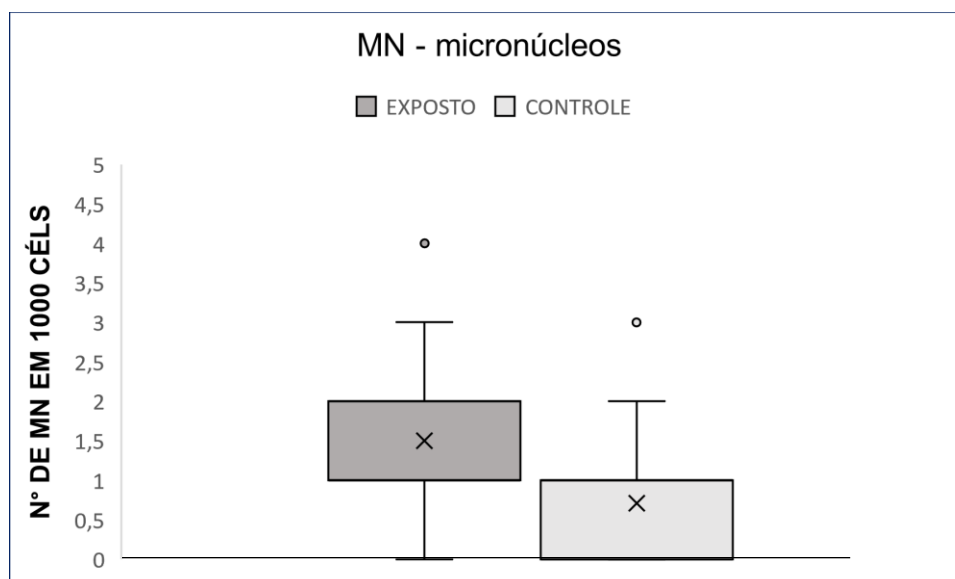


Figura 27 - Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras. Teste de Mann Whitney (P =0,002*)

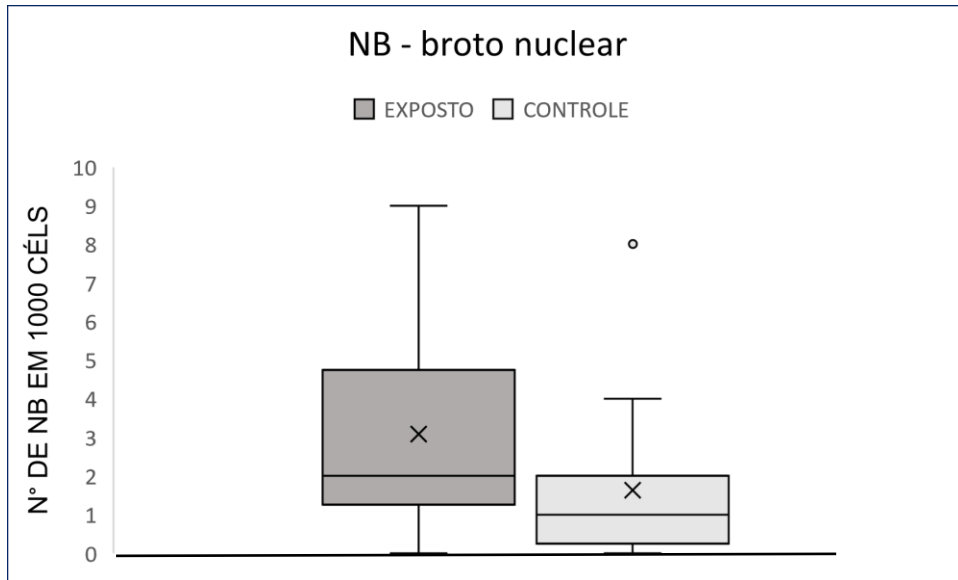


Figura 28 - Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras. Teste de Mann Whitney ($P = 0,005^*$)

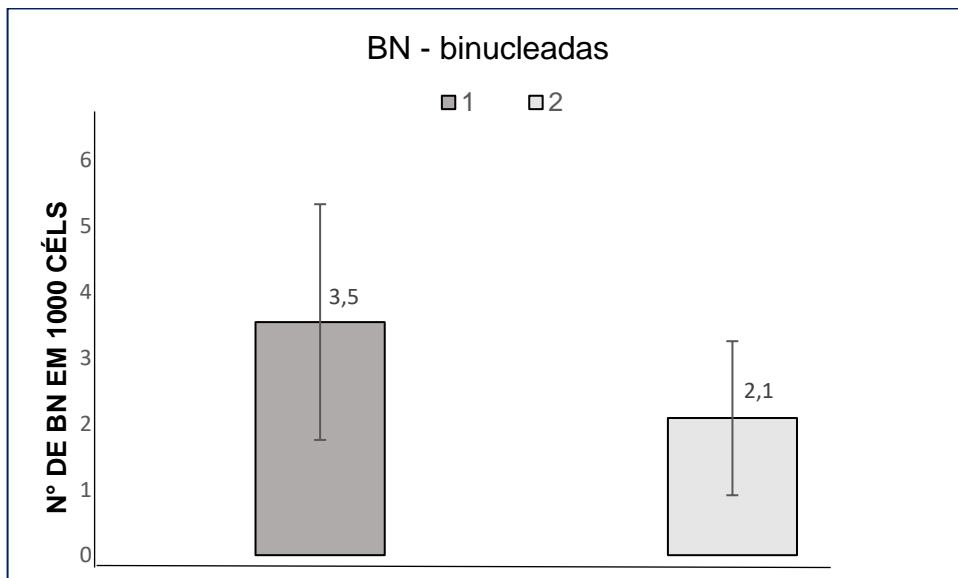


Figura 29 – Gráfico com diferenças de média, desvio padrão, com valor de $P = 0,003^*$ após comparação entre os grupos, através de teste T de Student.

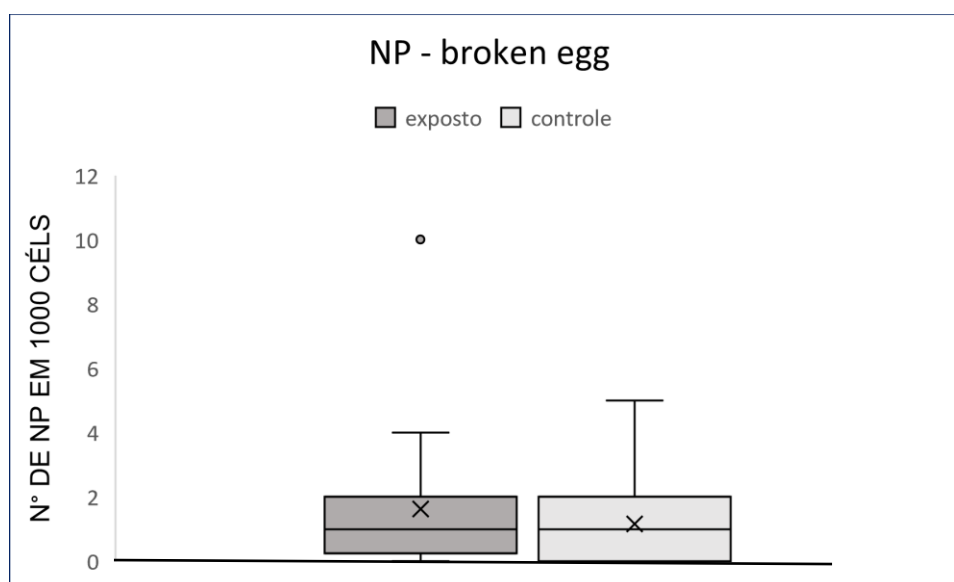


Figura 30 - Gráfico boxplot com as diferenças de média, distância interquartil e outliers das amostras, com valor de $P = 0,250$, após comparação entre os grupos através de Teste de Mann Whitney.

Nesse estudo o aumento na frequência da instabilidade genômica foi observada no grupo exposto, com aumento dos eventos de MN, NB e BN. Essas ocorrências sugerem comprometimento na viabilidade celular, causada por exposição exógena a agentes genotóxicos e pode ter induzido instabilidade no DNA com provável dano cromossômico.

Ainda nesse estudo, foi avaliada a frequência dos parâmetros (biomarcadores) em relação aos diferentes grupos etários predeterminados. Os indivíduos desse estudo foram separados em 3 grupos com faixas etárias distintas: grupo etário 1 (18-35) com 14 indivíduos, grupo etário 2 (36-55) com 25 indivíduos e grupo etário 3 (56-76) com 9 indivíduos. Os resultados não demonstraram diferença estatística significativa entre os grupos etários, não demonstrando nesse estudo, concordância entre o aumento da faixa etária e o aumento da frequência dos biomarcadores (**tabela 8**). Ainda para se estabelecer uma correlação entre idade e biomarcadores, foi realizado o teste de correlação de spearman, correlacionando primeiro todas as amostras do estudo ($n=48$) e depois correlacionando por grupo (exposto e controle), onde não se confirmou uma correlação significativa entre idade e biomarcadores conforme dados disponibilizados na **tabela 9**.

Tabela 8 – Análise entre as faixas etárias e a frequência de biomarcadores

	CRL	CRX	CC	PK	BN	MN	NB	NP
Quiquadrado	1,216	0,794	1,465	1,185	2,461	1,023	2,546	0,311
Significância (P)	0,544	0,672	0,481	0,553	0,292	0,600	0,280	0,856
Teste Kruskal Wallis Variável de Agrupamento: faixa etária								

Análise de variância de Kruskal Wallis para grupos etários e biomarcadores, valor de $P > 0,05$ não significativa.

Tabela 9 – Correlação entre idade e a frequência de alterações celulares

RÔ de Spearman	IDADE	CRL	CRX	CC	PK	BN	MN	NB	NP
Coeficiente de Correlação	1,000	-0,152	-0,105	-0,021	0,030	0,032	-0,165	0,146	0,050
Valor P		0,303	0,478	0,890	0,841	0,830	0,262	0,323	0,735
total n	48	48	48	48	48	48	48	48	48
Valor P	1,000	-0,278	-0,188	0,055	0,134	0,195	-0,078	0,259	0,167
exposto n	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Valor P	1,000	-0,043	0,119	-0,027	-0,001	0,036	-0,217	0,105	-0,045
controle n	24	24	24	24	24	24	24	24	24

Teste de coeficiente de correlação de Spearman – idade/biomarcadores. Valor de $P > 0,05$ não significativa.

A frequência dos biomarcadores pode variar quando avaliamos homens e mulheres (Bolognesi et al., 2015; Fenech et al., 2011; Los A Gutierrez., 2020). Então, foi analisada a frequência dos biomarcadores em relação ao sexo, e nesse estudo não foi encontrada diferença estatística significativa entre as variáveis. Com relação aos biomarcadores indicativos de instabilidade no DNA, as variáveis BN e NP apresentaram uma frequência de ocorrência

superior no sexo masculino e as variáveis MN e NB apresentaram a mesma frequência em ambos os sexos. Apesar de tendência, essas variações não atingiram valores estatisticamente significante ($P > 0,05$). Ao analisar os biomarcadores relacionados a morte celular (apoptose e CRL), também não se observou diferenças estatísticas entre os sexos ($P > 0,05$).

Os biomarcadores PK e CC, apresentaram frequências maiores no sexo feminino, enquanto a CRL apresentou frequência maior no sexo masculino, e ambos os sexos apresentaram a mesma frequência para a CRX.

Na **figura 31** imagens das alterações nucleares encontradas em participantes do grupo exposto e na **figura 32** do grupo controle.

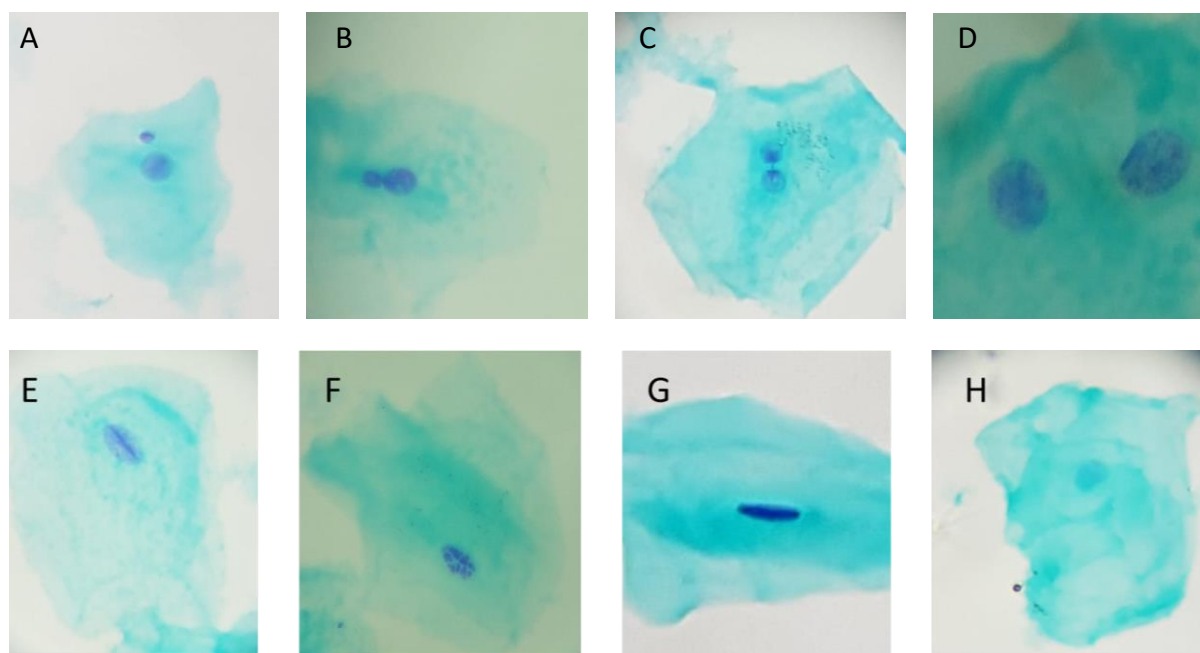


Figura 31 – Fotomicrografia de alterações do grupo exposto, aumento de 400x. Coloração de Schiff/fast green. A- MN, B – NB, C – NP, D – BN, E – CC, F – CRX, G – PK e H – CRL

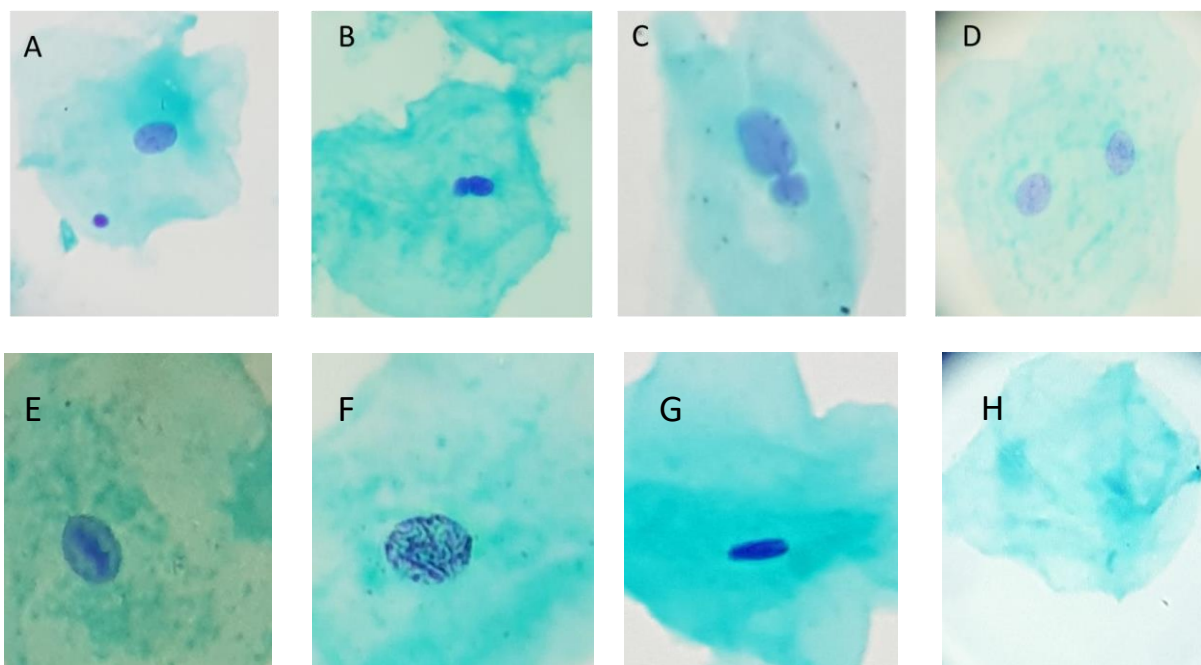


Figura 32 – Fotomicrografia de alterações do grupo controle, aumento de 400x. Coloração de Schiff/fast green. A- MN, B – NB, C – NP, D – BN, E – CC, F – CRX, G – PK e H – CRL

Como parte desse estudo, foram realizadas coleta de dados dos poluentes descritas no relatório de qualidade do ar, disponível no site da CETESB, na plataforma QUALAR e no relatório CETESB. (2020). Foram consultados os dados referentes aos poluentes monitorados pelas 3 estações de monitoramento da cidade de Cubatão (Vila Parisi, Centro e Vale do Mogi). Foi utilizada a opção de distribuição da qualidade do ar e relatório de ultrapassagens das metas intermediárias vigentes. O relatório levou em consideração as datas das coletas realizadas com a população exposta, que foi executada em 2 etapas (1ª etapa: 21/09/2020, 22/09/2020, 27/10/2020 à 30/10/2020 e 2ª etapa: 11/01 e 12/01).

Os padrões vigentes para o Estado de São Paulo no momento desse estudo foi a meta intermediária 1 (MI1). Em 19 de maio de 2021, de acordo com o Decreto estadual nº 59.113/2013, o CONSEMA convalidou Estudo Técnico desenvolvido pela CETESB e aprovou a entrada em vigor da Meta Intermediária 2 (MI2) a partir de 01 de janeiro de 2022.

Na 1ª etapa que compreendeu o período de 01/09/2020 a 20/10/2020, foram avaliadas as ultrapassagens medidas pelas estações de monitoramento de Cubatão: Vila Parisi, Centro e Vale do Mogi. Os quatro principais poluentes medidos nessas estações são: MP₁₀, SO₂, NO₂ e O₃, sendo que o poluente O₃ não é monitorado pela estação de Vila Parisi. Durante o período avaliado, foram relatados 3 dias de ultrapassagens do padrão de qualidade do ar, em virtude do

aumento do padrão diário de MP₁₀ (partículas inaláveis) na estação Cubatão-Vila Parisi. O índice de qualidade do ar nesse período com relação ao material inalável (MP₁₀) teve a sua classificação de moderada (N2) em vinte e cinco situações, ruim (N3) em 3 situações e muito ruim (N4) por 2 vezes. A meta intermediária (MI 1) estabelecida pelo PQAR foi ultrapassado em 3 situações representadas pelas máximas do período (172,00; 153,00; e 124,00 µg/m³). Com relação aos outros poluentes não houve episódios de ultrapassagem do PQAR, e com relação ao índice de qualidade do ar, ele foi classificado em duas situações como moderado para o O₃ e moderado em uma situação para o SO₂. A primeira etapa teve os seus parâmetros de ultrapassagens e índice de qualidade do ar descritos nas **tabelas 10 e 11** abaixo:

Sistema de Informação de Qualidade do Ar												
Relatório da Distribuição da Qualidade												
Data inicial: 01/09/2020 data final: 20/10/2020												
UGRHI: baixada santista Município: Cubatão Estação: todos												
MÊS	MP10 (Partículas Inaláveis)					NU	SO2 (Dióxido de Enxofre)					NU
	N1	N2	N3	N4	N5		N1	N2	N3	N4	N5	
Setembro	12	15	2	1	0	2	29	1	0	0	0	0
Outubro	8	10	1	1	0	1	20	0	0	0	0	0
Total	20	25	3	2	0	3	49	1	0	0	0	0
NO2 (Dióxido de Nitrogênio)												
	N1	N2	N3	N4	N5	NU	O3 (Ozônio)					NU
	N1	N2	N3	N4	N5		N1	N2	N3	N4	N5	
30	0	0	0	0	0	0	23	1	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	19	1	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	42	2	0	0	0	0

LEGENDA
N1 = BOA
N2 = MODERADA
N3 = RUIM
N4 = MUITO RUIM
N5 = PÉSSIMA
NU = Número de dias de Ultrapassagens do Padrão de Qualidade do Ar.

Tabela 10 – Relatório da qualidade do ar, rede de monitoramento Cubatão (Parisi, Centro e Vale do Mogi). Período de **01/09/2020 – 20/10/2020**. Fonte: QUALAR/CETESB.(disponível em: <https://qualar.cetesb.sp.gov.br/qualar/>. Acesso em 10/03/2021).

Sistema de Informação de Qualidade do Ar
Relatório de Ultrapassagens Data inicial: 01/09/2020 Data final: 20/10/2020

Parâmetro: MP₁₀ (partículas inaláveis)

ESTAÇÃO mp10	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	57	53	52	51	0	0	0	4
VILA PARISI	172	153	124	118	3	5	14	30
VALE DO MOGI	110	107	101	73	0	3	3	13

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 120,00 100,00 75,00 50,00

Parâmetro: NO₂ (dióxido de nitrogênio)

ESTAÇÃO no2	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	119	106	104	95	0	0	0	0
VILA PARISI	133	119	116	106	0	0	0	0
VALE DO MOGI	89	82	79	70	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 260,00 240,00 220,00 200,00

Parâmetro: O₃ (ozônio)

ESTAÇÃO o3	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	110	103	96	88	0	0	0	2
VALE DO MOGI	79	51	51	45	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 140,00 130,00 120,00 100,00

Parâmetro: SO₂ (dióxido de enxofre)

ESTAÇÃO so2	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	15	12	11	10	0	0	0	0
VILA PARISI	28	16	14	12	0	0	0	1
VALE DO MOGI	12	12	11	11	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 60,00 40,00 30,00 20,00

Tabela 11 – Relatório de ultrapassagens dos parâmetros: MP₁₀, NO₂, O₃ e SO₂. Sistema de informação de qualidade do ar. Período de **01/09/2020** – **20/10/2020**. Fonte: QUALAR/CETESB(disponível em: <https://qualar.cetesb.sp.gov.br/qualar/> acesso em10/03/2021).

No período da segunda fase de coleta, os parâmetros das concentrações dos poluentes avaliados, se mantiveram abaixo da MI 1 preconizada pelo PQAR, não acontecendo nenhuma ultrapassagem nas médias diárias de MP₁₀, SO₂, O₃ e NO₂, demonstrado nas **tabelas 12 e 13**. Em todo o ano de 2020 o PQAR foi ultrapassado apenas na estação de Vila Parisi (Cetesb., 2021).

Sistema de Informação de Qualidade do Ar														
Relatório da Distribuição da Qualidade														
Data inicial: 20/12/2020 data final: 10/01/2021														
UGRHI: baixada santista Município: Cubatão Estação: todos														
MÊS	MP10 (Partículas Inaláveis)						NU	SO2 (Dióxido de Enxofre)						NU
	N1	N2	N3	N4	N5	N1		N2	N3	N4	N5			
Dezembro	8	4	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	0	
Janeiro	6	4	0	0	0	0	9	1	0	0	0	0	0	
Total	14	8	0	0	0	0	19	3	0	0	0	0	0	

	NO2 (Dióxido de Nitrogênio)						NU	O3 (Ozônio)						NU
	N1	N2	N3	N4	N5	N1		N2	N3	N4	N5			
12	0	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	0	0	20	2	0	0	0	0	0	

LEGENDA
N1 = BOA
N2 = MODERADA
N3 = RUIM
N4 = MUITO RUIM
N5 = PÉSSIMA
NU = Número de dias de Ultrapassagens do Padrão de Qualidade do Ar.

Tabela 12 – Relatório da qualidade do ar, rede de monitoramento Cubatão (Parisi, Centro e Vale do Mogi). Período de **20/12/2020 – 10/01/2021**. Fonte: QUALAR/CETESB.(disponível em: <https://qualar.cetesb.sp.gov.br/qualar/> acesso em 10/03/2021).

Sistema de Informação de Qualidade do Ar
Relatório de Ultrapassagens Data inicial: 20/12/2020 Data final: 10/01/2021

Parâmetro: MP₁₀ (partículas inaláveis)

ESTAÇÃO mp10	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	29	28	28	26	0	0	0	0
VILA PARISI	89	62	62	62	0	0	1	8
VALE DO MOGI	44	41	38	36	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 120,00 100,00 75,00 50,00

Parâmetro: NO₂ (dióxido de nitrogênio)

ESTAÇÃO no2	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	77	61	55	54	0	0	0	0
VILA PARISI	102	57	54	50	0	0	0	0
VALE DO MOGI	74	73	61	60	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 260,00 240,00 220,00 200,00

Parâmetro: O₃ (ozônio)

ESTAÇÃO o3	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	112	105	98	93	0	0	0	2
VALE DO MOGI	59	57	56	55	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 140,00 130,00 120,00 100,00

Parâmetro: SO₂ (dióxido de enxofre)

ESTAÇÃO	Máximas				Nr. de Ultrapassagens			
	1ª	2ª	3ª	4ª	PQAR	MI2	MI3	MFinal
CENTRO	18	17	16	10	0	0	0	0
VILA PARISI	36	30	25	18	0	0	1	3
VALE DO MOGI	10	10	7	6	0	0	0	0

Referência: PQAR MI2 MI3 MFINAL
 60,00 40,00 30,00 20,00

Tabela 13– Relatório de ultrapassagens dos parâmetros: **MP₁₀, NO₂, O₃ e SO₂**. Sistema de informação de qualidade do ar. Período de **20/12/2020 – 10/01/2021**. Fonte: QUALAR/CETESB.(disponível em: <https://qualar.cetesb.sp.gov.br/qualar/> acesso em10/03/2021.

8. DISCUSSÃO

O estudo da mutagênese se iniciou no início do século XX e se intensificou em paralelo com o aprimoramento de técnicas citogenéticas. Ao longo das últimas décadas, o teste de MNs e mais precisamente o ensaio em mucosa bucal (BMCyt) proposto por Thomas et al. (2009) e refinado por Bolognesi et al. (2013), representou uma importante ferramenta no biomonitoramento, principalmente em populações expostas a contaminantes ambientais. Esse ensaio permite a avaliação de vários parâmetros relacionados à instabilidade no DNA e morte celular representada por aumento das variáveis envolvidas na degeneração celular por apoptose e necrose (Holland et al., 2008; Bonassi et al., 2011; Bolognesi et al.; 2013).

O epitélio da mucosa bucal é considerado um local importante de coleta e análise para o biomonitoramento, pois constitui rota direta de ingestão e inalação de poluentes presentes no ar. Esse estudo utilizou o Ensaio de MNs em mucosa bucal, utilizado para verificar instabilidade no DNA e morte celular para investigação de possíveis danos genotóxicos e citotóxicos de uma exposição ambiental. O modelo escolhido foi adaptado de Thomas et al. (2009), com modificações de Bolognesi et al. (2013).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que é possível utilizar a CBL para a realização do ensaio de MNs em células esfoliadas da mucosa bucal. A CBL proporcionou otimização no processamento das amostras que incluíram melhor preservação das células, maior agilidade no processamento, coloração mais estável e permitiu lâminas com uma disposição celular em sua superfície de alta qualidade facilitando as análises microscópicas das alterações. Constatações que foram também relatadas por Beerman et al. (2009), Norimatsu et al. (2012) e Ramos et al. (2014).

Bolognesi et al. (2015) relata uma utilidade potencial para o ensaio de MN em citoma de mucosa bucal na prevenção e pré-triagem de população com eventual risco para o desenvolvimento de câncer bucal. O câncer é o resultado de alterações nos genes e aberrações cromossômicas que acontecem em partes do DNA, relacionado com mecanismos de reparo do DNA, com processos que acontecem durante a morte celular induzidos por apoptose e/ou necrose e relacionado a proliferação/diferenciação celular que ocorre a nível de tecido epitelial. Sabe-se que mais de 90% dos tipos de câncer são de origem epitelial, não diferente, o tecido epitelial responde por mais de 95% de todos os casos de câncer de boca.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram maior ocorrência de biomarcadores relacionados a instabilidade do DNA no grupo exposto, incluindo MN, NB e BN. Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes nas variáveis relacionadas a morte celular (apoptose e necrose) entre os dois grupos.

A formação de MN por clastogênese (quebra de parte do cromossomo) ou aneugênese (disfunções do aparelho mitótico com perda de cromossomo), assim como o aparecimento de NB relacionada à amplificação dos genes e a BN que parece refletir um defeito de citocinese, sugerem que a exposição a contaminantes ambientais podem provocar alterações cromossômicas induzidas por genotoxicidade e citotoxicidade.

De acordo com Bonassi et al. (2011) a frequência espontânea de MN na mucosa bucal de indivíduos saudáveis é em torno de 0,74 em geral variando de 0,3-1,7. Para NB a frequência é de 1,36 e de BN de 3,04. Em relação a MN os resultados obtidos nesse estudo ficam dentro do intervalo basal sugerido por Bonassi et. al (2011) em ambos os grupos. No entanto, os achados obtidos com a variável NB se apresentaram bem maiores no grupo exposto em relação aos valores basais sugeridos, e a variável BN ligeiramente superior na exposição. Já os valores basais sugeridos por Rohr et al. (2020) em um estudo entre laboratórios de mutagênese realizado no Brasil, diferem muito dos valores desse estudo, por apresentarem valores basais maiores que os resultados obtidos para MN e BN. A frequência basal ainda é uma controvérsia nos estudos, não tendo uma padronização definida (Bolognesi et al., 2013; Rohr et al., 2020).

Muitos estudos têm demonstrado aumento no potencial genotóxico e citotóxico em populações expostas a contaminantes ambientais. Estudo semelhante a este conduzido por Federico et al. (2019) com população exposta a poluentes de petroquímica na Sicília, avaliou indicadores de dano cromossômico (MN, NB, NP) e de morte celular (PK, CRX e CRL), encontrando ocorrência de MN e CRL aumentada no grupo exposto, não apresentando alterações nas demais variáveis. O autor relaciona o aumento significativo de CRL a componentes citotóxicos nos poluentes presentes no ambiente, o que difere do nosso estudo que não encontrou diferenças significativas nos biomarcadores de citotoxicidade relacionados a morte celular. Entretanto, o aumento significativo de MN demonstrou o potencial genotóxico. Em estudo conduzido por De Los A Gutierrez. (2020) em participantes do grupo exposto em região de exposição a poluição industrial no centro de Buenos Aires, o dano genômico também estava presente com aumento significativo de MN. Também coincidente com os resultados do presente estudo, Alpire et al. (2019) também demonstraram aumento significativo na frequência

de MN em população vulnerável exposta a contaminação ambiental. Entretanto, os parâmetros de citotoxicidade (morte celular) não apresentaram diferença significativa. González-Santiago et al. (2021) em estudo com população exposta a poluentes do ar em região de petroquímica no México, encontrou aumento significativo da variável NB (dano no DNA) em população exposta, assim como as variáveis de morte celular também se apresentaram com aumento significativo.

As variabilidades encontradas nas frequências dos biomarcadores podem ser explicadas pela diferença existente nos níveis e tipos de contaminantes em cada região estudada.

Uma série de fatores de confusão relatados na literatura (hábito de fumar, consumo de álcool, exposição à radiação ionizante, exposição ocupacional, doenças sistêmicas, estilo de vida) foram considerados nesse estudo, sendo verificados no momento da seleção dos voluntários ao responderem questionário sociodemográfico. Voluntários com resposta positiva a algum fator de confusão mencionado no questionário não foram incluídos nesse estudo, com a intenção de diminuir o viés sistemático de amostra. Apenas os fatores de confusão idade e sexo foram aceitos na admissão dos voluntários e foram considerados nas análises dos resultados das amostras.

Ao avaliar o fator idade entre todos os participantes através de uma correlação entre biomarcadores e idade, esse estudo não encontrou diferença estatística significativa entre os grupos nas diferentes faixas etárias. Resultados semelhantes foram observados por De Los A Gutierrez. (2020), que também não encontrou diferença significativa ao correlacionar MN e idade, o mesmo acontecendo com o estudo de Federico et al. (2019). Por outro lado, é importante mencionar que outros estudos encontraram uma correlação positiva entre idade e biomarcadores de instabilidade no DNA e morte celular. Rohr et al. (2020), encontraram associação positiva entre idade e os parâmetros do BMCyt, mencionando a idade como um fator de confusão que pode ser considerado nos resultados. Em uma revisão do projeto colaborativo HUMNxl, Bonassi et al. (2011), demonstraram que a idade parece ser um fator que influencia os resultados na frequência de MN, sugerindo ainda que CRX e PK também parecem estar associadas com o aumento da idade, apresentando frequências mais altas em indivíduos mais idosos. Ainda, Ferraz et al. (2016) em seu estudo, avaliou o efeito da idade nas frequências de MN e alterações nucleares degenerativas, onde sugeriu a idade como fator para o aumento de genotoxicidade e citotoxicidade. Foram encontrados aumentos nas frequências de MN e de morte celular (CC, PK, CRX e CRL). As diferenças encontradas entre os diversos

estudos podem ocorrer como uma consequência da diversidade entre as populações dos estudos de Rohr et al.(2020) e Bonassi et al. (2011), que foram estudos colaborativos para se determinar frequência basal para as variáveis, enquanto Ferraz et al. (2016) investigaram população não exposta diretamente a poluição ambiental. Esses estudos sugerem que o envelhecimento pode estar associado a um aumento na instabilidade no DNA, no entanto, estudos adicionais são necessários para se avaliar o efeito da idade no aumento da frequência dos biomarcadores. Assim, em conjunto com os dados da literatura, nossos resultados sugerem que na população avaliada, exposta a poluentes do ar, a idade não constituiu fator determinante no aumento das alterações nucleares, indicando que o aumento na frequência dos biomarcadores de instabilidade no DNA no grupo exposto tem relação com a poluição do ar.

Ainda nesse estudo correlacionamos o sexo com os parâmetros avaliados. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre os sexos ao se correlacionar com os biomarcadores, podemos perceber uma leve tendência para alguns dos parâmetros. Quando avaliamos a instabilidade do DNA, conseguimos verificar uma frequência maior nas variáveis BN e NP para os homens, enquanto as variáveis MN e NB permaneceram iguais entre os sexos. Com relação aos parâmetros de morte celular, a PK e CC se apresentaram aumentadas nas mulheres, enquanto CRL nos homens, a CRX permaneceu igual em ambos os sexos.

Segundo Bonassi et al. (2011), em seu estudo, não foi possível perceber influência importante entre os sexos, no entanto ele verificou frequências menores de BN entre os homens, enquanto a CRX apresentou taxas mais elevadas. O que difere dos nossos achados. Ainda segundo De Los A Gutierrez. (2020), o seu estudo demonstrou aumento das frequências encontradas para MN e BN nos homens. Já Ferraz et al. (2016), ao analisar o sexo entre os participantes não verificou diferenças no grupo de indivíduos jovens, mas no grupo de idosos verificou aumento de CRX e CRL.

Os dados relacionados ao monitoramento ambiental são consolidados em relatórios de qualidade ambiental. As informações geradas pelo monitoramento fornecem uma base de dados importante para permitir avaliar a influência de fatores na qualidade do ar, possibilitando analisar medidas voltadas para a melhoria da qualidade ambiental. A qualidade do ar em Cubatão é determinada principalmente por fontes fixas (indústrias) o que difere de grandes centros urbanos. É importante constatar que as altas concentrações de poluentes são verificadas principalmente na área industrial (Cetesb., 2021). Informação que foi constatada pelas análises do banco de dados do QUALAR para o nosso estudo, onde se verificou que as maiores

concentrações de poluentes foram encontradas na estação de monitoramento da Vila Parisi, que tem a sua localização geográfica dentro de pátio industrial. Nessa estação as maiores concentrações foram verificadas com o material particulado inalável (MP₁₀), onde se verificou as ultrapassagens no PQAR no período compreendido desse estudo (172, 153 e 124 µg/m³ – PQAR para MP₁₀ =120 µg/m³). As outras estações de monitoramento consultadas não apresentaram nenhuma ultrapassagem do PQAR para a MI 1 estabelecida, e que vigora até o momento. Mesmo em situações com concentrações de MP estando dentro dos padrões estabelecidos verifica-se atividade de genotoxicidade, e efeitos danosos a saúde humana pode ser vista (Coronas et al., 2009). Estudo de Jasinski et al. (2011) na cidade de Cubatão, correlacionou aumento de internações hospitalares por doenças respiratórias e dados das concentrações de poluentes obtidos na CETESB, demonstrando aumento de internações em período coincidente com ultrapassagens de MP₁₀ e O₃.

9. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo, demonstraram que não houve diferença estatística significante quando avaliado os parâmetros de morte celular entre grupos, no entanto, houve diferença significante quando se avaliou biomarcadores de instabilidade do DNA, apresentando frequência de acontecimento maior no grupo exposto.

Nossos resultados indicam que a exposição a poluentes ambientais, como os encontrados na cidade de Cubatão/SP, podem potencialmente induzir a alterações celulares precoces relacionadas à instabilidade do DNA em células da mucosa bucal. Estas alterações não foram correlacionadas positivamente com idade ou sexo da população avaliada, indicando o possível efeito direto de agentes poluentes.

Nosso estudo, de caráter inédito na cidade de Cubatão até o momento, poderá fornecer informações para incentivar o planejamento de políticas públicas para o acompanhamento e monitoramento de população que vive em vulnerabilidade ambiental.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEM. Agência Metropolitana da Baixada Santista. Municípios que compõem a RMBS. [acesso 25 de outubro de 2019]. Disponível em: <http://www.agem.sp.gov.br>.

Alpire MES, Cardoso CM, Seabra Pereira CD, Ribeiro DA. Genomic instability in Buccal mucosal cells of children living in abnormal conditions from Santos-Sao Vicente Estuary. *Int J Environ Health Res.* 2019;31(2):179-185.

Alves, HPF. Análise da vulnerabilidade socioambiental em Cubatão-SP por meio da integração de dados sociodemográficos e ambientais em escala intraurbana. *R. bras. Est. Pop.* 2013;30(2): 349-66.

Alves LS, Santos LL, Couto ER. Distribuição das concentrações de Ozônio (O₃) na área de influência do polo industrial de Camaçari – Bahia: prováveis impactos à Saúde Humana e ao Meio Ambiente. *Revista Brasileira de Meio Ambiente.* 2020;8(1):113-30.

Amabis JM, Martho GR. *Biologia das células: reprodução e desenvolvimento.* 2ª ed. São Paulo: Moderna;2004. 175-184.

Andrade MC, Dos Santos JN, Cury PR, Flygare AC, Claudio SR, Oshima CT, et al. Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosal Cells from Municipal Solid Waste Collectors. *Anticancer Res.* 2017; 37(2): 849-52.

Antonio EL, Nascimento AJD, Lima AAS, Leonart MSS, Fernandes A. Genotoxicity and cytotoxicity of x-rays in children exposed to panoramic radiography. *Rev Paul Pediatr.* 2017;35(3):296-301.

Balogh MB, Fehrenbach MJ. *Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2012

Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol.* 2009;112(3):572-6.

Ben-Sade H, Samach A. Nuclear DNA Amounts. *Encyclopedia of Rose Science, Genetics.* 2003: 279–285.

Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-113.

Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015;766:20-31.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):625-31.

Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Burgaz S, et al. HUMNXL Project Consortium. State of the art survey of the buccal micronucleus assay-a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis.* 2009;24(4):295-302.

- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The human micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3): 88-97.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):297-308.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 005. Dispõe sobre o Programa Nacional de Controle da Poluição do Ar – PRONAR. Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 15 de junho de 1989.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 003. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 28 junho 1990.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 491. Regulamentação dos padrões de qualidade do ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 19 de novembro de 2018.
- Brito PHF, Araújo RS, Marinho G. Composição química do material particulado atmosférico: uma revisão de literatura. *Holos.*2018;4:62-74. [acesso 17 de novembro de 2020]. Disponível em: [http://www2.ifrn.edu.br < /ojs/index.php/HOLOS/article/view/4648](http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/4648)
- Carrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre.*2007; 48(1-3):77-81.
- Cesar GCA, Nascimento CFL, Carvalho AJ. Associação entre exposição ao material particulado e internações por doenças respiratórias em crianças. *Revista de Saúde Pública.* 2013;47(6):1209-12.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: Qualidade do ar.[acesso 25 de outubro de 2019]. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/informacoes-basicas/poluentes/>.
- CETESB. Dióxido de enxofre: ficha de informação toxicológica. Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental. 2012.[acesso 26 de outubro de 2019]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/servicos/informacoes-toxicologicas/>
- CETESB. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo no ano de 2018. [acesso 04 de novembro de 2019]. Disponível: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/publicacoes-relatorios/2019>
- CETESB. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo no ano de 2020. [acesso 10 de março de 2021]. Disponível: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/publicacoes-relatorios/2021>.
- Claudio SR, Simas JMM, Souza ACF, Do Carmo B DE AM, Yamauchi LY, Ribeiro DA. Genomic Instability and Cytotoxicity in Buccal Mucosal Cells of Workers in Banana Farming Evaluated by Micronucleus Test. *Anticancer Res.* 2019;39(3):1283-1286.
- Coronas MV, Pereira TS, Rocha JA, Lemos AT, Fachel JM, Salvadori DM, Vargas VM. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ Int.* 2009;35(7):1023-9.

- Da Silva CS, Rossato JM, Vaz Rocha JA, Vargas VM. Characterization of an area of reference for inhalable particulate matter (PM_{2.5}) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;778:44-55.
- Dapper SN, Spohr C, Zanini RR. Poluição do ar como fator de risco para a saúde: uma revisão sistemática no estado de São Paulo. *Estudos Avançados*.2016; 30(86): 83-97.
- De Los A Gutiérrez M, Palmieri MA, Giuliani DS, Colman Lerner JE, Maglione G, Andrinolo D, et al. Monitoring human genotoxicity risk associated to urban and industrial Buenos Aires air pollution exposure. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(12):13995-14006.
- Do Vale LDO, da Silva VHP, de Almeida FR, Ribeiro DA, da Silva DM. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in buccal mucosa cells of welders in the cities of Cubatão and Santos, state of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Med Trab*. 2017;15(4):303-309.
- EMPLASA. Planejamento Regional/RMBS/indicadores. Empresa Paulista de Planejamento Metropolitano S/A. [acesso 25 de outubro 2019]. Disponível: <https://emplasa.sp.gov.br>
- Federico C, Vitale V, La Porta N, Saccone S. Buccal micronucleus assay in human populations from Sicily (Italy) exposed to petrochemical industry pollutants. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(7):7048-54.
- Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*. 2011;26(1):239-45
- Ferraz GA, Costa ADO, Cerqueira EDMM, Meireles JRC. Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. 2016; 19:627-634.
- Freitas RM, Rodrigues AMX, Matos Júnior AF, Oliveira GAL. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal: uma revisão de literatura. *Rbac*. 2016;48(1):13-8.
- González-Santiago AE, Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Gutiérrez-Corral FJ, Zamora-Perez AL, Sánchez-Parada MG. Cytogenotoxicity Evaluation of Young Adults Exposed to High Levels of Air Pollution in a Mexican Metropolitan Zone Using Buccal Micronucleus Cytome Assay. *Biomed Res Int*.2021:6630861.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659 (1-2):93-108.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [acesso 25 de outubro 2019]. Disponível: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/cubatao/panorama>.
- Jasinski R, Pereira LAA, Braga ALF. Poluição atmosférica e internações hospitalares por doenças respiratórias em crianças e adolescentes em Cubatão, São Paulo, Brasil, entre 1997 e 2004. *Cad Saúde Pública*.2011; 27(11): 2242-52.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 9a Ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara e Koogan.2013

Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 2006;42(8):810-18.

Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet.* 2018;391(10119):462-512.

Longatto FA, Pereira SM, Di Loreto C, Utagawa ML, Makabe S, Maeda MY, et al. DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: Study in high-risk population with biopsy-based confirmation. *Gynecol Oncol.* 2005;97(2):497-500.

Loxham M, Davies DE, Holgate ST. The health effects of fine particulate air pollution. *BMJ.* 2019;367:l6609.

Meireles JRC, Lopes MA, Alves NN, Cerqueira EMM. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. *Revista Bras de Cancerologia* 2006;52(4):337-43.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res.* 2004;552(1-2):247-68.

Nanci AA. *Histologia oral Ten Cate: desenvolvimento, estrutura e função.* 8ª ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2013.

Norimatsu Y, Yanoh K, Kobayashi TK. The role of liquid-based preparation in the evaluation of endometrial cytology. *Acta Cytol.* 2013;57(5):423-35.

Pires, F. Vale da morte, foi o símbolo de Cubatão. 2012. [acesso 21 de outubro de 2019]. Disponível em: <http://www.valor.com.br/brasil/2570976/vale-da-morte-foi-o-simbolo-de-cubatao>.

Ramos MA, De Paula CF, Neto CS, Marques MM, Silveira HCS. Micronucleus evaluation of exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation. *Acta cytologica.* 2014;58(6):582-88.

Rohr P, Flesch G, Vicentini VEP, de Almeida IV, dos Santos RA, Takahashi CS, et al. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicology Letters.* 2020; 333: 242-50.

Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987;2(1):11-7.

Souto R, Borges FR, Da Cunha DMC, Vilanova-Costa CAST, Cruz AD. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. *Revista estudos vida e saúde.* 2010;37(3-4):297-307.

Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer.* 1982;30(5):553-9.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.

Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods in Molecular Biology.* 2011;682:235-48.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.

Tomaz BCA, Ferri RNS, Filho JB. Frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de pacientes anêmicos. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba.* 2016;18(4):214-220.

WHO. World Health Organization. Environmental and Social Determinants of Health [acesso 20 de outubro de 2019]. http://www.who.int/topics/environmental_health/es/

WHO Occupational and Environmental Health Team. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide : global update. 2005/ 2006. summary of risk assessment. World Health Organization. [acesso 20 de outubro de 2019]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69477>

WHO. WHO global urban ambient air pollution database.2018.[acesso 25 de outubro de 2019].https://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/.


Yanagi Y, Assunção JV, Barrozo LV. The impact of atmospheric particulate matter on cancer incidence and mortality in the city of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2012;28(9): 1737-48.

Yang P, Hao S, Gong X, Li G. Cytogenetic biomonitoring in individuals exposed to cone beam CT: comparison among exfoliated buccal mucosa cells, cells of tongue and epithelial gingival cells. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017;46(5):20160413.

Zhang X, Xiao X, Duan H, Gao F, Li Y, Niu Y. Cytotoxicity of diesel engine exhaust among the Chinese occupational population: a complement of cytokinesis-block micronucleus cytome. *Inhal Toxicol.* 2016;28(6):274-80.

11. ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Metropolitana de Santos

UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS - UNIMES				
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP				
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA				
Título da Pesquisa: ESTUDO DE GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM POPULAÇÃO EXPOSTA A POLUENTES AMBIENTAIS NA REGIÃO DO PÓLO PETROQUÍMICO DE				
Pesquisador: VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONCALVES				
Área Temática:				
Versão: 1				
CAAE: 29500720.3.0000.5509				
Instituição Proponente: Universidade Metropolitana de Santos - UNIMES				
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio				
DADOS DO PARECER				
Número do Parecer: 3.946.126				
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:				
Este estudo permitirá verificar como a poluição ambiental provoca alterações genéticas típicas na mucosa oral e que a análise de MNs e de outras anomalias nucleares podem contribuir para identificar tais alterações.				
Considerações Finais a critério do CEP:				
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:				
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1516017.pdf	22/02/2020 22:07:22		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	22/02/2020 22:06:10	VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	22/02/2020 22:05:17	VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONCALVES	Aceito
Folha de Rosto	Scan002.pdf	22/02/2020 22:00:30	VANESSA CRISTINA DE BRANCO GONCALVES	Aceito
Situação do Parecer: Aprovado				
Necessita Apreciação da CONEP: Não				
SANTOS, 31 de Março de 2020				
				
Assinado por: Sandra Kalil Bussadori (Coordenador(a))				

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "ESTUDO DE GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM POPULAÇÃO EXPOSTA A POLUENTES AMBIENTAIS NA REGIÃO DO PÓLO PETROQUÍMICO DE CUBATÃO, SP". O objetivo deste trabalho é estudar os efeitos mutagênicos da poluição ambiental em região próxima ao polo petroquímico de Cubatão e para propor o desenvolvimento de ações de prevenção através de biomarcadores em mucosa oral. Para realizar o estudo será necessário que o(a) Sr.(a) se disponibilize a participar do preenchimento do questionário e realize coleta de material da mucosa oral através de simples esfregaço (uma raspagem gentil da mucosa da bochecha), com uma escova cilíndrica, manobra conhecida como citologia esfoliativa, que se traduz em raspagem não invasiva e indolor. Os riscos da sua participação nesta pesquisa são mínimos, sem efeitos colaterais. Caso não se sinta à vontade, poderá desistir de participar a qualquer momento, sem que haja algum dano ou prejuízo para a sua pessoa. As informações coletadas serão utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste termo.

Os benefícios da pesquisa será a coleta de dados para verificar a incidência de alterações celulares em mucosa da cavidade oral, induzidas por agentes tóxicos da poluição ambiental, de maneira precoce, com o intuito de desenvolver ações de prevenção, promoção da saúde e biomonitoramento de população cronicamente exposta a agentes poluentes mutagênicos.

É garantida a liberdade da retirada do termo de consentimento de participação em qualquer etapa do estudo e com isso, as suas informações serão excluídas e destruídas, sem serem analisadas. A sua participação nesta pesquisa é voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração ou custos. Não será divulgada a identidade de nenhum dos participantes. Os dados colhidos serão utilizados única e exclusivamente aos objetivos propostos para o estudo.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através do telefone:(13) 99704-1808. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Metropolitana de Santos-UNIMES, Rua Conselheiro Nébias, 536, Encruzilhada, Santos/SP para obter informações sobre esta pesquisa e/ou sobre a sua participação, através dos telefones (13) 3228-3400.

Há duas vias neste termo, sendo que uma ficará com o pesquisador e a outra com o Sr. para futuras consultas. Desde já agradecemos!

Eu, _____, após ter sido esclarecido pelos pesquisadores e ter entendido o que está acima escrito, ACEITO participar da pesquisa.

Assinatura do participante da pesquisa: _____

Data: __/__/____.

Eu, Vanessa Cristina de Branco Gonçalves, aluna de Mestrado em Ciências da saúde e Meio Ambiente, orientada pela Prof.^a. Dr.^a. Mirian Boin, Professora do Curso de Mestrado da Universidade Metropolitana de Santos-UNIMES, declaro que obtive espontaneamente o consentimento deste sujeito de pesquisa para realizar este estudo.

Assinatura: _____ Data: __/__/____.