

O ensaio do micronúcleo em células da mucosa bucal: aplicabilidade em biomonitorização humana

The buccal micronucleus cytome assay: applicability in human biomonitoring

Rita Lopes Rosário^{1,2}, Ana Maria Tavares^{2,3}, Henriqueta Louro^{2,3}, Maria João Silva^{2,3}

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As exposições ambientais e ocupacionais a alguns agentes químicos ou físicos representam sérios riscos para a saúde humana. A biomonitorização humana (BMH) permite quantificar a exposição a substâncias químicas e seus efeitos precoces através da caracterização de biomarcadores de exposição e de biomarcadores de efeito. O ensaio do micronúcleo em células bucais (MNBMCyt) é um biomarcador precoce de genotoxicidade que permite identificar instabilidade cromossômica em células da mucosa oral, tendo vindo a encontrar uma aplicação crescente em estudos de BMH.

Nesta revisão pretendeu-se dar uma perspetiva da aplicação do MNBMCyt em estudos epidemiológicos realizados em contexto ambiental e ocupacional, com base em exemplos de estudos de BMH recolhidos através de pesquisa bibliográfica.

Globalmente, a facilidade da colheita e processamento da amostra, aliada à já existente harmonização de procedimentos de análise e à sensibilidade para deteção precoce de efeitos genotóxicos decorrentes da exposição a variados agentes químicos (p.ex., compostos orgânicos voláteis, metais, entre outros) e físicos (radiação ionizante) têm levado a propor a sua mais frequente inclusão em futuros estudos de BMH. Contudo, ainda permanecem algumas limitações analíticas (análise microscópica morosa) e necessidade de mais dados que permitam fortalecer a relevância e grau de confiança neste biomarcador, para reforçar a sua futura utilização para apoiar intervenções que visem prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas com a exposição a substâncias genotóxicas.

_Abstract

Environmental and occupational exposures to some chemical or physical agents pose serious risks to human health. Human biomonitoring (HBM) allows the quantification of exposure to chemical substances and their early effects through the characterization of exposure and effect biomarkers. The micronucleus (MN) assay in buccal cells (MNBMCyt) is a biomarker of early effect that allows the identification of chromosomal instability in oral mucosa cells, and has been increasingly used in HBM studies.

This review aimed to provide an overview of the application of MNBMCyt in epidemiological studies carried out in environmental and occupational settings, based on examples of HBM studies collected through literature search.

Overall, the simplicity of sample collection and processing, combined with the already existing harmonization of analysis procedures and the sensitivity for early detection of genotoxic effects from exposure to various chemical agents (e.g., volatile organic compounds, metals, among others) and physical agents (ionizing radiation) have led to the

proposal for its more frequent inclusion in future HBM studies. However, some analytical limitations (time-consuming microscopic analysis) and a need for more data to strengthen the relevance and degree of confidence in this biomarker have been also identified, in order to reinforce its future use to support interventions aimed at preventing the development of diseases related to exposure to genotoxic substances.

_Introdução

A biomonitorização humana (BMH) é uma ferramenta essencial na avaliação da exposição a substâncias químicas e dos seus impactos na saúde. Permite quantificar de forma fidedigna a exposição a produtos químicos através da análise das substâncias químicas, dos seus metabolitos ou dos produtos de reação em amostras biológicas (1). Enquanto a monitorização ambiental avalia a exposição externa, a BMH foca-se na dose interna atingida no organismo, tornando-se muito relevante para a identificação de grupos mais expostos ou mais vulneráveis, com vista a uma melhor orientação das ações de mitigação, quando necessárias (2). No domínio da saúde ocupacional, a BMH possibilita a análise tanto de exposições individuais como coletivas, a identificação de atividades ou processos associados a uma maior exposição, bem como a caracterização de efeitos precoces (pré-clínicos) e a avaliação da eficácia das medidas de proteção implementadas (3).

Os biomarcadores de efeito são cruciais para avaliar precocemente alterações biológicas ou bioquímicas no organismo associadas à exposição a produtos químicos, antes do aparecimento de doença, ajudando a entender a relação entre exposição e os seus efeitos. Alguns desses compostos são genotóxicos, isto é, possuem a capacidade de alterar, direta ou indiretamente, a função ou estrutura do DNA, interferindo,

por exemplo, na sua replicação (2). Os biomarcadores de genotoxicidade, como os que refletem alterações ao nível dos cromossomas, são essenciais na interpretação da associação entre a exposição, as lesões no DNA e o desenvolvimento de doenças a longo termo, como o cancro, entre muitas outras condições de saúde (4).

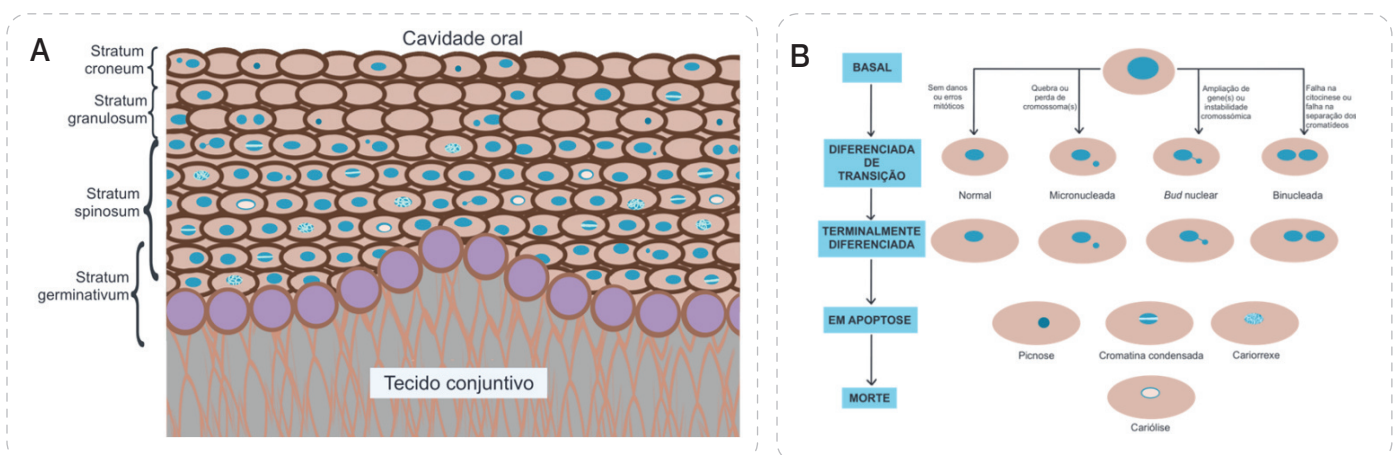
Os micronúcleos (MN), pequenos núcleos adicionais e independentes do núcleo principal da célula, surgem no citoplasma como resultado da perda/ganho de cromossomas inteiros que se segregam erroneamente durante a divisão celular, ou de quebras nos cromossomas. A frequência de MN é, por isso, um biomarcador fidedigno para avaliar a instabilidade cromossómica, indicando um efeito genotóxico (5,6). A análise de MN em linfócitos do sangue periférico é amplamente reconhecida como biomarcador de efeito em estudos de BMH. A análise de MN em células da mucosa bucal (MNBM) tem sido também utilizada na monitorização da exposição a agentes genotóxicos, particularmente por via oral ou inalatória, como por exemplo, em fumadores ativos ou passivos (7), consumidores de tabaco de mascar e trabalhadores de indústrias metalúrgicas e de reciclagem (8).

A mucosa bucal constitui uma barreira primária contra substâncias inaladas ou ingeridas, e as suas células epiteliais possuem ainda alguma capacidade de metabolizar substâncias

químicas, incluindo agentes carcinogénicos. As células da mucosa bucal têm ainda a particularidade de migrarem do estrato basal (*stratum germinativum*) até ao superficial (*stratum corneum*) num curto período de apenas 7 a 21 dias, durante o qual podem apresentar alterações nucleares resultantes de lesões no DNA causadas pelos compostos que contactaram com a mucosa bucal (8,9) (figura 1A e figura 1B).

Uma vez que as amostras de células bucais são colhidas de forma fácil e não invasiva, comparativamente a outras amostras biológicas (ex.: sangue), a sua utilização é vantajosa em estudos de BMH para investigar o impacto da exposição a agentes potencialmente genotóxicos na mucosa oral e, também, para analisar, a influência da nutrição, fatores de estilo de vida, etc. (8,10). Esta metodologia não requer cultura celular nem indução de divisão nuclear *ex vivo*, ao contrário da análise de MN em linfócitos. O MNBM evoluiu para o Ensaio do Citoma de Micronúcleos Buciais (MNBM Cyt) que oferece uma quantificação abrangente das alterações cromossómicas, falhas na citocinese e morte celular, além de outras anomalias nucleares, uma vez que as mesmas podem ser retidas ao longo da maturação e diferenciação celular bucal. Assim, é considerado um biomarcador muito útil e fidedigno para identificar efeitos genotóxicos, citostáticos e citotóxicos (5,6).

Figura 1: Representações esquemáticas da secção transversal da mucosa bucal, destacando os diferentes estratos celulares (a), e diferentes tipos celulares e possíveis alterações genéticas (b) [adaptado de Thomas, *et al.* (2009) e Bolognesi, *et al.* (2013), respetivamente].



A colheita de células bucais é realizada através de uma raspagem suave do revestimento interno da bochecha com uma espátula ou pequena escova. Após os procedimentos de fixação e coloração das células, a análise microscópica consiste na contagem do número de células bucais diferenciadas com MN e com vesículas nucleares (NBUDs), e são ainda contabilizadas células em diferentes estádios de diferenciação (**figura 1B**). É recomendada a análise de 1.000-3.000 células bucais para garantir robustez estatística na deteção de danos genéticos, dada a baixa frequência espontânea de MN (8-10). A recolha, através de um questionário, de dados demográficos e fatores de saúde e estilo de vida dos participantes permite depois contextualizar os resultados citogenéticos obtidos na análise microscópica e estatística.

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo reunir alguns exemplos da vasta literatura existente sobre a aplicação do ensaio de MN em células bucais na BMH, para a deteção de potenciais efeitos genotóxicos e citotóxicos associados a diversas exposições ambientais e ocupacionais. Pretendeu-se contribuir para uma análise crítica dos resultados obtidos com o MNBM Cyt, bem como para a discussão do seu papel futuro como um biomarcador de efeito, tendo em conta a ligação entre exposição e efeitos na saúde humana.

_Aplicação do ensaio MNBM Cyt em estudos de exposição ambiental

Na **tabela 1** apresenta-se um resumo dos principais resultados dos estudos analisados no âmbito da exposição ambiental ou associada a estilos de vida.

Dois estudos relataram aumentos significativos na frequência de MN e NBUDs bucais em populações expostas ao arsénio através do consumo de água (11), e ao arsénio em combinação com o fumo do tabaco (12), o que está em linha com o potencial carcinogénico desses agentes químicos (11,12). Inclusivamente, foram observados efeitos sinérgicos decorrentes da co-exposição ao arsénio e tabaco (12). Naderi e colaboradores (2012), mostraram que indivíduos fumadores apresentam uma maior frequência de MN bucais em compa-

ração com não fumadores, reforçando assim as evidências de que o tabagismo pode causar alterações cromossómicas na mucosa oral. Contudo, não foi encontrada uma correlação significativa entre o número de pacotes de tabaco por ano e a frequência de MN bucais (13). Este estudo é particularmente relevante para destacar que o estilo de vida, particularmente o tabagismo (mesmo a níveis moderados), pode induzir alterações genéticas detetáveis.

Num estudo realizado em populações residentes perto de uma exploração mineira, observaram-se frequências mais elevadas de todos os parâmetros medidos pelo MNBM Cyt em populações expostas a resíduos de minas de carvão, comparativamente às populações não expostas, embora não se tenha observado uma correlação significativa entre os níveis de exposição e as frequências de MN em células bucais. Os resultados indicaram, contudo, correlações significativas entre as frequências de MN bucais e dados de outros biomarcadores de genotoxicidade, nomeadamente o Comet Assay e o ensaio de MN em linfócitos. Este estudo reforça a necessidade de monitorizar os danos genéticos em populações expostas a este tipo de poluentes ambientais (14), e que o MNBM Cyt pode complementar ou substituir outros biomarcadores de efeito.

Relativamente à exposição a poluentes do ar, um estudo realizado em estudantes universitários saudáveis, mostrou uma relação direta entre a exposição ao ozono (O₃), um potente indutor de stress oxidativo, e o aumento da frequência de MN bucais, tendo-se observado um aumento de 39% na população mais exposta durante a estação do ano com maior concentração de O₃ (15). Assim, este estudo sublinha a importância de fatores sazonais na avaliação de biomarcadores de genotoxicidade. Efeitos semelhantes foram também observados por Demircigil e colaboradores (2013) quando investigaram os efeitos da exposição a poluentes resultantes do tráfego urbano. Nesse estudo, amostras de células bucais colhidas em crianças de duas escolas em áreas de tráfego urbano e tráfego suburbano foram comparadas em estações do ano distintas tendo-se observado uma frequência mais elevada de MN bucais nas crianças da escola na área urbana durante o verão (quando os níveis de O₃ são mais elevados)



e uma relação inversa com os testes de função pulmonar. Estes resultados indicam que a exposição à poluição do ar e a sazonalidade podem ter um impacto considerável na saúde e no desenvolvimento das crianças (16). Ceretti e colaboradores (2014) descreveram também elevados valores de MN bucais em crianças residentes numa cidade com elevados níveis de tráfego urbano (17). Outros autores compararam valores de MN bucais em crianças residentes perto e longe de indústrias de produção de óleo de palma (18). Estes dois estudos revelaram a existência de uma associação fraca, mas estatisticamente significativa, entre a frequência de MN (e outros biomarcadores) e a concentração de partículas PM₁₀, PM_{2.5} (17,18) e de NO₂ (17). Assim, a exposição precoce das crianças a estas emissões poluentes pode aumentar o risco de sintomas respiratórios e de desenvolvimento de doenças crónicas, como o cancro, a longo prazo (17,18), evidenciando a necessidade de reduzir essa exposição para prevenir problemas de saúde no futuro.

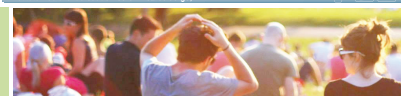
Aplicação do ensaio MNBMCyt em estudos de exposição ocupacional

Na **tabela 2** apresenta-se um resumo dos principais resultados dos estudos analisados no âmbito da exposição ocupacional a agentes potencialmente genotóxicos.

Em trabalhadores expostos a compostos orgânicos voláteis (VOCs), como n-hexano, tolueno, metiletilcetona e formaldeído (FA), em indústrias de calçado e em laboratórios de anatomia patológica, observou-se uma frequência significativamente mais elevada de MN bucais, em comparação ao grupo de controlo (19,20). A amostragem do ar nas zonas de ar respirável das trabalhadoras em questão suportou a associação entre exposição ocupacional ao FA, amplamente usado neste tipo de laboratórios, e os danos genéticos observados. Para além disso, o aumento da frequência de MN bucais foi muito superior ao aumento de MN em linfócitos no grupo exposto comparativamente ao controlo, evidenciando a sensibilidade do ensaio MNBMCyt (20). Observou-se também uma relação significativa entre a duração da exposição e a frequência deste biomarcador, o que sugere um efeito cumulativo (21). A exposição a VOCs noutros seto-

res industriais, como pintura, causou também um aumento significativo na frequência de MN e em células bucais relativamente a um grupo de controlo. Ao estratificar os trabalhadores por tipo de atividade foi ainda possível observar que os efeitos da exposição ocupacional variam de acordo com a tarefa desempenhada, com os pintores de rolo a apresentarem frequências significativamente mais elevadas de MN e NBUDs bucais em relação aos pintores de *spray* (22). Outro estudo analisou trabalhadores com atividades associadas à exposição a VOCs presentes em poeiras de tintas. Por exemplo, a exposição a este tipo de compostos por trabalhadores de flexografia (FWs) refletiu-se em frequências elevadas de MN bucais. Neste estudo, a influência do hábito tabágico também foi analisado e observou-se que os FWs expostos apresentaram um aumento significativo de MN bucais (23). Contudo, essa influência não parece ser geral e poderá ser aparente apenas em “grandes fumadores” ou em associação com a exposição a outros compostos químicos. Efetivamente, no estudo de Vital e colaboradores (2020), a exposição a fumo passivo (FP) em trabalhadores de restaurantes e bares não causou diferenças significativas na frequência de MN e NBUDs bucais entre os grupos expostos e não expostos ao FP. Contudo, foi observada uma correlação positiva entre a frequência de MN bucais e a de MN em linfócitos no grupo exposto a FP (24).

Relativamente à exposição a metais, em fundições de cobre observou-se uma associação entre a exposição ao arsénio e o aumento da frequência de MN bucais e de MN em linfócitos (25). Este estudo enfatiza a relevância do uso complementar de diferentes biomarcadores de efeito, como o MNBMCyt e os MN em linfócitos de sangue periférico e a associação existente entre ambos. A exposição a resíduos de equipamentos eletrónicos (*e-waste*), incluindo metais e compostos orgânicos, foi também associada com um aumento significativo da frequência de MN bucais e outros parâmetros, como células binucleadas e células cariolíticas (indicadoras de morte celular), em trabalhadores de indústrias de reciclagem (informal) de *e-waste*. O aumento da frequência de MN bucais apresentou também uma correlação direta com o período de exposição ao *e-waste* (26).



Existem ainda dados do ensaio MNBM_{Cyt} em trabalhadores expostos a radiação, por exemplo em estações de energia nuclear (27) e na área da medicina nuclear (28), evidenciando frequências de MN bucais mais elevadas do que os controlos. Os dados sugerem que este biomarcador é capaz de detetar também efeitos precoces decorrentes da exposição ocupacional a baixas doses de radiação ionizante.

Em suma, todos estes estudos mostram a sensibilidade do ensaio MNBM_{Cyt} para deteção de efeitos genotóxicos precoces associados à exposição ocupacional a agentes físicos e químicos, incluindo VOCs, metais e suas misturas, havendo, nalguns estudos, indícios de um efeito cumulativo na indução de MN. Para além disso, poderá ser utilizado para identificação de grupos mais suscetíveis ou de atividades industriais que representem maior risco para a saúde do trabalhador.

Muitos outros estudos da literatura demonstram o potencial e a aplicabilidade do ensaio MNBM_{Cyt} como biomarcador de efeito em contexto ocupacional, tendo uma revisão sistemática recente identificado 121 estudos em trabalhadores, num total de 561 estudos descrevendo a aplicação deste ensaio (29). Apesar disso, também são apontados alguns desafios metodológicos (30). A diversidade de variáveis relacionadas com colheita, coloração e critérios de análise, entre outras, pode comprometer a exatidão dos dados (8). Assim, existe uma necessidade de uniformização contínua dos protocolos deste ensaio, para garantir resultados confiáveis, comparáveis e reprodutíveis (8,9). Para reduzir essa variabilidade, têm sido desenvolvidos protocolos padronizados que garantam consistência na identificação de células e biomarcadores entre laboratórios, como o projeto HUMNXL, em que foram definidos protocolos e critérios de avaliação para o MNBM_{Cyt} (6,9,10). Para além disso, estudos de comparação interlaboratorial como o de Rohr e colaboradores (2020) têm visado harmonizar o protocolo de MNBM_{Cyt} e identificar possíveis fontes de variabilidade em estudos de BMH. Os seus resultados salientaram a necessidade de uma maior padronização nos critérios de análise, principalmente nos parâmetros de morte celular, e foi demonstrada também a importância deste tipo de exercícios comparativos para garantir a consistência e fiabilidade dos resultados (31).

Tabela 1: Principais dados e resultados do ensaio MNBMcyt identificados em artigos referentes a exposições ambientais e associadas a estilos de vida (tabagismo).

Exposição	Tamanho da População amostrada	Localização	Sexo	Idade Média/ Intervalo (anos)	Frequência de biomarcadores	Significância estatística	Observações adicionais	REF.
Arsénio inorgânico na água potável	n=65	Santa Ana Nazareno, México	F, M	20-60	(MN/1000 células) 2,21 ± 0,47 (grupo exposto) 0,56 ± 0,13 (controlo)	Sim ($p < 0,05$)	Correlação entre MN e lesões cutâneas; tabagismo não associado a indução de MN.	(11)
Tabaco e arsénio	n=138	Sul de Assam, Índia	F, M	22-42	3,46 ± 0,27 (Tab + Ars) 1,96 ± 0,15 (Ars) 2,06 ± 0,17 (Tab) 0,2 ± 0,08 (controlo)	Sim ($p < 0,001$) (Ars) Sim ($p < 0,001$) (Tab)	Sinergismo entre exposição a arsénio e ao fumo do tabaco na indução de MN e NBUDs em células bucais: Sim ($p < 0,001$)	(12)
Tabaco	n=63	Universidade Shahed, Irão	F, M	I: 34,78 ± 11,73 II: 40,26 ± 12,43 C: 37,75 ± 17,25	(MN/2000 células) MN= 1,89 ± 0,62 (Grupo I) MN= 2,01 ± 0,93 (Grupo II) MN= 0,94 ± 0,94 (Controlo)	Sim ($p < 0,002$) não fumadores Vs, fumadores Não ($p < 0,6$) fumadores < 10 Vs, > 10 anos	[Grupo I= Fumadores < 10 anos Grupo II= Fumadores > 10 anos Controlo= Não fumadores] Nº pacotes/ano não afeta MN	(13)
Poliuição do ar (resíduos de carvão)	n=139	Nordeste Colômbia	F, M	Expostos: 18-62 Controlo: 18-57	(MN/2000 células) 4,79 ± 5,30 (grupo exposto) 1,38 ± 1,54 (controlo)	Sim ($p < 0,001$)	-	(14)
Poliuição do ar (tráfego urbano)	n=126	Universidade de California, Berkeley, Los Angeles, São Francisco	F, M	-	(MN/1000 células) LA outono= 1,17 LA primavera= 0,70 SF outono= 0,87 SF primavera= 0,76	Sim ($p < 0,001$) ≠ SF/LA na mesma estação Sim ($p < 0,05$) ≠ outono/primavera no mesmo local	Forte efeito da estação em MN ($p < 0,01$)	(15)
Matéria particulada	n=194	Eskişehir, Turquia	F, M	9-13	(MN/2000 células) Escola A Verão= 2,78 ± 2,00 Escola A Inverno= 2,11 ± 1,70 Escola B Verão= 2,68 ± 1,99 Escola B Inverno= 1,64 ± 1,59	Sim ($p < 0,05$) verão Vs, inverno escola B Não ($p > 0,05$) ≠ estações escola A Não ($p > 0,05$) escola A Vs, escola B	Frequências CMN ↑ significativamente com ↓ níveis de função pulmonar	(16)
Matéria particulada	n=167	Semenyih, Selangor	F, M	9-11	(MN/2000 células) 4,00 ± 3,00 0,50 ± 1,00 (controlo)	Sim ($p = 0,001$)	Sim, positiva moderada: PM10 - frequência de MN ($r = 0,562$; $p = 0,001$).	(18)

r = coeficiente de correlação de Pearson (quanto mais próximo o valor de r estiver de 1 ou -1, mais forte a relação linear); p = p-value.
 Ars – grupo de indivíduos exposto a arsénio; LA – Los Angeles; SF – Baía de São Francisco; Tab – grupo de indivíduos exposto a tabaco; Tab+Ars – grupo de indivíduos exposto a arsénio e a tabaco;
 Escola A – suburbana; Escola B – urbana.
 * derivado do resultado de uma análise conjunta de 321 crianças com até 9 anos de idade⁽³⁹⁾.

Tabela 2: Principais dados e resultados do ensaio MNBMcyt identificados em artigos referentes a exposições ocupacionais.

Exposição	Tamanho da População amostrada	Localização	Sexo	Atividade	Idade (Média/Intervalo)	Frequência de biomarcadores	Significância estatística	Observações adicionais	REF.
Pesticidas	n=108	Hyderabad, Índia	F,M	Trabalhadores indústria de pesticidas	35,1 ± 5,2 33,4 ± 5,5 (controlo)	(MN/2000 células) 1,24 ± 0,72 0,32 ± 0,26 (controlo)	Sim (p<0,05)	Exposição = 10 e > 10 anos = ↑ frequência de MN (p<0,05)	(19)
	n=68	Universidade de Ancara e Gazi, Turquia (controlo)	F,M	Trabalhadores indústria de calçado	29,5 ± 8,34 (grupo I) 29,68 ± 5,37 (grupo II) 31,10 ± 8,77 (controlo)	(MN/3000 células) 0,62 ± 0,45% (grupo I) 0,71 ± 0,56% (grupo II) 0,33 ± 0,30% (controlo)	Sim (p<0,05) grupo I Vs. controlo Sim (p<0,05) grupo II Vs. controlo	[Grupo I- trabalhadores de calçado Grupo II- trabalhadores de laboratórios de anatomia e patologia Controlo- trabalhadores universidade]	(20)
FA	n=80	Portugal	F	Técnicos de laboratório de anatomia e patologia	20-61	(MN/1000 células) 0,71 ± 0,12 0,12 ± 0,06 (controlo)	Sim (p<0,05)	Sim: MN linfócitos grupo exposto (3,51 ± 0,35) vs. controlo (1,71 ± 0,25); p<0,05	(21)
	n=64	Cidades de Teerão e Rasht, Irão	F,M		35,65 ± 3,22 33,12 ± 4,51 (controlo)	(MN/500 células) 18,33 ± 12,36 10,55 ± 6,22 (controlo)	Sim (p=0,003)	Sim: duração exposição - frequência média de MN e nº total de MN em CMN (p=0,03)	(22)
Compostos voláteis e solventes orgânicos em poeiras de tintas	n=200	-	M	FWs	20-40	(MN/1000 células) 1,86 ± 1,77 (FWs F) 1,02 ± 1,08 (FWs NF) 1,26 ± 1,33 (controlo F) 0,62 ± 0,92 (controlo NF)	Sim (p=0,002) FWs F Vs. FWs NF Sim (p=0,029) FWs F Vs. controlo F Sim (p<0,001) FWs F Vs. controlo NF Não (p= 0,381) FWs F Vs. controlo F	-	(24)
	n=50	L'Aquila, Itália	M	Trabalhadores construção civil	≥40	(GMN/1000 células) 19,79 ± 3,54 4,95 ± 7,11 (controlo) (Céls. binucleadas/1000) 13,93 ± 2,10 8,96 ± 1,29 (controlo) (Céls. cariolíticas/1000) 2,09 ± 1,71 1,18 ± 0,38 (controlo)	Sim (p<0,001) Sim (p<0,001) Sim (p<0,05)	Tabaco: variável significativa	(5)
Arsênio	n=83	Polónia	M	Trabalhadores fundições de cobre	19-62	(MN/2000 células) 0,88 ± 0,76 0,50 ± 0,52 (controlo)	Sim (p≤0,05)	Sim: MN linfócitos grupo exposto (7,96 ± 4,28) Vs. controlo (3,47 ± 1,70); p<0,05	(25)
Compostos orgânicos voláteis	n=35	Region Marche, Itália	M	Pintores	39,05 ± 8,16	(MN/2000 células) 0,89 ± 0,90 0,05 ± 0,15 (controlo)	Sim (p≤0,05)	Não: pintores spray - MN Sim: pintores de rolo (p<0,001)	(23)
Fumo de Tabaco Passivo	n=81	Lisboa, Portugal	F,M	Empregados de restaurantes e bares	37,2 ± 10,8 (E) 39,1 ± 11,1 (F) 45,2 ± 12,2 (controlo)	(MN/1000 células) 0,69 ± 0,90 (E) 0,48 ± 0,59 (F) 0,49 ± 0,80 (controlo)	Não (p=0,306) E Vs. C	Sim: MNC bucais Vs. MNBC em PBL (p=0,003)	(7)
Produtos radioativos	n=45	-	F,M	Trabalhadores estações energia nuclear	25-67	(MN/1000 células) 0,20 ± 41 (controlo) 2,93 ± 1,43 (grupo II) 7,73 ± 2,71 (grupo III)	Sim (p<0,05) Grupo III Vs. outros Sim (p<0,05) Grupo II Vs. Grupo I	[Controlo = não expostos Grupo II= trabalhadores NPS Grupo III= pacientes c/leucemia]	(27)
Radiação ionizante	n=81	Hospital do Divino Espírito Santo, Açores, Portugal	F,M	Profissionais de saúde	44,8 ± 1,4 44,5 ± 1,8 (controlo)	(MN/2000 células) 5,3 ± 0,6 1,3 ± 0,21 (controlo)	Sim (p<0,001)	Baixas doses IR = ↑ 80% frequência de CMN	(28)
E-waste	n=92	Payatas, Filipinas	F,M	Trabalhadores reciclagem e-waste	34,25 ± 12,34 34,5 ± 9,24 (controlo)	(MN/%) 84% 16% (controlo)	Sim (p=0,00)	-	(26)

r = coeficiente de correlação de Pearson (quanto mais próximo o valor de r estiver de 1 ou -1, mais forte a relação linear); p = p-value, CMN – Células micronucleadas; E – grupo de trabalhadores exposto a fumo passivo; F – Fumadores; FWs – trabalhadores de flexografia; MN – células binucleadas micronucleadas; MNC – células micronucleadas; NF – Não fumadores; NPS – estações de energia nuclear.

Conclusões

Este artigo visou dar uma perspetiva da aplicabilidade da análise de MN em células da mucosa bucal, ou ensaio MNBM Cyt, em estudos de BHM envolvendo indivíduos expostos a uma variedade de agentes químicos e físicos, em contextos ambientais e ocupacionais. Este ensaio tem vindo a afirmar-se como um biomarcador de efeito vantajoso, pela facilidade da colheita e transporte de amostras, aliada à sua sensibilidade para deteção de efeitos genotóxicos e de outras alterações nucleares e celulares. Trata-se, assim, de uma análise acessível, não invasiva e altamente aplicável na deteção precoce de potenciais efeitos com repercussão na saúde a longo prazo, já com algum grau de padronização de protocolos, o que é crucial para assegurar a consistência dos dados. Apesar disso, é também um ensaio moroso por requerer uma análise microscópica minuciosa, reconhecendo-se a enorme vantagem de se desenvolverem métodos automatizados para a sua análise. Existem ainda lacunas de conhecimento que devem ser abordadas em estudos futuros, como a necessidade de compreender melhor a biologia e os efeitos da cinética celular bucal, nomeadamente ao nível da taxa mitótica e da sua influência sobre a frequência de MN e a influência de fatores de confundimento como idade, género, estilo de vida, estação do ano, entre outros.

Assim, apesar da sua grande potencialidade, reconhece-se também a necessidade da realização de estudos adicionais que forneçam mais evidências que permitam ultrapassar as limitações apontadas. Para além disso, a realização de estudos que explorem a relação entre MN em células bucais e outros biomarcadores de genotoxicidade, por exemplo, MN em linfócitos, serão fundamentais para validar o uso do ensaio MNBM Cyt em estudos de BMH. Complementarmente, a realização de mais estudos prospetivos que permitam estabelecer uma associação entre uma frequência elevada de MN em células bucais e um maior risco de desenvolvimento de doença, permitirá fortalecer a relevância e grau de confiança neste biomarcador, reforçando a sua futura utilização para apoiar intervenções que visem prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas com a exposição a substâncias genotóxicas.

Referências bibliográficas:

- (1) Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 May;210(3-4):201-28. Epub 2007 Mar 21. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.024>
- (2) Bergamaschi E, Canu IG, Prina-Mello A, et al. Chapter 6 - Biomonitoring. In: Fadeel B, Pietrousti A, Shvedova AA (eds). *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. 2nd ed. Academic Press, 2017, pp. 125-58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809199-9.00006-9>
- (3) Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett*. 2010 Jan 15;192(1):3-16. Epub 2009 May 13. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.001>
- (4) Ladeira C, Smajdova L. The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genet*. 2017 Aug 11;4(3):166-91. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.3.166>
- (5) Leonardi S, Poma AM, Colafarina S, et al. Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Oct 15;203:110989. Epub 2020 Jul 18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110989>
- (6) Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 24;21(4):1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- (7) Vital N, Antunes S, Louro H, et al. Environmental Tobacco Smoke in Occupational Settings: Effect and Susceptibility Biomarkers in Workers From Lisbon Restaurants and Bars. *Front Public Health*. 2021 Jun 4;9:674142. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.674142>
- (8) Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):93-108. Epub 2008 Apr 11. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- (9) Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, et al. 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 Oct-Dec;753(2):100-13. Epub 2013 Aug 11. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>
- (10) Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37. Epub 2009 May 7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
- (11) Gonshebbat ME, Vega L, Salazar AM, et al. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res*. 1997 Jun;386(3):219-28. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00009-4)
- (12) Roy P, Mukherjee A, Giri S. Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytome assay and comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016 Feb;124:169-76. Epub 2015 Oct 27. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.019>
- (13) Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012 Oct-Dec;55(4):433-8. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.107774>
- (14) Espitia-Pérez L, da Silva J, Brango H, et al. Genetic damage in environmentally exposed populations to open-pit coal mining residues: Analysis of buccal micronucleus cytome (BMN-cyt) assay and alkaline, Endo III and FPG high-throughput comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018 Dec;836(Pt B):24-35. Epub 2018 Jun 4. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.002>
- (15) Chen C, Arjomandi M, Qin H, et al. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*. 2006 Mar;21(2):131-7. Epub 2006 Mar 2. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel007>
- (16) Demircigil GÇ, Erdem O, Gaga EO, et al. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014 Jan;21(2):1197-207. Epub 2013 Jul 25. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2001-6>
- (17) Ceretti E, Feretti D, Viola GC, et al. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS One*. 2014 May 2;9(5):e96524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096524>



artigos breves_ n. 10

- (18) Othman SF, Jalaludin J, Hisamuddin NH, et al. Association of Exposure to PM2.5 and PM10 with DNA Damage in Exfoliated Buccal Mucosa Cells among Primary School Children Living Nearby Palm Oil Activity at Semenyih, Selangor. *Malaysian J Med Health Sci* 2019;15(4):130-35.
<https://core.ac.uk/download/pdf/286784251.pdf>
- (19) Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res.* 2006 Oct 10;609(1):74-80. Epub 2006 Aug 2. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.06.022>
- (20) Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, et al. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers.* 2002 Mar-Apr;7(2):151-61. (Erratum in: *Biomarkers.* 2006 Jul-Aug;11(4):383).
<https://doi.org/10.1080/13547500110113242>
- (21) Costa S, Brandão F, Coelho M, et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal cells in formaldehyde exposed workers. IN: *Environmental Health Risk VII. WIT Transactions on Biomedicine and Health.* 2013 Apr 16;16:83-92
<https://doi.org/10.2495/EHR130081>
- (22) Akhlaghi G, Shahsavari F, Ghorbanpour M. Formalin Induced Micronucleus Formation in the Buccal Mucosa of Pathology Laboratory Workers. *Iran J Pathol.* 2023;18(4):425-32. Epub 2023 Oct 15.
<https://www.doi.org/10.30699/IJP.2023.1989457.3062>
- (23) Cavallo D, Ursini CL, Fresegna AM, et al. Occupational Exposure in Industrial Painters: Sensitive and Noninvasive Biomarkers to Evaluate Early Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Apr 27;18(9):4645.
<https://www.doi.org/10.3390/ijerph18094645>
- (24) Kumar PN, Reginald BA, Reddy BS, et al. Assessment of Cytogenetic Damage in Flexographic Workers: Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *Indian J Occup Environ Med.* 2023 Jan-Mar;27(1):17-20. Epub 2023 Mar 31.
https://www.doi.org/10.4103/ijoem.ijoem_106_22
- (25) Lewińska D, Palus J, Stepnik M, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2007 Apr;80(5):371-80. Epub 2007 Feb 3. <https://www.doi.org/10.1007/s00420-006-0130-7>
- (26) Berame JS, Lapada AA, Miguel FF, et al. Micronucleus Evaluation in Exfoliated Human Buccal Epithelium Cells among E-Waste Workers in Payatas, the Philippines. *J Health Pollut.* 2020 Dec 7;10(28):201213.
<https://www.doi.org/10.5696/2156-9614-10.28.201213>
- (27) Sagari SG, Babannavar R, Lohra A, et al. Micronuclei frequencies and nuclear abnormalities in oral exfoliated cells of nuclear power plant workers. *J Clin Diagn Res.* 2014 Dec;8(12):ZC15-7. Epub 2014 Dec 5.
<https://www.doi.org/10.7860/JCDR/2014/9059.5240>
- (28) Aguiar Torres L, Dos Santos Rodrigues A, Linhares D, et al. Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2019 Feb;838:54-58. Epub 2018 Dec 19. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.009>
- (29) Hopf NB, Bolognesi C, Danuser B, et al. Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2019 Jul-Sep;781:11-29. Epub 2019 Mar 8. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.006>
- (30) Fenech M, Knasmueller S, Nersesyan A, et al. The buccal micronucleus cytome assay: New horizons for its implementation in human studies. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024 Feb-Mar;894:503724. Epub 2024 Jan 6.
<https://www.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503724>
- (31) Rohr P, da Silva GF, Vicentini VEP, et al. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicol Lett.* 2020 Oct 15;333:242-50. Epub 2020 Aug 22. <https://www.doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.08.011>
- (32) Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, et al. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011 Nov-Dec;728(3):88-97. Epub 2011 Jul 8. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>