



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE ANTI-SÉPTICOS
BUCAIS – *IN SITU*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil para obtenção do Grau de Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular.

André Wiltgen

Orientadora: Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

CANOAS
Maio/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN) dos Programas de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular e em Genética e Toxicologia Aplicada da Universidade Luterana do Brasil, subvencionado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida que me possibilita aprender, ensinar e compartilhar com todos, à todo momento.

À Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade, em primeiro lugar, pela coragem de aceitar a difícil missão de ensinar e orientar um aluno que chegou sem a devida experiência no campo da Genética e, ao longo do tempo, com muita dedicação e paciência, conseguiu transformá-lo em alguém capaz de concluir um curso nesta área. A você, só me resta dizer que: os verdadeiros mestres são aqueles que se dedicam ao que fazem, porque o fazem com prazer, sendo incansáveis na tentativa de ensinar, estando sempre solícitos quando se faz necessário, responsáveis e justos em suas cobranças e ainda, capazes de serem compreensivos, conselheiros, amigos, enfim... Humanos. Por todas estas virtudes demonstradas durante nosso convívio, muito obrigado.

Ao Prof. Maurício Lehmann, pela sua voluntariosa colaboração para a elaboração deste trabalho e pela amizade construída neste período – afinal, somos os únicos integrantes do laboratório a dividirmos as glórias de um clube Campeão do Mundo FIFA.

À Biba, pelo carinho, amizade e pela forma serena como auxiliou nesta pesquisa, tornando leve um fardo que para muitos, seria um verdadeiro suplício.

À Dra. Viviane do Souza de Amaral, que incentivou e acompanhou este trabalho desde seu início. Meu fraterno abraço, amiga. Boa sorte.

Aos meus amigos gremistas do Laboratório do TOXIGEN, Guilherme, Rafael, Ronaldo e Fernanda, que proporcionaram condições para que se desenvolvesse esta pesquisa. Obrigado pelo apoio e por tornar mais descontraídas as manhãs e tardes no laboratório.

À Rafael Vargas, pela convivência, pelo interesse demonstrados no auxílio à coloração das lâminas, bem como, no recrutamento dos pacientes.

À todos os pacientes que se dispuseram a colaborar com este estudo e desta forma, permitiram a execução desta pesquisa.

À todos os professores do curso, pela dedicação, pelos ensinamentos e exigências necessárias para que esta etapa pudesse ser superada.

Aos meus colegas de curso, pelo carinho, motivação e o alegre convívio que tivemos durante este período, em especial, para meus amigos André, Cristiano, Eloir, Eduardo, Fabiana (Fabi) e Fabrício.

Aos meus colegas da Radiologia, Carlos, Célia, Juliana, Naiara, Sérgio, Vânia, que sempre me incentivaram de todas as maneiras para que eu pudesse iniciar esta etapa. Bem amigos, graças ao apoio de todos, tanto pelo exemplo que se constituem para mim, quanto pelo suporte que obtive de cada um de vocês durante estes dois anos, estou concluindo esta jornada. Quero frisar que é um prazer enorme fazer parte deste grupo. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas de trabalho, Álvaro e Miriam, que se desdobraram em esforços para manter a organização e a operacionalidade do consultório. A vocês meus amigos, fica o meu agradecimento, pois nunca deixaram de ser solidários e compreensivos com a situação.

Aos meus pais, a quem devo todo amor, carinho e respeito por tudo que já fizeram por mim, cada qual ao seu modo, sem medir esforços – mesmo quando os entraves da vida nos colocam à prova a própria condição de viver - sem deixar de acreditar, por uma vez se quer, na felicidade de seus dois filhos. Vocês serão para sempre nosso exemplo.

A minha irmã, pelo incentivo de buscar novos horizontes e pela ajuda nos momentos de dificuldade - quando por algumas vezes, o “horizonte parecia muito distante da minha realidade”.

A minha amada esposa, Claudine, por todo o apoio, paciência e compreensão que foram necessários durante esta jornada. O teu amor e tua confiança foram indispensáveis para que fosse vencida mais esta etapa da minha vida profissional. Por isso, a ti dedico este trabalho.

ÍNDICE

Resumo.....	07
Abstract.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Anti-sépticos Bucais	11
1.1.2. Cloreto de Cetilperidínio.....	14
1.1.3. Clorexidina.....	15
1.1.4. Triclosan.....	17
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Agentes Químicos.....	19
3.2 Amostra.....	19
3.3 Análise de Micronúcleos.....	20
3.4 Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Efeitos Colaterais Relacionados a Presença de Álcool.....	23
4.2 Estudos Preliminares.....	26
4.3 Incidência Espontânea de Micronúcleos.....	27
4.4 Incidência de Micronúcleos nos Grupos Tratados.....	29
5. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO.....	34
6. BIBLIOGRAFIA.....	36

RESUMO

Neste trabalho foram investigadas, *in situ*, as potencialidades genotóxicas de três anti-sépticos bucais de uso corrente em Odontologia - Cepacol[®] (Cloreto de cetilpiridínio 0,05%), Periogard[®] (Digluconato de clorexidina 0,12%) e Plax[®] (Triclosan 0,03%), utilizando a análise da incidência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. O estudo está centrado na resposta de 30 pacientes do sexo masculino, não fumantes, abstêmios de álcool, que foram divididos em três grupos de 10 indivíduos: Grupo I- Cepacol[®]; Grupo II- Periogard[®]; Grupo III- Plax[®]. Os diferentes colutórios foram aplicados, durante 7 dias - através de bochechos de 1 minuto duas vezes ao dia. Passados 10 dias do final dos tratamentos foram realizadas as coletas de células de mucosa da bochecha (lados direito e esquerdo). Os pacientes incluídos nestes grupos foram também usados como controle negativo, já que antes do início dos tratamentos foi feita a coleta de células esfoliadas.

Os pacientes tratados com Cepacol[®] foram os que apresentaram a maior frequência de MN (0,06), assim como o maior desvio padrão. Entretanto quando estes valores foram comparados com o controle negativo, pelo teste de Wilcoxon Signed-Ranks, não foi obtida diferença estatisticamente significativa (P=0,102). Esta resposta está diretamente relacionada ao fato de que do total de 6 MN, 4 foram induzidos em um único paciente. Já no grupo Plax[®] observou-se uma frequência de 0,02 (distribuídos em dois indivíduos) e no Periogard[®] de 0,01 micronúcleos - com ausência de significância em ambos os grupos - com valores de P iguais, respectivamente, a 0,157 e 0,317. Os dados do presente trabalho sugerem que os três colutórios não são indutores de mutações

cromossômicas, relacionadas a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros. No entanto a confirmação destes achados depende do aumento no número de pacientes analisados nos tratamentos com os três colutórios.

ABSTRACT

This study investigates the genotoxic potentials *in situ* of three mouthwashes currently used in dentistry: Cepacol™ (0.05% cetylpyridinium chloride); Periogard™ (1.12% chlorhexidine digluconate); and Plax™ (0.03% triclosan), by analyzing the incidence of micronuclei (MN) in buccal mucosa cells. The response of 30 abstemious, non-smoker males was assessed. The study population was divided into three groups of ten subjects as follows: Group I – Cepacol™; Group II – Periogard™; and Group III – Plax™. Mouthwashes were used twice a day, as 1-minute gargling, for 7 days. Ten days after the end of the treatment, cells of the cheek mucosa were collected (right and left sides) by exfoliation. The same patients included in this tests also served as negative controls, by having cells collected before the beginning of treatment.

Patients of Group 1 (treated with Cepacol™) presented the highest MN frequencies (0.06) and the highest standard deviation, but no statistically significant difference was observed for the comparison of these results with those of the respective negative control ($P=0.102$) by the Wilcoxon Signed-Ranks test. This response is directly related to the fact that from the total MN found (six), four were induced in one single patient. As for Group III (Plax™), the MN frequency observed was 0.02 (distributed between two subjects), while for Group II (Periogard™) MN frequency was 0.01 micronuclei. No statistical significance was observed in any of the two groups, with P values 0.157 and 0.317, respectively. The results suggest that the three mouthwashes are not inducers of chromosomal mutations related to the loss of fragments or of whole chromosomes. However, more research is needed to corroborate these results for larger populations of subjects treated with the three mouthwashes.

1. INTRODUÇÃO

O envolvimento de microorganismos na etiologia das doenças que acometem o órgão dental e principalmente, seu tecido de sustentação – periodonto - está diretamente vinculado à instalação e progressão da placa bacteriana, tendo como consequência a doença periodontal e cárie, assim como, infecções peri-implantares e estomatites (Slots, 1977; Socransky *et al.*, 1988; Dahlén, 1992; Rosan e Lamont, 2000; Ximenez-Fivie *et al.*, 2000; Eto *et al.*, 2003).

De fato, a placa bacteriana, também denominada biofilme, pode ser definida como uma película não calcificada, fortemente aderida às superfícies dentais, cuja comunidade microbiana se dispõe em agrupamentos ou colunas - formando uma estrutura permeável à saliva, ao fluído gengival e aos líquidos da dieta - que se infiltram e se acumulam, propiciando o seu crescimento contínuo (Genco *et al.*, 1997; Rosan e Lamont, 2000; Wilson, 2001).

A colonização inicia-se por um grupo de microorganismos gram-positivos facultativos, seguida por uma sucessão de outras espécies, culminando com o aparecimento de bactérias gram-negativas anaeróbias (Xie *et al.*, 2000). A virulência da placa bacteriana depende da presença ou do aumento de microorganismos específicos, que produzem substâncias eficazes em mediar à destruição dos tecidos do hospedeiro (Loesche e Syed, 1978). Ainda que aproximadamente 500 diferentes espécies de bactérias habitem a cavidade bucal a maioria dos microorganismos é comensal - apenas uma pequena fração destes, são patógenos oportunistas causadores de doenças sistêmicas (Paster *et al.*, 2001). No entanto, as interações microbianas estão diretamente relacionadas ao quadro patológico - quando as associações favorecem a colonização de

espécies potencialmente virulentas temos a chamada associação positiva. Já associações antagonistas a esta colonização, chamadas negativas, favorecem a manutenção do quadro de saúde (Socransky *et al.*, 1988).

A gengivite crônica é uma doença inflamatória resultante da presença de bactérias localizadas na margem gengival. Apresenta sinais e sintomas clínicos que variam entre indivíduos e entre sítios de uma mesma dentição. As características clínicas comuns incluem presença de placa bacteriana, eritema, edema, sangramento, sensibilidade, ausência de perda de inserção e reversibilidade após a remoção da placa bacteriana (Eto *et al.*, 2003). Assim, o sucesso do seu tratamento depende de uma higiene oral satisfatória, que consiste em controlar a placa bacteriana supra-gengival (Axelson e Lindhe, 1986; Korman, 1986) - não apenas pela remoção mecânica, via escovação e utilização de fio-dental (Addy, 1986; Fischman, 1997; Jackson, 1997; Moran, 1997), mas pelo uso racional de agentes anti-placa - visto que a placa bacteriana é o maior fator etiológico da gengivite, com alta prevalência nas populações, assim como, um fator etiológico relevante para o desenvolvimento da periodontite.

1.1. Anti-sépticos Bucais

Os anti-sépticos bucais são considerados biocidas de amplo espectro de ação, destruindo ou inibindo o crescimento microbiano, difundindo-se através do biofilme para alcançar seus diversos alvos (McDonnell e Russell, 1999). Sua formulação é constituída de três elementos básicos - álcool, detergentes e agentes aromatizantes, associados a um ingrediente ativo específico (Forward *et al.*, 1997):

- Álcool: utilizado para ressaltar o impacto do sabor, solubilizar o ingrediente ativo e preservar a formulação;
- Detergentes: aumentam o efeito antimicrobiano, auxiliam na efetividade do ingrediente ativo e na remoção de detritos bucais;
- Agentes aromatizantes: proporcionam a sensação de "hálito fresco" e determinam o sabor do colutório. O Eucaliptol e o Mentol são exemplos de aromatizantes utilizados.
- Ingrediente ativo: substância diretamente ligada à efetividade do colutório bucal. Clorexidina, Triclosan, Cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais são os agentes freqüentemente empregados na maioria dos anti-sépticos bucais disponíveis.

Independentemente da substância anti-placa, à disposição do profissional como meio auxiliar na promoção da saúde bucal, alguns aspectos gerais referentes aos agentes antimicrobianos devem ser considerados tanto para a sua seleção como para o seu emprego (Torres *et al.*, 2000):

a) toxicidade: a maioria dos agentes antimicrobianos, por serem inespecíficos, podem provocar efeitos colaterais. Portanto, sua interação com os tecidos bucais deve ser bem conhecida, e a sua segurança deve ser comprovada;

b) permeabilidade nos tecidos: deve ser baixa, considerando os efeitos sistêmicos destas substâncias para a saúde;

c) microbiota residente: não deve provocar desequilíbrios, pois isto levaria a outras doenças decorrentes da proliferação de microrganismos oportunistas;

d) substantividade (retentividade) – para que tenha o efeito desejado,

a substância deve ser retida no local de ação (superfície dental, gengiva, mucosa bucal) e ser liberada lentamente, evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar.

O uso terapêutico de colutórios bucais, no tratamento odontológico, é uma prática comum. Este método não é um privilégio dos tempos atuais, já que a primeira referência da prática formal de enxaguatórios, no tratamento de doenças da gengiva, data de 2700 a.c. - creditado à medicina chinesa, há aproximadamente 5000 anos (Fischman, 1997).

Avançando aos poucos na História, no Período Romano, era costume popular o uso de enxaguatórios como complemento à limpeza mecânica - especialmente nas classes mais altas - tendo sido criadas diversas formulações, a exemplo da estabelecida por Hipócrates (460-377 a.c.) - uma mistura contendo sal, sulfato de alumínio e vinagre. Outras variações, misturando óleo, cerveja, vinho branco e mirra, também foram desenvolvidas. Entre os europeus a "Terapêutica Enxaguatória" foi popular até o início do século XVIII, quando a urina passou a ser considerada como uma alternativa efetiva no controle da limpeza bucal - tendo o seu mérito vinculado a altas concentrações de sal, e não a presença de uréia e amônia (Weinberger, 1948).

Atualmente, dispomos de um grande número de anti-sépticos bucais para uso diário, que apresentam diferentes formulações e nomes comerciais. Dentre eles destacam-se Listerine[®] - que vem sendo empregado a mais de 100 anos - assim como Cepacol[®], Periogard[®] e Plax[®]. Tais colutórios são utilizados e adquiridos sem a indicação do profissional da área odontológica - com a intenção de resolver ou diminuir problemas como halitose, propiciar sensação de frescor e proteger os dentes e gengiva, como instrui o fabricante do produto.

Contudo, pela diversidade de produtos existentes - com diferentes nomes comerciais, e conseqüentemente, apresentando combinações de fármacos distintas ou concentrações de álcool variáveis em suas composições - torna-se necessário o delineamento de estudos voltados não apenas para a estratégia de uso dos colutórios, mas mais especificamente, para a avaliação do seu possível potencial citotóxico e genotóxico (Poggi *et al.*, 2003; Rodrigues, 2004).

Clinicamente foi evidenciado que os colutórios que contém álcool apresentam efeitos colaterais - que, na maior parte dos usuários, incluem dor e sensação de queimação da mucosa, dificuldade de uso em pacientes com mucosa hipersensível e ainda, risco de ingestão acidental em crianças (Schulman e Wells, 1997).

1.1.2. CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO (piridínio, 1-hexadecil-,cloreto)

O cloreto de cetilpiridínio (Figura 1) é um anti-séptico da família dos compostos quaternários de amônia, sendo utilizado em um grande número de colutórios, normalmente na concentração de 0,05%. No pH oral, o anti-séptico é mono-catiônico e adsorve, rapidamente, em uma grande extensão das superfícies orais - o que faz com que sua eficácia seja de aproximadamente três horas (Bonesvoll e Gjermo, 1978).

Devido a sua ação detergente, o cloreto de cetilpiridínio causa perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana (McDonnell e Russell, 1999) evidenciada como ação inibidora da placa - ainda que o seu benefício em relação à gengivite seja equivocado, particularmente quando as fórmulas são utilizadas em conjunto com a escovação e cremes dentais. No entanto, a sua eficácia pode ser melhorada através do aumento na

frequência dos bochechos- para quatro vezes ao dia – às expensas de aumento dos efeitos colaterais locais, incluindo mancha nos dentes.

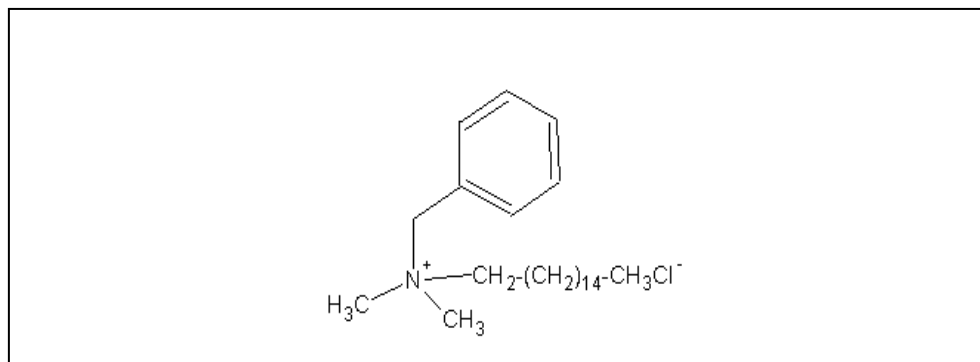


Figura 1- Estrutura química do Cloreto de cetilpiridínio

1.1.3. CLOREXIDINA (1,1- Bis hexametil (5-p-clorofenil biguanida) di-D-gluconato)

A Clorexidina (Figura 2) pertence a família das bisbiguanidas – bisbiguanida catiônica, estando disponíveis como sais de digluconato, de acetato, e de cloridrato. A maioria das fórmulas e produtos orais usa o sal de digluconato de clorexidina, que é manufaturado como um concentrado de 20% v/v (Rodrigues, 2004), sendo a mais indicada por ter maior solubilidade em água e por liberar o componente catiônico, em pH fisiológico (Torres *et al.*, 2000). A Clorexidina foi desenvolvida nos anos 40 – pela Indústria Química Imperial, na Inglaterra – sendo colocada no mercado em 1954 como um anti-séptico para ferimentos de pele. Mais tarde foi amplamente utilizada na Medicina, em especial nos procedimentos cirúrgicos. O seu uso inicial na Odontologia estava restrito a desinfecção pré-cirúrgica e a endodontia. Somente em 1970, passou a ser utilizada como inibidora da placa bacteriana (Løe e Schiott, 1970).

A sua ação antimicrobiana inclui um amplo grupo de bactérias, gram-positivas e gram-negativas, sendo também eficaz contra fungos e alguns vírus (vírus da hepatite B e vírus da imunodeficiência humana), como relatam McDonnell e Russell (1999). Seu efeito bacteriostático ou bactericida está relacionado diretamente com sua concentração: utilizada em baixa concentração apresenta efeito bactericida - afeta a integridade da membrana celular devido a sua característica catiônica; em alta concentração provoca o congelamento do citoplasma - coagulação e precipitação do citoplasma pela formação de complexos fosfatados, como a adenosina trifosfato (Jones, 1997; McDonnell e Russell, 1999).

Atualmente, os colutórios que empregam a Clorexidina na sua formulação apresentam a concentração de 0,12% deste fármaco como ingrediente ativo, pois diminui os efeitos adversos das soluções mais concentradas mantendo a eficácia contra os microorganismos. A sua natureza catiônica minimiza a absorção através da pele e das mucosas, incluindo o trato gastrointestinal, ainda que cause efeitos colaterais relacionados com a coloração dos dentes, dorso da língua e de alguns materiais restauradores - pigmentação amarronzada e com menos frequência, a erosão da mucosa bucal (Flotra, 1973; Rodrigues, 2004).

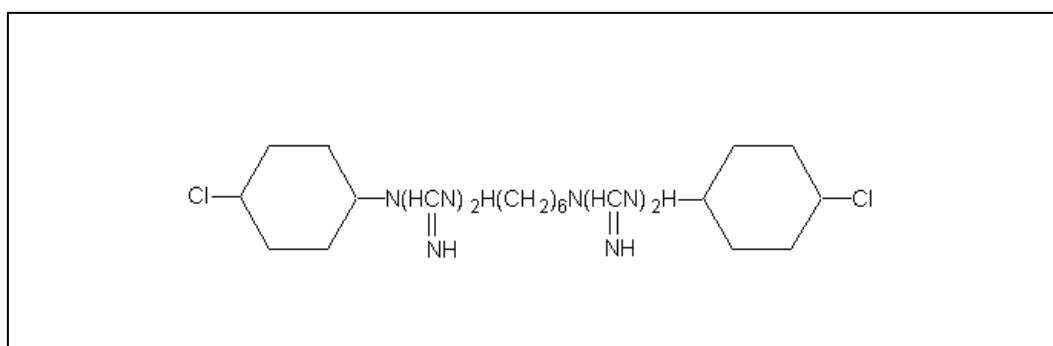


Figura 2- Estrutura química da Clorexidina

1.1.4. TRICLOSAN (2,4, 4' - tricloro-2' hidroxí difenil éter)

O Triclosan (Figura 3), anti-séptico não iônico, pertence à família dos fenóis, sendo um agente largamente utilizado na composição de um grande número de medicamentos. Quando usado na formulação dos colutórios – em uma concentração de 0,2% e dose de 20 mg duas vezes ao dia – apresenta ação moderada, tanto como inibidor de placa quanto como agente antimicrobiano (Jenkins *et al.*, 1991). A sua atividade é aumentada pela adição do citrato de zinco ou do copolímero éter de ácido maleico polivinilmetil - Gantrez (0,2%), pois, isoladamente, o Triclosan apresenta retenção e atividade antiplaca limitados. Enquanto o primeiro potencializa a sua ação antimicrobiana, o último prolonga a sua retenção. (Jenkins *et al.*, 1991).

Este anti-séptico não provoca desequilíbrios na microbiota da cavidade bucal, pois possui baixa toxicidade e largo espectro de ação contra microorganismos gram-positivos, gram-negativos e fungos, por promover o extravasamento dos componentes da membrana citoplasmática – tendo atividade em superfícies aniônicas e catiônicas (McDonnell e Russell, 1999).

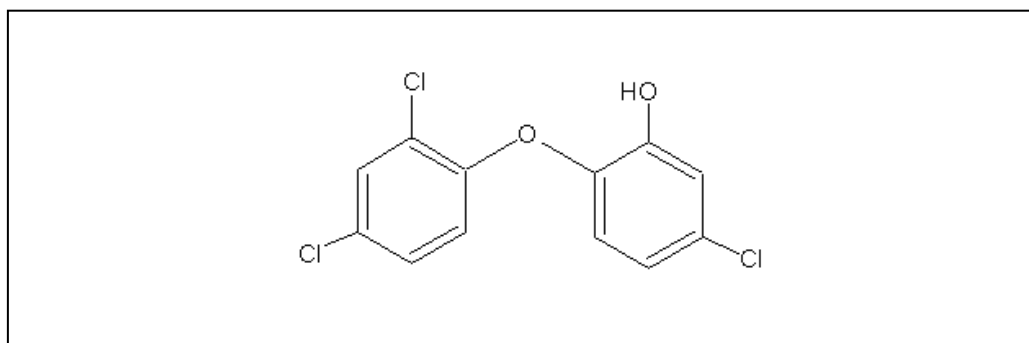


Figura 3- Estrutura química do Triclosan

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Atualmente, dispomos de um grande número de anti-sépticos bucais para uso diário, que são amplamente indicados e utilizados no controle da placa bacteriana – ainda que existam poucas informações referentes aos seus efeitos tóxicos sobre as células da mucosa bucal (Poggi *et al.*, 2003; Rodrigues, 2004). Devido ao desenvolvimento, relativamente recente, de metodologias precisas capazes de cobrir as diferentes lesões induzidas no DNA - como a análise de micronúcleos em células esfoliadas - torna-se premente a necessidade de revalidação das características de toxicidade genética de algumas drogas e materiais utilizados em Odontologia.

Dentro deste contexto, foram investigadas, *in situ*, as potencialidades genotóxicas de três colutórios (anti-sépticos bucais) - Cepacol[®] (Cloreto de cetilpiridínio), Periogard[®] (Digluconato de clorexidina) e Plax[®] (Triclosan), utilizando a análise da incidência de micronúcleos nas células da mucosa bucal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agentes Químicos

Foram avaliados três colutórios (anti-sépticos bucais) em concentrações para uso diário: Cloreto de cetilpiridínio a 0,05% (CAS 123-03-5), denominado Cepacol[®] (Aventis Pharma LTDA); Digluconato de clorexidina (CAS 55-56-1) 0,12%, comercialmente nomeado Periogard[®] (Colgate-Palmolive Company) e Triclosan a 0,03% (CAS 3380-34-5) / Fluoreto de sódio (227 ppm de flúor) / copolímero éter de ácido maleico polivinilmetil (Gantrez 0,2%), comercialmente conhecido como Plax[®] (Colgate-Palmolive Company).

3.2. Amostra

Antes do início da presente pesquisa, o projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da ULBRA, tendo sido aprovado sob o número de protocolo 2006 - 191H. A seleção e entrevista do grupo foi conduzida em ambiente de privacidade. A amostra total constitui-se de 30 indivíduos do sexo masculino, não fumantes, divididos em três grupos: Grupo I (Cepacol[®]); Grupo II (Periogard[®]); Grupo III (Plax[®]). Fizeram parte de cada grupo, 10 homens - que preencheram e atenderam os requisitos propostos no questionário em anexo (anexo 1). Como critério de exclusão foi exigido que os integrantes dos grupos não apresentassem história prévia de: (i) infecções virais e/ou bacterianas; (ii) irradiação de face e pescoço; (iii) uso de drogas ilegais, ou de algum medicamento (antiparasitário, antibacteriano, etc.); (iv) uso de agente genotóxico,

incluindo álcool e tabaco - no período anterior há 25 dias antes da primeira coleta das células da mucosa bucal, até o final das raspagens.

As coletas de células esfoliadas da mucosa bucal foram obtidas segundo os procedimentos específicos de manipulação de acordo com as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsinki. Os participantes assinaram cartas de consentimento informado.

3.3. Análise de Micronúcleos

O Teste de Micronúcleo baseia-se na identificação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula - formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MN). A análise de MN é usada como padrão de aberrações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes que interferem no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso ou aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas. Desta forma, uma frequência elevada de micronúcleos é um dado essencial na identificação de grupos de populações - expostas a agentes aneugênicos e/ou clastogênicos - e, portanto com risco elevado de desenvolver câncer (Roth *et al.*, 2002).

No presente estudo, a análise da incidência de micronúcleos nas células da mucosa da bochecha (lados direito e esquerdo) foi realizada antes dos bochechos com os colutórios - representando o controle negativo. Os diferentes colutórios foram aplicados, durante 7 dias - através de bochechos de 1 min duas vezes ao dia. Passados 7 a 14 dias do final dos tratamentos foram realizadas as coletas de células de descamação da mucosa jugal - com o auxílio de uma escova Citobrush Plus (Kolplast Comercial Industrial LTDA, Brasil), previamente esterilizada

em autoclave (Figura 4). Após a coleta a escova foi agitada em 20 ml de solução tampão (0,1 M EDTA, 0,01 Tris-HCl e 0,02 M NaCl, pH 7), colocada em tubos Falcon de 20 ml e centrifugada, duas vezes, a 1500 rpm, por 10 minutos - para obtenção de um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Tal procedimento tem também como intuito eliminar bactérias e células danificadas que dificultam a análise posterior das lâminas.



Figura 4: Escova utilizada para a coleta das células esfoliadas da mucosa bucal.

Em seguida retirou-se 50-100 microlitros da suspensão celular, que foi gotejada sobre lâmina pré-aquecida (37°C) - visando à obtenção de 3000-5000 células por lâmina. Após este procedimento, as lâminas secaram por 15 minutos em placa quente, sendo fixadas em metanol gelado (80%) por 30 minutos. A secagem final foi efetuada à temperatura ambiente por 24 horas. Passado este período, as lâminas foram coradas por 3 minutos em May-Grunwald (0,25 g/100ml de metanol) e por 7 minutos em Giemsa 10% (solução estoque diluída em 1:10 de PBS).

Cada lâmina foi identificada e devidamente registrada no livro de registros do Laboratório da Toxidade Genética da Universidade Luterana do Brasil. Foram analisadas 2000 células por indivíduo, subdivididas em 4 lâminas - 500 células por lâmina - em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, visando à quantificação dos micronúcleos presentes, tanto nas

células controle quanto nas tratadas com os diferentes agentes antibacterianos. A avaliação das lâminas ocorreu em teste cego, em que o observador não teve conhecimento dos grupos e dos sítios estudados. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleo foram: (i) presença de material nuclear; (ii) ter coloração maior ou igual a do núcleo; (iii) ter forma circular ou oval; (iv) possuir área menor do que 1/3 do núcleo; (v) estar completamente separado do núcleo.

3.4. Análise Estatística

Para análise da variável incidência de micronúcleo em cada um dos grupos de indivíduos expostos - grupo I, grupo II e grupo III - e os seus respectivos controles pré-exposição (controles negativos) foi utilizado o teste de Wilcoxon Signed-Ranks. Para a avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas quanto a idade dos pacientes de cada grupo de tratamento foi utilizado o teste U.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de colutórios bucais como coadjuvante ao controle mecânico da placa dental é uma terapêutica consagrada em Odontologia, sendo recomendada pelo cirurgião-dentista de acordo com a necessidade específica de cada paciente. Por outro lado, é sabido que estes produtos também são utilizados indiscriminadamente e/ou aleatoriamente por qualquer indivíduo, desde que atenda as prioridades do próprio usuário, bem como, as indicações do fabricante. A maioria dos colutórios bucais existentes no mercado, inclusive os três anti-sépticos investigados nesta pesquisa, empregam diferentes concentrações de álcool na sua composição – Cepacol[®] (16,8%); Plax[®] (6%); Periogard[®] (11,6%) - com a função de ressaltar o impacto do sabor, solubilizar o ingrediente ativo e preservar a formulação (Forward *et al.*, 1997), sendo administrados sistematicamente e, algumas vezes, por longos períodos.

4.1. Efeitos Colaterais Relacionados a Presença de Álcool

Apesar dos benefícios proporcionados aos dentes e ao periodonto pelo uso destas soluções, independentemente da substância ativa e das várias funções exercidas pelo álcool nas formulações propostas pelos fabricantes, pesquisas relatam a maior presença de efeitos colaterais relacionados ao uso de colutórios que contém álcool na sua composição (Schulman e Wells, 1997). Estas alterações incluem alteração do paladar, ardência e principalmente, ulcerações na mucosa dos pacientes mais sensíveis. Dentro deste contexto, foram analisados os efeitos colaterais, freqüentemente descritos na literatura, observados nos usuários destes colutórios - buscando uma possível relação entre o efeito adverso e a

presença de micronúcleos. A ardência foi relatada por 100%, 90% e 40% dos pacientes tratados, com Cepacol[®], Plax[®] e Periogard[®], respectivamente. Outro sintoma prevalente foi o relacionado a alterações do paladar, referidos por 60%, 40% e 40% dos grupos expostos a Periogard[®], Cepacol[®] e Plax[®], respectivamente (Gráfico 1).

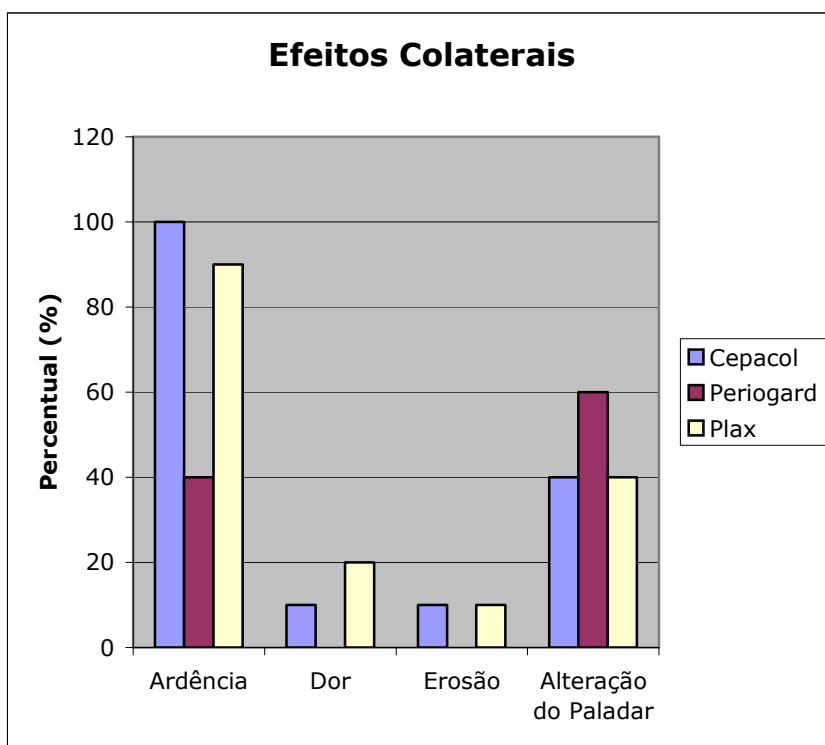


Gráfico I. Frequência dos efeitos colaterais encontrados nos pacientes tratados com Cepacol[®] (Grupo I), Periogard[®] (Grupo II) e Plax[®] (Grupo III).

De fato, todos os colutórios avaliados causaram ardência, também mencionada como "sensação de queimação". Chama a atenção o fato de que os pacientes tratados com Plax[®], em quase sua totalidade, apresentaram esse sintoma. Como este colutório é o que tem a menor concentração de álcool, tal fenômeno parece não estar associado ao álcool – já que conservantes e estabilizadores da solução também contribuem

para este efeito (Prista *et al.*, 1995). Dos trinta pacientes incluídos na pesquisa, dois deles apresentaram lesões erosivas na mucosa: um indivíduo do grupo I - após o terceiro dia de uso do Cepacol[®] e um indivíduo do grupo III - após o quarto dia de tratamento com Plax[®]. Em comum, estes dois pacientes apresentaram as demais manifestações esperadas, inclusive dor. Tais lesões desapareceram entre o quarto e quinto dias após o término da exposição aos colutórios. Os pacientes tratados com Periogard[®]- grupo III - não apresentaram erosões, bem como, sensação dolorosa.

A idade dos pacientes incluídos no grupos Cepacol[®], Periogard[®] e Plax[®], variou, respectivamente de 19 a 49, 25 a 36, 17 a 34. Como consequência, a média para cada um destes grupos, assim como o desvio padrão foram de respectivamente: Cepacol[®] 27,9 ± 11,0; Periogard[®] 31,0 ± 3,1 e Plax[®] 22,8 ± 6,1. A diferença de idade entre o Grupo III-Plax[®] e o Grupo II-Periogard[®] foi estatisticamente diferente (P<0,01), quando avaliada através do teste U. Já as demais associações Cepacol[®] versus Plax[®] (P=0,247) e Periogard[®] versus Cepacol[®] (P=0,190) não mostraram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 1).

Tabela 1. Idade dos pacientes que integraram os grupos de tratamento com os três colutórios bucais

Grupos	N	Idade (M± DP)
<i>Controle I</i>	10	27,90 ± 11,06
Cepacol [®]	10	27,90 ± 11,06
<i>Controle II</i>	10	31,00 ± 3,16*
Periogard [®]	10	31,00 ± 3,16*
<i>Controle III</i>	10	22,80 ± 6,17*
Plax [®]	10	22,80 ± 6,17*

* diferença estatisticamente significante – teste U (P<0,01)

4.2. Estudos preliminares

A literatura especializada refere que a coleta de células esfoliadas da mucosa bucal deve ser realizada no período de 7 a 14 dias após o término da exposição aos potenciais agentes genotóxicos. No entanto, não existem estudos que caracterizem variações nas freqüências de MN dentro deste intervalo de tempo. Assim, procurando investigar uma possível variação na freqüência de micronúcleos e selecionar de forma mais adequada uma data específica para as raspagens, foi realizado um teste piloto, para os pacientes submetidos a tratamento com Cepacol® - Grupo I. Foram, então, analisadas as freqüências de MN nos dias 7, 10, 11, 12 e 14 após o término do tratamento - naqueles pacientes que se dispuseram a participar deste ensaio piloto. Os dados apresentados no Gráfico 2, representam as freqüências de MN obtidas neste intervalo.

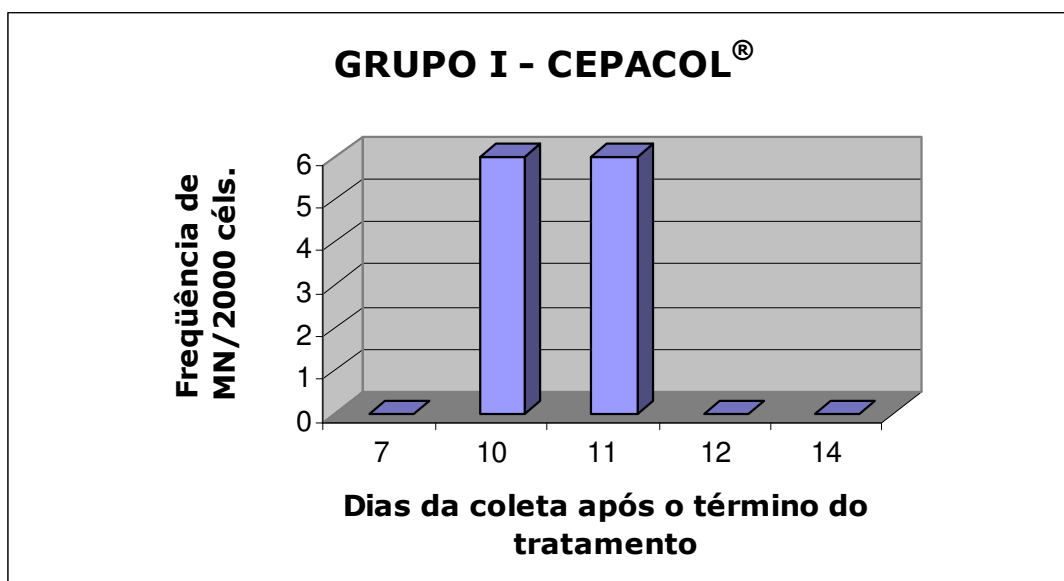


Gráfico II. Freqüência de micronúcleos encontrados nos pacientes tratados co Cepacol® (Grupo I), no intervalo de 7 a 14 dias, após o término da exposição.

Como pode-se observar a maior incidência de MN ocorreu nos dias 10 e 11, o que nos permitiu delinear o melhor intervalo para análise de MN nos demais grupos avaliados – Grupos II e III.

Em função destes achados foi determinada a data da coleta das células da mucosa bucal dos pacientes tratados, incluídos nos grupos II (Periogard®) e III (Plax®), que foi realizada 10 dias após o término dos tratamentos.

4.3. Incidência Espontânea de MN

A incidência de micronúcleos nos controles negativos, assim como nos três grupos expostos aos colutórios bucais é apresentada na Tabela 2. Os pacientes incluídos nestes grupos foram usados como controle negativo. Para tal, a coleta de mucosa bucal foi feita antes da utilização dos três colutórios. Como pode-se observar na Tabela 2 não foram encontrados MN nos controles negativos de todos os Grupos, I, II e III.

Grupos	Células com MN (%) (Média ± DP)
<i>Controle I</i> Cepacol	0.0 0,06 ± 0,126 ^{ns}
<i>Controle II</i> Periogard	0.0 0,01 ± 0,031
<i>Controle III</i> Plax	0.0 0,02 ± 0,042 ^{ns}

^amicronúcleos por 2000 células; ^{ns} estatisticamente não significante Wilcoxon Signed-Ranks

Tabela 2- Frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes expostos a colutórios bucais.

Diferentes estudos experimentais indicam que a taxa espontânea de MN, observada nos controles negativos, apresenta variações significativas, que são dependentes das populações estudadas. Estes valores apontam para freqüências que variam de 0,75% nos egípcios; 0,44% nos hindus; 0,38% nos mexicanos; 0,29% nos canadenses; até 0,16% nos americanos (Heddle *et al.*, 1991; Tolbert *et al.*, 1992, Torres-Bugarin *et al.*, 1998, Majer *et al.*, 2001). Há dois relatos referentes a população brasileira, apontando para uma freqüência espontânea de 0,27%; (Dietz *et al.*, 2000, Majer *et al.*, 2001). No entanto, tais valores estão diretamente relacionados com o número de indivíduos analisados – já que com amostras pequenas, como é o nosso caso, observam-se, para os brasileiros, valores muito próximos de zero. Achados semelhantes foram encontrados no México por Torres-Bugarin *et al.* (1998), onde a taxa espontânea foi considerada baixa – menor que 0,1%. Cabe ainda ressaltar que além do baixo número amostral - 30 indivíduos - os participantes do nosso estudo atenderam a pré-requisitos específicos, investigados por meio do questionário apresentado no anexo 1. Só foram incluídos pacientes sem história prévia de: infecções virais e/ou bacterianas; (ii) irradiação de face e pescoço; uso de drogas ilegais, ou de medicamentos para tratamento de parasitas e bactérias (iv) uso de agente genotóxico, incluindo álcool e tabaco. Outro fator importante a ser destacado, como razão de uma menor freqüência de micronúcleos, relaciona-se a não inclusão de pacientes do sexo feminino – já que mulheres apresentam níveis mais elevados de aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs e formação de micronúcleos, em função dos desníveis hormonais que acompanham o ciclo menstrual (Catalán *et al.*, 1995; Catalán *et al.*, 1998; Titenko-Holand *et al.*, 1998; Pacheco e Hackel, 2000). Desta forma

fica claro que a ausência de MN observada em nossa pesquisa não reflete a real estimativa de taxa espontânea para a população brasileira.

4.4. Incidência MN nos Grupos Tratados

No que se refere a indução de micronúcleos observou-se que os pacientes tratados com Cepacol[®] - Grupo I - foram os que apresentaram a maior frequência, assim como o maior desvio padrão. Entretanto quando estes valores foram comparados com o controle negativo, pelo teste de Wilcoxon Signed-Ranks, não foi obtida diferença estatisticamente significativa ($P=0,102$). Esta resposta está diretamente relacionada a distribuição dos seis MN encontrados - 4 foram induzidos em um único paciente. Já no grupo Plax[®] observou-se uma frequência de 0,02 (distribuídos em dois indivíduos) e no Periogard[®] de 0,01 micronúcleos - com ausência de significância em ambos os grupos - com valores de P iguais, respectivamente, a 0,157 e 0,317.

Muito tem se descrito a respeito do efeito dos colutórios bucais sobre a mucosa oral tanto por meio de evidências clínicas, como por estudos citotóxicos e genotóxicos. Investigando um grupo de 200 pacientes que apresentavam tumor de cabeça e pescoço, Weaver *et al.* (1979) observaram que 11 pacientes da amostra não tinham histórico de fatores predisponentes ao câncer - como ingestão de álcool e consumo de tabaco. Entretanto, dez destes pacientes faziam uso diário de anti-sépticos bucais, duas vezes ao dia, por mais de vinte anos. Os enxagatórios implicados nesta pesquisa continham entre 14-28% de álcool em sua composição. Constatações como esta fizeram com que fossem investigadas algumas características dos colutórios que contém etanol como veículo, assim como a resposta dos tecidos bucais quanto a

indução de câncer - visto que alguns destes produtos apresentam concentração alcoólica superior a bebidas como cerveja, vinho, vodka e whisky - este é o caso do anti-séptico Anapyon[®] (Pintera *et al.*, 1996). Aumento na frequência de micronúcleos também foi observado por Freita *et al.* (2005) quando investigaram a ocorrência de danos cromossômicos em células esfoliadas da mucosa bucal e sua associação com fatores de risco para o desenvolvimento do câncer. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que o uso de anti-sépticos bucais está associado a uma maior ocorrência de micronúcleos, pois o contato do álcool com a mucosa oral pode ser suficiente para expressão dos efeitos genotóxicos desta substância, diferentemente da simples ingestão de bebidas alcoólicas, cujo contato se dá de forma fugaz. Entretanto, neste trabalho, apenas 5 indivíduos - do total de 40 - faziam uso de colutório, e três deles, o faziam associados ao fumo e ao consumo de etanol. Além disso, não foi mencionado pelos autores o volume de etanol contido nos colutórios utilizados por estes pacientes. Desta forma, os próprios pesquisadores referiram que os resultados obtidos devem ser visto com reserva.

Na tentativa de correlacionar a presença de álcool com a indução de macro e micro alterações foram utilizados hamsters, expostos topicamente, por 13 a 20 semanas a três anti-sépticos bucais - Anapyon[®], Listerine[®] e Oral B[®]. Alterações como manchas, lesões exofíticas, ulcerações, hiperqueratinização, atrofia, hiperplasia e displasia epiteliais, não diferiram significativamente do grupo controle (soro fisiológico). É importante ressaltar que o Oral B[®] é o único dos colutórios bucais estudado que não contém álcool na sua formulação. No entanto, não se pode concluir que, em humanos, o álcool seja destituído de efeito - já que ao contrário do que acontece em hamster, o colutório permanece em

contato com a mucosa oral humana por mais tempo, garantindo uma maior ação tópica local (Cardoso *et al.*, 2005).

Ainda que pouco investigado quanto a sua ação tóxico-genética o triclosan - componente principal do colutório Plax[®] - mostrou ser destituído de ação mutagênica em células somáticas de ratos (Russel & Montgomery, 1980), ao mesmo tempo em que em estudos reprodutivos foi classificado como destituído de potencial mutagênico, carcinogênico ou teratogênico (Bhargava e Leonard, 1996).

Já no que se refere a genotoxicidade associada ao digluconato de clorexidina (antiséptico presente no Periogard[®]), os dados da literatura apresentam respostas conflitantes. Se por um lado, Reifferscheid e Heil (1996) relatam a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade associadas ao digluconato de clorexidina - tanto no teste *umu* como no de Ames - Ribeiro *et al.* (2004) fornecem indicações de que esta substância causa aumento estatisticamente significativo na indução de danos no DNA, em leucócitos e células da mucosa oral avaliados pelo teste do cometa - ainda que nenhum acréscimo, na frequência de micronúcleos, tenha sido identificado em eritrócitos do sangue periférico. Considerando que os danos de DNA foram detectados em leucócitos do sangue periférico e que a indução de micronúcleos foi avaliada em eritrócitos - os autores sugerem que a ausência de resposta referentes aos MNs possa estar relacionada ao fato do digluconato de clorexidina não atingir a medula óssea durante a eritoblastose. Respostas positivas no ensaio Cometa foram também observadas em células do epitélio bucal e em linfócitos do sangue periférico, embora os danos de DNA produzidos na cavidade oral tenham sido expressivamente maiores (Eren *et al.*, 2002). Entretanto, estes dados não invalidam as respostas negativas observadas no SMART, uma vez que as lesões de DNA detectadas no teste Cometa não foram

ainda fixadas – o que só ocorrerá após a atuação dos mecanismos de reparo do DNA celular.

Também foram obtidas respostas estatisticamente positivas quando este colutório foi avaliado no ensaio *rec*, que detecta a capacidade do composto lesar o DNA em cepas de *B. subtilis* M-45 (*rec*⁻) e H-17 (*rec*⁺) – mas não no teste de Ames, sem adição de enzimas de metabolização. Entretanto, em presença da fração S9, formam-se seis metabólitos diferentes entre os quais o piragalol – que responde pela ação mutagênica do cloreto de clorexidina. Observou-se ainda que dois outros metabólitos – *p*-clorofenol e pirocatenol – mostraram resposta positiva, respectivamente, no teste de Ames e no ensaio *rec* (Sakagami *et al.*, 1988).

Estudo similar, relativo à ação da clorexidina na mucosa bucal, em ratos tratados com doses 38 mg/kg/dia, via oral – concentração aproximadamente quinhentas vezes maior que a utilizada em humanos – não evidenciaram alterações relacionadas à ação carcinógena desta substância (USP – 23, 2003).

Com relação ao Cloreto de cetilpiridínio, ou a colutórios que fazem uso deste composto, não foram encontrados trabalhos experimentais voltados para a investigação do seu potencial como genotoxina. Trabalho prévio desenvolvido pelo nosso grupo de trabalho avaliou o potencial mutagênico, clastogênico, aneugênico e/ou recombinacional, destes mesmos colutórios bucais, através do teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Periogard[®] e Plax[®] mostraram resposta negativa embora Cepacol[®] – nas concentrações de 75% e 100%) – tenha induzido resposta positiva. Tais achados caracterizaram que Cepacol[®] exerce a sua genotoxicidade, principalmente através da indução de recombinação homóloga em células somáticas. Como o Cepacol[®] é o produto com maior concentração de

álcool foram realizados experimentos adicionais usando separadamente os dois maiores componentes deste colutório – nas mesmas concentrações encontradas no produto. Assim foram avaliados o cetilpiridínio e o etanol. Os dados obtidos mostram que o cetilpiridínio não possui efeito genotóxico e que o etanol atua como indutor de recombinação. Como consequência pode-se inferir que o diagnóstico genotóxico previamente atribuído ao Cepacol[®], deve-se basicamente às altas concentrações de etanol presentes nesta formulação. De fato, no que se refere a genotoxicidade do etanol observa-se que os dados disponíveis na literatura são incompletos e controversos. Entretanto existem claras evidências de que este composto não é mutagênico em bactérias, assim como não induz aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos, quando em ausência de metabolização exógena. No entanto, existem algumas evidências de que o etanol induz trocas entre cromátides irmãs, podendo também atuar como aneugênico em altas doses (Phillips e Jenkinson, 2001, Neri *et al.*, 2003).

No presente estudo, a análise dos dados obtidos pelo uso terapêutico dos anti-sépticos Cepacol[®], Periogard[®] e Plax[®], mostra os três colutórios investigados, como não indutores de mutações cromossômicas, sejam elas relacionadas a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros em células esfoliadas da mucosa bucal, pois a frequência de micronúcleos observada após o tratamento com os respectivos colutórios é no máximo, semelhante a taxa basal encontrada em diversas populações. Deve-se, no entanto, ressaltar que apesar da ausência de significância, os pacientes tratados com Cepacol[®] foram os que apresentaram o maior número de MN.

5. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

O câncer bucal constitui um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, pois corresponde a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo o carcinoma epidermóide a sua forma mais prevalente. Sua prevenção depende, primariamente, da identificação de fatores associados ao seu desenvolvimento (Freita *et al.*, 2005). Em geral, os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer atuam na indução de alterações no material genético, levando à ocorrência de danos no DNA, representados tanto por mutações gênicas e aberrações cromossômicas, quanto por recombinação somática (Poschl *et al.*, 2004). Atualmente, diferentes estudos utilizando o teste do micronúcleo como biomarcador tem proporcionado as áreas da Odontologia e da Toxicologia Genética maior interação na busca da avaliação do potencial genotóxico de diferentes drogas e materiais empregados em Odontologia e, por conseguinte, sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (Roth *et al.*, 2002; Cerqueira *et al.*, 2004). O Teste do Micronúcleo evidencia danos cromossômicos causados por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos utilizando para tanto, células do sangue ou células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal (Fenech, 2000; Rabello-Gay *et al.*, 1991). Entre suas vantagens destacam-se: a facilidade do procedimento, o baixo custo e, principalmente, no que tange os estudos direcionados à Odontologia, sua eficiência por investigar *in situ* alterações cromossômicas que podem ser detectadas precocemente – pois a frequência de micronúcleos mostrar-se-á elevada antes de qualquer manifestação clínica - tornando-se uma importante ferramenta na prevenção da carcinogênese bucal. Apesar destes achados, os dados

do presente trabalho mostram os três colutórios, como não indutores de mutações cromossômicas, sejam elas relacionadas a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros. No entanto, associando esta observação com o número amostral relativamente pequeno, não podemos afirmar que os nossos dados fornecem indicação da segurança dos produtos Cepacol[®], Periogard[®] e Plax[®], pelo menos, no que se refere à indução de mutação cromossômica em células proliferativas da mucosa bucal.

É nosso objetivo futuro aumentar o número de pacientes em cada um dos três grupos avaliados, buscando um número amostral ideal, que nos permita classificar definitivamente os referidos colutórios quanto ao seu potencial como indutores ou não de mutações cromossômicas *in situ*. Este procedimento já está sendo colocado em prática, buscando a resposta de 25 pacientes por grupo de tratamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered Antimicrobials. A short review. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 13, p. 957-964, 1986.

AXELSON, P., LINDHE, J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 8, p. 239-248, 1986.

BHARGAVA, H.N., LEONARD, P.A. Triclosan: applications and safety. *American Journal of Infection Control*, v. 24, p. 209-218, 1996.

BONESVOLL, P., GJERMO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human mouth after mouthrinses. *Archives of Oral Biology*, v. 23, p. 289-294, 1978.

CATALAN, J., AUTIO, K., WESSMAN, M., LINDHOLM, C., KNUUTILA, S., SORSA, M., NORPPA, H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of human. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 68, p. 11-16, 1995.

CATALÁN, J., AUTIO, K., KUOSMA, E., NORPPA H. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *The American Journal of Human Genetics*, v. 63, p. 1464-1472, 1998.

CARDOSO, C. L., PRADO, R. F., TAVEIRA, L.A.A. Macroscopic and microscopic study of tissue response to oral antiseptics and its influence on carcinogenesis. *Journal of Applied Oral Scienc*, v. 13, 2005.

CERQUEIRA, E.M.M., GOMES-FILHO, I.S., TRINDADE, S., LOPES, M.A., PASSOS, J.S., MACHADO-SANTELLI, G.M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutation Research*, v. 562, p. 111-117, 2004.

DAHLÉN, G. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor bucal hygiene. *Journal of Clinical Periodology*, v. 19, p. 35-42, 1992.

DIETZ, J., DIEHL, A.S., PROLLA, J.C., FURTADO, C.D., FURTADO, A.D. Pesquisa de Micronúcleos na Mucosa Esofágica e sua Relação com Fatores de Risco de Esôfago. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, p. 207-211, 2000.

EREN, K., ÖZMRIC, N., SARDAS, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clinical Oral Investigations*, v. 6, p. 150-154, 2002.

ETO, F.S., RASLAN, S.A., CORTELLI, J.R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. Disponível em: www.unitau.br/prppg/publica/biocienc/downloads/caractmicrobianas-N2-2003.pdf – Acesso em: 14/07/2005.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FISCHMAN, S.L. The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years? *Periodontology 2000*, v. 15, p. 7-14, 1997.

FLÖTRA, L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *Journal Periodontology Research*, v. 8, suppl.12, p 41-44, 1973.

FORWARD, G.C., JAMES, A.H., BARNETT, P., JACKSONR, J. Gun health product formulations: what is in them and why? *Periodontology 2000*, v. 15, p. 32-39, 1997.

FREITA, V.S., LOPES, M.A., MEIRELES, J.R.C., REIS, L., CERQUEIRA, E.M.M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 29, p. 189-199, 2005.

GENCO, R.J., COHEN, D.W., GOLDMAN, H.M. *Periodontia Contemporânea*, 2 ed. São Paulo: Santos, cap. 8 e 9, p. 117-134, 1997.

HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, PH., MAC GREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 18 , p. 277-291, 1991.

JACKSON, R. Metal salts, essential oils and phenols – old or new? *Periodontology 2000*, v. 15, p. 63-73, 1997.

JENKINS, S., ADDY, M., MEWCOMBE, R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses. Effects on 4-days plaque regrowth. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 18, p. 145-148, 1991.

JONES, C.G. Chlorhexidine: is it still the gold standart? *Periodontology 2000*, v. 15, p. 55-62, 1997.

KORMAN, K.S. The role of supragingival plaque and prevention and treatment of periodontal diseases. *Journal of Periodontology Research*, v. 21, p. 5-22, 1986.

LÖE, H., SCHIOTT, C.R. The effect of mounthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontology Research*, v. 5, p. 79-83, 1970.

LOESCH, W.J., SYED, S.A. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infection Immunology*, v. 21, p. 830-839, 1978.

MAJER, B.J., LAKY, B., KNASMÜLLER, S., KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, v. 489, p. 147-172, 2001.

MCDONNELL, G., RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 147-179, 1999.

MORAN, J.H. Chemical plaque control for the masses. *Periodontology* 2000, v. 15, p. 109-117, 1997.

NERI, M., FUCIC, A., KNUDSEN, L.E., LANDO, C., MERLO, F., BONASSI, S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research*, v. 544, p. 243-54, 2003.

PACHECO, A. O., HACKE, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 18, nº.6, Rio de Janeiro, 2002.

PASTER, B.J., RABER, D.J., MAIDEN, M.A. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, v. 12, p. 3770-3783, 2001.

PHILLIPS, B.J., JENKINSON, P. Is Ethanol Genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis*, v. 16, p. 91-101, 2001.

PINERA; K., NOGUEIRA, A.C.A., CONSOLARO, A. Determinação do teor alcoólico de anti-sépticos bucais e carcinogênese bucal química. *Revista Brasileira de Ciências Estomatológicas*, v.1, p. 13-17, 1996.

POGGI, P., BAENA, R.R., RIZZO, S., ROTA, M.T. Mouthrinses with alcohol: Citotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology*, v. 74, p. 623-629, 2003.

POSCHL, G., STICKEL, F., WANG, X.D., SEIT, H.K. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 65-71, 2004.

PRISTA, L. N., BAHIA, M. F., VILAR, E. *Dermofarmácia e cosmética*. Porto: Associação Nacional de Farmácia, p. 503-551, 1995.

RABELLO-GAY, M.N., RODRÍGUEZ, M.A.R., MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 246p., 1991.

REIFFERSCHIED, G., HEIL, J. Validation of SOS / umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research*, v. 369, p. 129-145, 1996.

RIBEIRO, D.A., BAZO, A.P., FRANCHI, C.A.S., MARQUES, M.E.A., SALVADORI, D.M.F. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosa cells. *Journal of Periodontal Research*, v. 39, p. 358-361, 2004.

RODRIGUES, F. *Investigação do potencial genotóxico de anti-sépticos bucais em Drosophila melanogaster*. Canoas, 2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) Universidade Luterana do Brasil.

ROSAN, B., LAMONT, R.J. Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1599-1607, 2000.

ROTH, D.M., ZECHLINSKI, G., MARTINO-ROTH, M. Avaliação da genotoxicidade em cirurgiões-dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, v 10, p. 209-214, 2002.

RUSSEL, L.B., MONTGOMERY, C.S. Use of the mouse spot test to investigate the mutagenic potential of triclosan (Irgasan® DP300). *Mutation Research*, v. 79, p. 7-12, 1980.

^aSAKAGAMI, Y., YAMASAKY, H., YOKOYAMA, H., OSE, Y., SATO, T. DNA repair test of disinfectants by liquid rec-assay. *Mutation Research*, v. 193, p 21-30, 1988.

^bSAKAGAMI, Y., YAMAZAKI, H., OGASAVARA, N., YOKOYAMA, H., OSE, Y.; SATO, T. The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites by *umu* test. *Mutation Research*, v. 209, p. 155-160, 1988.

SCHULMAN, J.D., WELLS, L.M. Acute ethanol toxicity from ingesting mouthwash in children younger than 6-years of age. *Pediatric Dentistry*, v. 19, p. 404-408, 1997.

SLOTS, J. Microflora in the healthy gingival sulco in man. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 85, p. 247-254, 1977.

SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., XIMÉNES-FYVIE, L.A. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 3, p. 1-7, 1988.

TITENKO-HOLAND, N., JACOB, R.A., SHANG, N., BALARAMAN, A., SMITH, M.T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated bucal cells of post menopausal women with dietary changes in folate. *Mutation Research*, v. 417, p. 101-114, 1998.

TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, v. 271, p. 69–77, 1992.

TORRES, C.R.G., KUBO, C.H, ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*, v. 3, n.2, p. 43-52, 2000.

TORRES-BUGARIN, O., ANDA-CASILLAS, A., RAMÍREZ-MUÑOZ, M.P., SANCHES-CORONA, J., CANTÚ, J.M., ZÚÑIGA; G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutation Research*, v. 413, p. 277-81, 1988.

USP 23 – DI. Drug information for the health care professional. – *United States Pharmacopeia* : Thomson Micromedex , 23 ed., p. 786-788, 2003.

WEAVER A., FLEMING, S.M., SMITH, D.B., PARK, A. Mouthwash and oral cancer. Carcinogen or coincidence. *Journal of Oral Surgery*, v. 37, p. 50, 1979.

WEINBERGER, B.W. *An introduction to the history of dentistry: with medical and dental chronology & bibliographic data*. St. Louis: Mosby Co, v. 1, 514 p., 1948.

WILSON, M. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*, v. 84, p. 235-2254, 2001.

XIE, H., COOK, G.S., COSTERTON, J.W., BRUCE, G., ROSE, T.M., LAMONT, R.J. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 7067-7069, 2000.

XIMENEZ-FIVIE, L.R., HAJAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal Clinical Periodontology*, v. 27, p. 648-657, 2000.

7. ANEXO

Anexo 1

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR

FICHA DE ANAMNESE PARA CADASTRAMENTO DOS PACIENTES

Dados do paciente

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade _____

Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Telefone: () _____

Doenças

Sistêmicas: _____

Medicamentos: _____

Medicamentos específicos:

() p/ infecções virais / bacterianas () quimioterápicos

Qual(is) _____

Data de interrupção do tratamento: () + 30 dias () - 30 dias

Exames radiográficos: () + 30 dias () - 30 dias

Hábitos

Café: quantidade de xícaras por dia _____

Chimarrão: quantidade de cuias por dia _____

Cigarro: () Sim () Não

Álcool: () Sim () Não

Uso de Drogas: () Sim () Não

Alterações dos dados do paciente:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)